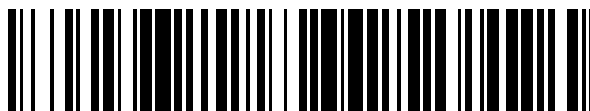


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 894**

51 Int. Cl.:

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12P 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2011** **PCT/US2011/024482**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011** **WO11142865**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2011** **E 11780955 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 2534240**

54 Título: **Microorganismos de levadura con una acumulación reducida de subproductos para una mejor producción de combustibles, productos químicos y aminoácidos**

30 Prioridad:

07.01.2011 US 430801 P
09.11.2010 US 411885 P
07.06.2010 US 352133 P
10.03.2010 US 282641 P
26.02.2010 US 308568 P
12.02.2010 US 304069 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2020

73 Titular/es:

GEVO, INC. (50.0%)
345 Inverness Drive South Building C, Suite 310
Centennial, CO 80112, US y
CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(50.0%)

72 Inventor/es:

BUELTER, THOMAS;
HAWKINS, ANDREW;
PORTER-SCHEINMAN, STEPHANIE;
MEINHOLD, PETER;
DUNDON, CATHERINE, ASLESON;
ARISTIDOU, ARISTOS;
URANO, JUN;
LIES, DOUG;
PETERS, MATTHEW;
DEY, MELISSA;
JANCAUSKAS, JUSTAS;
BERRY, RUTH;
EVANS, KENT;
KELLY, JULIE;
BASTIAN, SABINE y
ARNOLD, FRANCES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 739 894 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismos de levadura con una acumulación reducida de subproductos para una mejor producción de combustibles, productos químicos y aminoácidos

Reconocimiento del apoyo del gobierno

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno en virtud del Contrato n.º 2009-10006-05919, otorgado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, y en virtud del Contrato n.º W911NF-09-2-0022, otorgado por el Laboratorio de Investigación del Ejército de Estados Unidos. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

Campo técnico

En el presente documento, se describen microorganismos recombinantes y métodos para producir dichos organismos. También se describen métodos para producir metabolitos beneficiosos, incluyendo combustibles, productos químicos y aminoácidos, mediante la puesta en contacto de un sustrato adecuado con microorganismos recombinantes y preparados enzimáticos de los mismos.

Antecedentes

La capacidad de los microorganismos para convertir el piruvato en metabolitos beneficiosos, incluyendo combustibles, productos químicos y aminoácidos, se ha descrito ampliamente en la bibliografía en los últimos años. Véase, por ejemplo, Alper *et al.*, 2009, *Nature Microbiol. Rev.* 7:715-723. Las técnicas de ingeniería recombinantes han permitido la creación de microorganismos que expresan vías biosintéticas capaces de producir una serie de productos útiles, tales como valina, isoleucina, leucina y ácido pantoténico (vitamina B5). Además, los combustibles tales como el isobutanol se han producido de forma recombinante en microorganismos que expresan una vía metabólica heteróloga (véase, por ejemplo, el documento WO/2007/050671 de Donaldson *et al.*, y el documento WO/2008/098227 de Liao *et al.*). Aunque los microorganismos modificados mediante ingeniería genética representan herramientas potencialmente útiles para la producción renovable de combustibles, productos químicos y aminoácidos, muchos de estos microorganismos carecen de relevancia comercial debido a sus características de bajo rendimiento, que incluyen baja productividad, títulos bajos y bajas producciones. El documento WO 2009/086423 describe un método para producir isobutanol proporcionando un microorganismo transformado con una vía de producción de isobutanol que contiene al menos un gen exógeno. El documento WO 2009/103533 describe la producción fermentativa de isobutanol usando levadura. Eglinton *et al* ("Yeast" 2002: 19: 295-301) describen la disminución de la acumulación de ácido acético por una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* sobreproductora de glicerol al delecionar el gen de la ALD6 aldehído deshidrogenasa.

Una de las principales razones para el desempeño subóptimo observado en muchos microorganismos existentes es la conversión no deseada de los productos intermedios de la vía en subproductos no deseados. Los presentes inventores han identificado varios subproductos, incluyendo el ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (DH2MB) (CAS n.º 14868-24-7), 2-etil-2,3-dihidroxibutirato, 2,3-dihidroxi 2-metil-butanonato, isobutirato, 3-metil-1-butirato, 2-metil-1-butirato y propionato, que se derivan de varios productos intermedios de vías biosintéticas usadas para producir combustibles, productos químicos y aminoácidos. La acumulación de estos subproductos tiene un impacto negativo en la síntesis y el rendimiento de los metabolitos deseables en varias reacciones de fermentación. Hasta ahora, no se habían caracterizado las actividades enzimáticas responsables de la producción de estos subproductos no deseados. Más particularmente, la presente solicitud muestra que las actividades de una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR) y una aldehído deshidrogenasa (ALDH) permiten la formación de estos subproductos a partir de importantes productos intermedios de la vía biosintética.

La presente solicitud procede del estudio de estas actividades enzimáticas, y muestra que la supresión de las enzimas 3-KAR y/o ALDH reduce considerablemente o elimina la formación de subproductos no deseados, y mejora concomitantemente los rendimientos y títulos de metabolitos beneficiosos. La presente solicitud muestra, además, que la potenciación de las actividades enzimáticas de 3-KAR y/o ALDH se puede usar para aumentar la producción de diferentes subproductos, tales como el ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (DH2MB), 2-etil-2,3-dihidroxibutirato, 2,3-dihidroxi-2-metilbutanonato, isobutirato, 3-metil-1-butirato, 2-metil-1-butirato y propionato.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que pueden acumularse subproductos no deseados durante diferentes procesos de fermentación, incluyendo la fermentación del biocombustible candidato, isobutanol. La acumulación de estos subproductos no deseados procede de la conversión no deseada de productos intermedios de la vía, incluyendo los 3-cetoácidos, el acetolactato y el 2-aceto-2-hidroxibutirato, y/o aldehídos, tales como isobutiraldehído, 1-butanal, 1-propanal, 2-metil-1-butanal y 3-metil-1-butanal. La conversión de estos productos intermedios en subproductos no deseados puede dificultar la productividad y el rendimiento óptimos de un producto derivado de 3-ceto-ácido y/o aldehído. Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado métodos para reducir la conversión de productos

intermedios de 3-ceto-ácido y/o aldehído en diversos subproductos de fermentación durante procesos en los que un 3-ceto-ácido y/o un aldehído actúan como productos intermedios de la vía.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo recombinante que es un microorganismo de levadura que comprende una vía biosintética de la que el acetolactato es un producto intermedio, en el que dicho microorganismo recombinante está modificado mediante ingeniería genética para delecionar o alterar un gen que codifica una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (DH2MB) para reducir o eliminar la expresión o actividad de dicha enzima, y en el que la delección o la alteración de dicho gen reduce la producción de DH2MB, en el que el microorganismo expresa además una acetolactato sintasa exógena para convertir el piruvato en acetolactato, en el que dicho gen se selecciona del gen YMR226 de *S. cerevisiae* con SEQ ID NO: 1 o de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23; o es una de sus variantes u homólogos que tiene al menos un 85 % de identidad con las mismas.

La enzima que cataliza la conversión de acetolactato en DH2MB es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR).

En el presente documento, también se describe un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa el 3-ceto-ácido, 2-aceto-2-hidroxi butirato, como producto intermedio, en el que dicho microorganismo recombinante está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en el correspondiente 3-hidroxiácido, 2-etil-2,3-dihidroxi butanoato. En algunas realizaciones, La enzima que cataliza la conversión de 2-aceto-2-hidroxi butirato en 2-etil-2,3-dihidroxi butanoato es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR).

En el presente documento también se describe un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa un aldehído como producto intermedio, en el que dicho microorganismo recombinante está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del aldehído en un subproducto ácido. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza la conversión del aldehído en un subproducto ácido es una aldehído deshidrogenasa (ALDH).

En el presente documento, también se describe un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa tanto un 3-ceto-ácido como un aldehído como productos intermedios, en el que dicho microorganismo recombinante está (a) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión de un 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto de 3-hidroxiácido; y (b) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión de un aldehído intermedio en un subproducto ácido. En una realización, el 3-ceto-ácido es acetolactato y el subproducto 3-hidroxiácido es DH2MB. En otra realización, el 3-ceto-ácido es 2-aceto-2-hidroxi butirato y el subproducto 3-hidroxiácido es 2-etil-2,3-dihidroxi butanoato. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza la conversión de acetolactato en DH2MB es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR). En algunas realizaciones diferentes, La enzima que cataliza la conversión de 2-aceto-2-hidroxi butirato en 2-etil-2,3-dihidroxi butanoato es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR). En algunas realizaciones diferentes, la enzima que cataliza la conversión del aldehído en un subproducto ácido es una aldehído deshidrogenasa (ALDH). En algunas otras realizaciones más, la enzima que cataliza la conversión de acetolactato en DH2MB es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR) y la enzima que cataliza la conversión del aldehído en un subproducto ácido es una aldehído deshidrogenasa (ALDH). En algunas otras realizaciones más, la enzima que cataliza la conversión de 2-aceto-2-hidroxi butirato en 2-etil-2,3-dihidroxi butanoato es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR) y la enzima que cataliza la conversión del aldehído en un subproducto ácido es una aldehído deshidrogenasa (ALDH).

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, los microorganismos recombinantes pueden comprender una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto de 3-hidroxiácido. En una realización, la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto 3-hidroxiácido se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En otra realización, la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto 3-hidroxiácido se reduce en al menos aproximadamente el 60 %, en al menos aproximadamente el 65 %, en al menos aproximadamente el 70 %, en al menos aproximadamente el 75 %, en al menos aproximadamente el 80 %, en al menos aproximadamente el 85 %, en al menos aproximadamente el 90 %, en al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 99 % en comparación con un microorganismo recombinante que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un producto intermedio 3-ceto-ácido en un subproducto 3-hidroxiácido. En la presente invención, el 3-ceto-ácido intermedio es acetolactato y el subproducto 3-hidroxiácido es DH2MB.

En una realización ilustrativa, la 3-ceto-ácido reductasa es la proteína YMR226C (SEQ ID NO: 1) de *S. cerevisiae*, usada indistintamente en el presente documento con "TMA29". En otras realizaciones, la proteína endógena puede ser la proteína YMR226C (SEQ ID NO: 1) de *S. cerevisiae* o un homólogo seleccionado del grupo que consiste en

Vanderwaltomzoma polyspora (SEQ ID NO: 2), *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 3), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 4), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 5), *Zygosaccharomyces rouxii* (SEQ ID NO: 6), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 7), *Ashbya gossypii* (SEQ ID NO: 8), *Saccharomyces kluyveri* (SEQ ID NO: 9), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 10), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 11), *Pichia stipitis* (SEQ ID NO: 12), *Debaromyces hansenii* (SEQ ID NO: 13), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 14), *Candida dubliniensis* (SEQ ID NO: 15), *Candida albicans* (SEQ ID NO: 16), *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID NO: 17), *Issatchenkia orientalis* (SEQ ID NO: 18), *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO: 19), *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 20), *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 21), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 22) y *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 23).

10 En una realización, el microorganismo recombinante incluye una mutación en al menos un gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa que da lugar a una reducción de la actividad de la 3-ceto-ácido reductasa de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización, el microorganismo recombinante incluye una delección parcial del gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa que da lugar a una reducción de la actividad de la 3-ceto-ácido reductasa de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización, el microorganismo recombinante comprende una delección completa de un gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa que da lugar a una reducción de la actividad de la 3-ceto-ácido reductasa de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización más, el microorganismo recombinante incluye una modificación de la región reguladora asociada con el gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa que da lugar a una reducción de la expresión de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización más, el microorganismo recombinante comprende una modificación del regulador de la transcripción que da lugar a una reducción de la transcripción de un gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa. En otra realización más, el microorganismo recombinante comprende mutaciones en todos los genes que codifican una 3-ceto-ácido reductasa que dan lugar a una reducción de la actividad de un polipéptido codificado por el/los gen/es. En una realización, la actividad o expresión de la 3-ceto-ácido reductasa se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En otra realización, la actividad o expresión de la 3-ceto-ácido reductasa se reduce en al menos aproximadamente el 60 %, en al menos aproximadamente el 65 %, en al menos aproximadamente el 70 %, en al menos aproximadamente el 75 %, en al menos aproximadamente el 80 %, en al menos aproximadamente el 85 %, en al menos aproximadamente el 90 %, en al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 99 % en comparación con un microorganismo recombinante que no comprende una reducción de la actividad o expresión de la 3-ceto-ácido reductasa. En una realización, dicha 3-ceto-ácido reductasa está codificada por el gen TMA29 (YMR226C) de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo, tal como se define en las reivindicaciones.

En otras diferentes realizaciones descritas en el presente documento, los microorganismos recombinantes pueden comprender una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un aldehído en un subproducto ácido. En una realización, la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un producto intermedio de un aldehído en un subproducto ácido se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En otra realización, la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un aldehído en un subproducto ácido se reduce en al menos aproximadamente el 60 %, en al menos aproximadamente el 65 %, en al menos aproximadamente el 70 %, en al menos aproximadamente el 75 %, en al menos aproximadamente el 80 %, en al menos aproximadamente el 85 %, en al menos aproximadamente el 90 %, en al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 99 % en comparación con un microorganismo recombinante que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un aldehído en un subproducto ácido.

45 En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, la proteína endógena que participa en la catalización de la conversión de un aldehído en un subproducto ácido es una aldehído deshidrogenasa (ALDH). En una realización, la aldehído deshidrogenasa es codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste en *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5*, *ALD6* y *HFD1*, y homólogos y variantes de los mismos. En una realización ilustrativa, la aldehído deshidrogenasa es la proteína *ALD6* (SEQ ID NO: 25) de *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones, la aldehído deshidrogenasa es la proteína *ALD6* (SEQ ID NO: 25) de *S. cerevisiae*, o un homólogo o una variante de la misma. En una realización, el homólogo se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 26), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 27), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 28), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 29), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 30), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 31), *Saccharomyces cerevisiae* YJ789 (SEQ ID NO: 32), *Saccharomyces cerevisiae* JAY291 (SEQ ID NO: 33), *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (SEQ ID NO: 34), *Saccharomyces cerevisiae* DBY939 (SEQ ID NO: 35), *Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631 (SEQ ID NO: 36), *Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a (SEQ ID NO: 37), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 38), *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 39), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 40) y *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 41).

60 En una realización, el microorganismo recombinante incluye una mutación en al menos un gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que da lugar a una reducción de la actividad de la aldehído deshidrogenasa de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización, el microorganismo recombinante incluye una delección parcial del gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que da lugar a una reducción de la actividad de la aldehído deshidrogenasa de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización, el microorganismo recombinante comprende una delección completa de un gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que da lugar a una reducción de la actividad de la aldehído deshidrogenasa de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización más, el microorganismo

recombinante incluye una modificación de la región reguladora asociada con el gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que da lugar a una reducción de la expresión de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización más, el microorganismo recombinante comprende una modificación del regulador de la transcripción que da lugar a una reducción de la transcripción de un gen que codifica una aldehído deshidrogenasa. En otra realización más, el microorganismo recombinante comprende mutaciones en todos los genes que codifican una aldehído deshidrogenasa que dan lugar a una reducción de la actividad de un polipéptido codificado por el/los gen/es. En una realización, la actividad o expresión de la aldehído deshidrogenasa se reduce en al menos aproximadamente el 50 %. En otra realización, la actividad o expresión de la aldehído deshidrogenasa se reduce en al menos aproximadamente el 60 %, en al menos aproximadamente el 65 %, en al menos aproximadamente el 70 %, en al menos aproximadamente el 75 %, en al menos aproximadamente el 80 %, en al menos aproximadamente el 85 %, en al menos aproximadamente el 90 %, en al menos aproximadamente el 95 % o al menos aproximadamente el 99 % en comparación con un microorganismo recombinante que no comprende una reducción de la actividad o expresión de la aldehído deshidrogenasa. En una realización, dicha aldehído deshidrogenasa está codificada por el gen *ALD6* de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo.

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, el microorganismo recombinante puede comprender una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido como un producto intermedio. En una realización, el 3-ceto-ácido intermedio es acetolactato. La vía biosintética que usa acetolactato como producto intermedio puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol y coenzima A. En otra realización, el 3-ceto-ácido intermedio es 2-aceto-2-hidroxibutirato. La vía biosintética que usa 2-aceto-2-hidroxibutirato como producto intermedio puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, el microorganismo recombinante puede comprender una vía biosintética que usa un aldehído como un producto intermedio. La vía biosintética que usa un aldehído como producto intermedio puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-propanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol. En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, el aldehído intermedio se puede seleccionar entre isobutiraldehído, 1-butanal, 2-metil-1-butanal, 3-metil-1-butanal, 1-propanal, 1-pentanal, 1-hexanal, 3-metil-1-pentanal, 4-metil-1-pentanal, 4-Metil-1-hexanal y 5-metil-1-heptanal.

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, el microorganismo recombinante puede comprender una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido y un aldehído como un productos intermedios. En una realización, el 3-ceto-ácido intermedio es acetolactato. La vía biosintética que usa acetolactato y un aldehído como productos intermedios puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de isobutanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol. En otra realización, el 3-ceto-ácido intermedio es 2-aceto-2-hidroxibutirato. La vía biosintética que usa 2-aceto-2-hidroxibutirato y un aldehído como productos intermedios puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

En una realización, la invención se dirige a un microorganismo recombinante para producir isobutanol, en la que dicho microorganismo recombinante comprende una vía metabólica que produce isobutanol y en la que dicho microorganismo está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en DH2MB, de acuerdo con las reivindicaciones. En una realización específica, la 3-ceto-ácido reductasa está codificada por el gen TMA29 (YMR226C) de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo, tal como se define en las reivindicaciones.

En el presente documento, también se describe un microorganismo recombinante para producir isobutanol, en el que dicho microorganismo recombinante comprende una vía metabólica que produce isobutanol y en la que dicho microorganismo está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del isobutiraldehído en isobutirato. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza la conversión de isobutiraldehído en isobutirato es una aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, la aldehído deshidrogenasa está codificada por el gen *ALD6* de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo.

En el presente documento, también se describe un microorganismo recombinante para producir isobutanol, en el que dicho microorganismo recombinante comprende una vía metabólica que produce isobutanol y en el que dicho microorganismo está (i) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en DH2MB; e (ii) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del isobutiraldehído en isobutirato. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza la conversión de acetolactato en DH2MB es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR). En una realización específica, la 3-ceto-ácido reductasa está codificada por el gen TMA29 (YMR226C) de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza la conversión de isobutiraldehído en isobutirato es una aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, la aldehído deshidrogenasa está codificada por el gen *ALD6* de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo.

En una realización, la vía metabólica productora de isobutanol comprende al menos un gen exógeno que cataliza una

etapa de la conversión del piruvato en isobutanol. En otra realización, la vía metabólica productora de isobutanol comprende al menos dos genes exógenos que catalizan etapas de la conversión del piruvato en isobutanol. En otra realización más, la vía metabólica productora de isobutanol comprende al menos tres genes exógenos que catalizan etapas de la conversión del piruvato en isobutanol. En otra realización más, la vía metabólica productora de isobutanol comprende al menos cuatro genes exógenos que catalizan etapas de la conversión del piruvato en isobutanol. En otra realización más, la vía metabólica productora de isobutanol comprende cinco genes exógenos que catalizan etapas de la conversión del piruvato en isobutanol.

En una realización, uno o más de los genes de la vía del isobutanol codifican una enzima que se ubica en el citosol. En una realización, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con al menos una enzima de la vía del isobutanol ubicada en el citosol. En otra realización, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con al menos dos enzimas de la vía del isobutanol ubicadas en el citosol. En otra realización más, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con al menos tres enzimas de la vía del isobutanol ubicadas en el citosol. En otra realización más, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con al menos cuatro enzimas de la vía del isobutanol ubicadas en el citosol. En una realización ilustrativa, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con cinco enzimas de la vía del isobutanol ubicadas en el citosol.

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, los genes de la vía del isobutanol codifican una o varias enzimas seleccionadas del grupo que consiste en acetolactato sintasa (ALS), cetol-ácido reductoisomerasa (KARI), dihidroxiácido deshidratasa (DHAD), 2-ceto-ácido descarboxilasa (KIVD) y alcohol deshidrogenasa (ADH).

En otro aspecto descrito en el presente documento, el microorganismo recombinante puede modificarse mediante ingeniería genética para reducir la conversión del isobutanol en isobutiraldehído reduciendo y/o eliminando la expresión de una o más alcohol deshidrogenasas. En una realización específica, la alcohol deshidrogenasa es codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste en *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6* y *ADH7*, y homólogos y variantes de las mismas.

En el presente documento también se describen enzimas alcohol deshidrogenasas (ADH) modificadas que presentan una capacidad mejorada para convertir el isobutiraldehído en isobutanol. En general, las células que expresan estas enzimas ADH mejoradas producirán mayores niveles de isobutanol durante las reacciones de fermentación. Si bien las enzimas ADH modificadas descritas en el presente documento tienen utilidad en las reacciones de fermentación que producen isobutanol, los expertos en la materia que cuenten con la presente divulgación entenderán que las enzimas ADH modificadas también tienen utilidad en las reacciones de fermentación que producen otros alcoholes tales como 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 1-pentanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol.

En el presente documento, se describen alcohol deshidrogenasas (ADH), que se han modificado para potenciar la capacidad de la enzima para convertir el isobutiraldehído en isobutanol. Los ejemplos de dichas ADH incluyen enzimas que tienen una o más mutaciones en las posiciones correspondientes a los aminoácidos seleccionados entre: (a) tirosina 50 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (b) glutamina 77 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (c) valina 108 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (d) tirosina 113 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (e) isoleucina 212 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); y (f) leucina 264 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185), estando AdhA (SEQ ID NO: 185) codificada por el gen *adhA* de la alcohol deshidrogenasa de *L. lactis* (ADH) (SEQ ID NO: 184) o una versión optimizada en codones del mismo (SEQ ID NO: 206).

En una realización, la enzima ADH modificada contiene una mutación en el aminoácido correspondiente a la posición 50 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185). En otra realización, la enzima ADH modificada contiene una mutación en el aminoácido correspondiente a la posición 77 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185). En otra realización más, la enzima ADH modificada contiene una mutación en el aminoácido correspondiente a la posición 108 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185). En otra realización más, la enzima ADH modificada contiene una mutación en el aminoácido correspondiente a la posición 113 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185). En otra realización más, la enzima ADH modificada contiene una mutación en el aminoácido correspondiente a la posición 212 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185). En otra realización más, la enzima ADH modificada contiene una mutación en el aminoácido correspondiente a la posición 264 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185).

En una realización, la enzima ADH contiene dos o más mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas anteriormente. En otra realización, la enzima ADH contiene tres o más mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas anteriormente. En otra realización más, la enzima ADH contiene cuatro o más mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas anteriormente. En otra realización más, la enzima ADH contiene cinco o más mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas anteriormente. En otra realización más, la enzima ADH contiene seis mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas anteriormente.

En una realización específica, la solicitud describe enzimas ADH en las que la tirosina de la posición 50 está reemplazada por un resto de fenilalanina o triptófano. En otra realización específica, la solicitud describe enzimas ADH

en las que la glutamina de la posición 77 está reemplazada por un resto de arginina o serina. En otra realización específica, la solicitud describe enzimas ADH en las que la valina de la posición 108 está reemplazada por un resto de serina o alanina. En otra realización específica, la solicitud describe enzimas ADH en las que la tirosina de la posición 113 está reemplazada por un resto de fenilalanina o glicina. En otra realización específica, la solicitud describe enzimas ADH en las que la isoleucina de la posición 212 está reemplazada por un resto de treonina o valina. En otra realización específica más, la solicitud describe enzimas ADH en las que la leucina de la posición 264 está reemplazada por un resto de valina. En una realización, la enzima ADH contiene dos o más mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas en dichas realizaciones específicas. En otra realización, la enzima ADH contiene tres o más mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas dichas realizaciones específicas. En otra realización más, la enzima ADH contiene cuatro o más mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas dichas realizaciones específicas. En otra realización más, la enzima ADH contiene cinco o más mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas en dichas realizaciones específicas. En otra realización más, la enzima ADH contiene seis mutaciones en los aminoácidos correspondientes a las posiciones descritas dichas realizaciones específicas.

En ciertas realizaciones ilustrativas, la enzima ADH comprende una secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 218, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224, y homólogos o variantes de las mismas que comprenden mutaciones correspondientes en comparación con la enzima de tipo silvestre o parental.

Como se alude en el párrafo anterior, también se describen en el presente documento enzimas ADH, distintas de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185), que contienen alteraciones correspondientes a las establecidas anteriormente. Dichas enzimas ADH pueden incluir, pero sin limitación, las enzimas ADH enumeradas en la Tabla 97.

En algunas realizaciones, las enzimas ADH que se van a modificar son enzimas ADH dependientes de NADH. Los ejemplos de dichas enzimas ADH dependientes de NADH se describen en la publicación de patente de EE.UU n.º 2010/0143997. En algunas realizaciones, los genes que codifican originalmente las enzimas ADH que usan NADPH se modifican para cambiar la preferencia del cofactor de la enzima hacia NADH.

Como se describe en el presente documento, las ADH modificadas, en general, presentarán una capacidad potenciada para convertir el isobutiraldehído en isobutanol en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Preferentemente, la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 5 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 15 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 25 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 50 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 75 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 100 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 200 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 500 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 1000 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 2000 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 3000 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Muy preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 3500 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental.

En el presente documento, también se describen enzimas ADH modificadas que han sido optimizadas en codones para la expresión en ciertos organismos hospedadores deseables, tales como levadura y *E. coli*. En el presente documento, también se describen células hospedadoras recombinantes que comprenden una enzima ADH modificada como se describe en el presente documento. En el presente documento, se describen con más detalle los métodos para usar las enzimas ADH modificadas en cualquier proceso de fermentación, en los que se desea la conversión del isobutiraldehído en isobutanol. En una realización de acuerdo con este aspecto, las enzimas ADH modificadas pueden ser adecuadas para potenciar la capacidad de una célula hospedadora para producir isobutanol. En otra realización de acuerdo con este aspecto, las enzimas ADH modificadas pueden ser adecuadas para potenciar la capacidad de una célula hospedadora para producir 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 1-pentanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol.

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, los microorganismos recombinantes que comprenden una ADH modificada pueden ser modificados por ingeniería genética para que expresen una vía metabólica productora

de isobutanol. En una realización, el microorganismo recombinante puede modificarse por ingeniería genética para expresar una vía metabólica productora de isobutanol que comprenda al menos un gen exógeno. En una realización, el microorganismo recombinante puede modificarse por ingeniería genética para expresar una vía metabólica productora de isobutanol que comprenda al menos dos genes exógenos. En otra realización, el microorganismo recombinante puede modificarse por ingeniería genética para expresar una vía metabólica productora de isobutanol que comprenda al menos tres genes exógenos. En otra realización, el microorganismo recombinante puede modificarse por ingeniería genética para expresar una vía metabólica productora de isobutanol que comprenda al menos cuatro genes exógenos. En otra realización, el microorganismo recombinante puede modificarse por ingeniería genética para expresar una vía metabólica productora de isobutanol que comprenda cinco genes exógenos. Por lo tanto, la presente invención proporciona además microorganismos recombinantes que comprenden una vía metabólica que produce isobutanol y métodos para usar dichos microorganismos recombinantes para producir isobutanol.

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, la/s enzima/s de la vía del isobutanol se selecciona/n entre acetolactato sintasa (ALS), cetol-ácido reductoisomerasa (KARI), dihidroxiácido deshidratasa (DHAD), 2-ceto-ácido descarboxilasa (KIVD) y alcohol deshidrogenasa (ADH).

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, las enzimas de la vía del isobutanol pueden derivarse de un organismo procariota. En realizaciones alternativas descritas en el presente documento, las enzimas de la vía del isobutanol pueden derivarse de un organismo eucariota. Una vía metabólica ilustrativa que convierte el piruvato en isobutanol puede comprender una enzima acetohidroxiácido sintasa (ALS) codificada por, por ejemplo, *alsS* de *B. subtilis*, una cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) codificada por, por ejemplo, *ilvC* de *E. coli*, una dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD), codificada por, por ejemplo, *ilvD* de *L. lactis*, una 2-ceto-ácido descarboxilasa (KIVD) codificada por, por ejemplo, *kivD* de *L. lactis*, y una alcohol deshidrogenasa (ADH) (por ejemplo, una ADH modificada descrita en el presente documento), codificada por, por ejemplo, *adhA* de *L. lactis* con una o más mutaciones en las posiciones Y50, Q77, V108, Y113, 1212 y L264 como se describe en el presente documento.

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos del clado *Saccharomyces*, microorganismos de *Saccharomyces* en sentido estricto, microorganismos de levadura negativos en Crabtree, microorganismos de levadura positivos en Crabtree, microorganismos de levadura post-WGD (duplicación del genoma completo), microorganismos de levadura pre-WGD (duplicación del genoma completo) y microorganismos de levadura no fermentadores.

En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos recombinantes de levadura del clado *Saccharomyces*.

En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos de *Saccharomyces* en sentido estricto. En una realización, los *Saccharomyces* en sentido estricto se selecciona del grupo que consiste en *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. uvarum*, *S. carocanis* y sus híbridos.

En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos de levadura recombinantes Crabtree negativos. En una realización, el microorganismo de levadura Crabtree negativo se clasifica en un género seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Hansenula* o *Candida*. En realizaciones adicionales, el microorganismo de levadura Crabtree negativo se selecciona entre *Saccharomyces kluyveri*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala*, *Pichia stipitis*, *Hansenula anomala*, *Candida utilis* y *Kluyveromyces waltii*.

En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos de levadura recombinantes Crabtree positivos. En una realización, el microorganismo de levadura Crabtree positivo se clasifica en un género seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. En realizaciones adicionales, el microorganismo de levadura Crabtree positivo se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces castellii*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Candida glabrata*, *Z. bailli*, *Z. rouxii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia pastorius*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces uvarum*.

En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos recombinantes de levadura post-WGD (duplicación del genoma completo). En una realización, el microorganismo recombinante de levadura post-WGD se clasifica en un género seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces* o *Candida*. En realizaciones adicionales, la levadura post-WGD se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces castellii* y *Candida glabrata*.

En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos recombinantes de levadura pre-WGD (duplicación del genoma completo). En una realización, el microorganismo recombinante de levadura pre-WGD se clasifica en un género seleccionado del grupo que consiste en *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pachysolen*, *Yarrowia* y *Schizosaccharomyces*. En

realizaciones adicionales, la levadura pre-WGD se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces kluyveri*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces waltii*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida tropicalis*, *Pichia pastoris*, *Pichia anomala*, *Pichia stipitis*, *Issatchenkia orientalis*, *Issatchenkia occidentalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anomala*, *Pachysolen tannophilis*, *Yarrowia lipolytica* y *Schizosaccharomyces pombe*.

En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos que son microorganismos de levadura no fermentadores, incluyendo, pero sin limitación, los clasificados en un género seleccionado del grupo que consiste en *Tricosporon*, *Rhodotorula*, *Myxozyma* o *Candida*. En una realización específica, la levadura no fermentadora es *C. xestobii*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un metabolito beneficioso derivado de un 3-ceto-ácido intermedio usando un microorganismo recombinante como se expone en las reivindicaciones. El método incluye cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono hasta que se produce una cantidad recuperable del metabolito, y recuperar el metabolito. En una realización, el microorganismo produce el metabolito a partir de una fuente de carbono con un rendimiento de al menos aproximadamente el 5 por ciento teórico. En otra realización, el microorganismo produce el metabolito con un rendimiento de al menos aproximadamente el 10 por ciento, al menos aproximadamente el 15 por ciento, al menos aproximadamente el 20 por ciento, al menos aproximadamente el 25 por ciento, al menos aproximadamente el 30 por ciento, al menos aproximadamente el 35 por ciento, al menos aproximadamente el 40 por ciento, al menos aproximadamente el 45 por ciento, al menos aproximadamente el 50 por ciento, al menos aproximadamente el 55 por ciento, al menos aproximadamente el 60 por ciento, al menos aproximadamente el 65 por ciento, al menos aproximadamente el 70 por ciento, al menos aproximadamente el 75 por ciento, al menos aproximadamente el 80 por ciento, al menos aproximadamente el 85 por ciento, al menos aproximadamente el 90 por ciento, al menos aproximadamente el 95 por ciento o al menos aproximadamente el 97,5 por ciento teórico. El metabolito se deriva de una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido como producto intermedio. En una realización, el 3-ceto-ácido intermedio es acetolactato. Por consiguiente, el metabolito se puede derivar de una vía biosintética que usa acetolactato como producto intermedio, incluyendo, pero sin limitación, isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol y coenzima A. En otra realización, el 3-ceto-ácido intermedio es 2-aceto-2-hidroxiacetato. Por consiguiente, el metabolito puede derivarse de una vía biosintética que usa 2-aceto-2-hidroxiacetato como producto intermedio, incluyendo, pero sin limitación, 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol. En otra realización más, el metabolito se puede derivar de una vía biosintética que usa acetolactato y un aldehído como productos intermedios, incluyendo, pero sin limitación, las vías biosintéticas del isobutanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol. En otra realización más, el metabolito puede derivarse de una vía biosintética que usa 2-aceto-2-hidroxiacetato y un aldehído como productos intermedios, incluyendo, pero sin limitación, las vías biosintéticas del 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

En una realización, el microorganismo recombinante se cultiva en condiciones aeróbicas. En otra realización, el microorganismo recombinante se cultiva en condiciones microaeróbicas. En otra realización más, el microorganismo recombinante se cultiva en condiciones anaeróbicas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra una realización ilustrativa de una vía de isobutanol.

La Figura 2 ilustra reacciones ilustrativas capaces de ser catalizadas por 3-ceto-ácido reductasas.

La Figura 3 ilustra una lista no limitante de 3-ceto-ácido reductasas y sus correspondientes números de clasificación enzimática.

La Figura 4 ilustra reacciones ilustrativas capaces de ser catalizadas por aldehído deshidrogenasas.

La Figura 5 ilustra una estrategia para reducir la producción de DH2MB e isobutirato en microorganismos recombinantes productores de isobutanol.

La Figura 6 ilustra una estrategia para reducir la producción de DH2MB y 3-metil-1-butirato en microorganismos recombinantes productores de 3-metil-1-butanol.

La Figura 7 ilustra una estrategia para reducir la producción de 2-etil-2,3-dihidroxiacetato y 2-metil-1-butirato en microorganismos recombinantes productores de 2-metil-1-butanol.

La Figura 8 ilustra una superposición apilada de cromatogramas LC4 que presenta una muestra que contiene DH2MB y acetato (parte superior) y una muestra que contiene acetato y DHIV (parte inferior). Orden de elución: DH2MB seguido de acetato (parte superior); lactato, acetato, DHIV, isobutirato, piruvato (parte inferior).

La Figura 9 ilustra un cromatograma para la fracción de muestra recogida en el tiempo de retención correspondiente al DHIV recogido en LC1 y analizado mediante LC4 en una columna AS-11 con detección de conductividad.

La Figura 10 ilustra un espectro de COSY de ^1H del máximo aislado de LC1. El espectro indica que los protones de metilo de DH2MB (doblete) a 0,95 ppm se acoplan al protón de metino (cuarteto) a 3,7 ppm.

La Figura 11 ilustra un espectro de RMN de ^1H del máximo aislado de LC1. El espectro indica la presencia de DH2MB: un singlete de protones de metilo (a) a 1,2 ppm con valor integral de 3, un doblete de protones de metilo (b) a 0,95 ppm con valor integral de 3 y un cuarteto de protón de metino (c) a 3,7 ppm con valor integral de 1,84. El valor integral del protón de metino (c) es superior a 1 debido a la superposición con la resonancia de la glucosa

en la misma región.

La Figura 12 ilustra un análisis de LC-MS del máximo aislado de LC1. Se identificaron varios iones moleculares en la muestra como se indica en la parte superior de la figura. La fragmentación adicional (MS2) de 134 iones moleculares indicó que la fracción de LC1 aislada contiene ácido hidroxilcarboxílico por la pérdida característica

de CO₂ (*) y H₂O + CO₂ (**).

La Figura 13 ilustra las estructuras diastereoméricas y enantioméricas del ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (2*R*, 3*S*)-1a, (2*S*,3*R*)-1b, (2*R*,3*R*)-2a, (2*S*,3*S*)-2b.

La Figura 14 ilustra el espectro de ¹H de DH2MB cristalizado en D₂O. RMN de ¹H (TSP) 1,1 (d, 6,5 Hz, 3H), 1,3 (s, 3H), 3,9 (c, 6,5 Hz, 3H).

La Figura 15 ilustra el espectro de ¹³C de DH2MB cristalizado en D₂O. El espectro indica cinco resonancias de carbono diferentes, siendo una de ellas la resonancia del ácido carboxílico característica a 181 ppm.

La Figura 16 ilustra el perfil de fermentación del isobutanol y los subproductos de una sola fermentación con GEVO3160. La aireación de la producción se redujo de una OTR de 0,8 mM/h a 0,3 mM/h a las 93 h posteriores a la inoculación. Diamante abierto = iBuOH, cuadrado = desconocido cuantificado como DH2MB, asterisco = peso seco celular (psc) y triángulo cerrado = subproductos totales.

La Figura 17 ilustra una alineación estructural de la secuencia de aminoácidos de AdhA de *L. lactis* con la estructura de *G. stearothermophilus* (Pymol). Se muestran las mutaciones del sitio activo (Y50F y L264V). También se muestran las mutaciones en el dominio de unión al cofactor (I212T y N219Y).

La Figura 18 ilustra vías biosintéticas que usan acetolactato como producto intermedio. Las vías biosintéticas para la producción de 1-butanol, isobutanol, 3-metil-1-butanol y 4-metil-1-pentanol usan tanto acetolactato como un aldehído como productos intermedios.

La Figura 19 ilustra las vías biosintéticas que usan 2-aceto-2-hidroxi-2-butanato como producto intermedio. Las vías biosintéticas para la producción de 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol usan tanto 2-aceto-2-hidroxi-2-butanato como un aldehído como producto intermedio.

La Figura 20 ilustra vías biosintéticas adicionales que usan un aldehído como producto intermedio.

Descripción detallada

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", "una", y "el" o "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un polinucleótido" incluye una pluralidad de dichos polinucleótidos y la referencia a "el microorganismo" incluye la referencia a uno o más microorganismos, y así sucesivamente.

Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de los métodos y las composiciones que se desvelan, en el presente documento, se describen los métodos, dispositivos y materiales ilustrativos.

Todas las publicaciones mencionadas anteriormente y en todo el texto se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. No debe interpretarse que nada en el presente documento sea un reconocimiento de que los inventores no tengan derecho a antedatar dicha divulgación en virtud de una divulgación anterior.

El término "microorganismo" incluye especies microbianas procariotas y eucariotas de los dominios *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya*, este último incluye levadura y hongos filamentosos, protozoos, algas o protistas superiores. Las expresiones "células microbianas" y "microbios" se usan indistintamente con el término microorganismo.

El término "género" se define como un grupo taxonómico de especies relacionadas de acuerdo con el Esquema taxonómico de bacterias y arqueas (Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J. y Tindall, B. J. (2007) "The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea". TOBA Versión 7.7, marzo de 2007. Michigan State University Board of Trustees. [<http://www.taxonomicoutline.org/>]).

El término "especie" se define como una colección de organismos estrechamente relacionados con más del 97 % de homología de la secuencia del ARN ribosomal 16S y con más del 70 % de hibridación genómica, y lo suficientemente diferentes de todos los demás organismos para ser reconocidos como una unidad distinta.

Las expresiones "microorganismo recombinante", "microorganismo modificado" y "célula hospedadora recombinante" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a microorganismos que han sido modificados genéticamente para expresar o sobreexpresar polinucleótidos endógenos, para expresar polinucleótidos heterólogos, como los incluidos en un vector, en una construcción de integración, o que tienen una alteración en la expresión de un gen endógeno. Por "alteración" se entiende que la expresión del gen, o el nivel de una molécula de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican uno o más polipéptidos o subunidades polipeptídicas, o la actividad de uno o más polipéptidos o subunidades polipeptídicas están regulados al alza o regulada a la baja, de modo que la expresión, el nivel o la actividad sea superior o inferior a la observada en ausencia de la alteración. Por ejemplo, el término "alterar" puede significar "inhibir", pero el uso del término "alterar" no se limita a esta definición.

El término "expresión" con respecto a una secuencia génica se refiere a la transcripción del gen y, según sea apropiado, a la traducción de la transcripción del ARNm resultante a una proteína. Por lo tanto, como será evidente según el contexto, la expresión de una proteína resulta de la transcripción y traducción de la secuencia de marco abierto de lectura. El nivel de expresión de un producto deseado en una célula hospedadora puede determinarse basándose en la cantidad de ARNm correspondiente que está presente en la célula o en la cantidad del producto deseado codificado por la secuencia seleccionada. Por ejemplo, el ARNm transcrito a partir de una secuencia seleccionada puede cuantificarse mediante qRT-PCR o mediante hibridación Northern (véase Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). La proteína codificada por una secuencia seleccionada se puede cuantificar mediante diversos métodos, por ejemplo, mediante ELISA, analizando la actividad biológica de la proteína, o empleando ensayos que son independientes de dicha actividad, tales como de transferencia Western o radioinmunoensayo, usando anticuerpos que reconocen y se unen a la proteína. Véase Sambrook *et al.*, 1989, *supra*. El polinucleótido, en general, codifica una enzima diana que participa en una vía metabólica para producir un metabolito deseado. Se entiende que las expresiones "microorganismo recombinante" y "célula hospedadora recombinante" se refieren no solo al microorganismo recombinante en particular, sino a la progenie o posible progenie de dicho microorganismo. Debido a que pueden producirse determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluyen dentro del alcance de la expresión como se usa en el presente documento.

El término "sobreexpresión" se refiere a un nivel elevado (por ejemplo, nivel aberrante) de los ARNm que codifican una o varias proteínas (por ejemplo, una proteína TMA29 u homólogo de la misma), y/o a niveles elevados de proteína/s (por ejemplo, TMA29) en células en comparación con células no modificadas correspondientes similares que expresan niveles basales de ARNm (por ejemplo, aquellos que codifican proteínas Aft) o que tienen niveles basales de proteínas. En realizaciones particulares, TMA29, u homólogos de la misma, se pueden sobreexpresar al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, 12 veces, 15 veces o más en microorganismos modificados mediante ingeniería genética para mostrar un aumento del ARNm, proteína y/o actividad de TMA29.

Como se usa en el presente documento y como entenderá un experto en la materia, "actividad y/o expresión reducidas" de una proteína tal como una enzima puede significar una actividad catalítica específica reducida de la proteína (por ejemplo, actividad reducida) y/o concentraciones reducidas de la proteína en la célula (por ejemplo, expresión reducida), mientras que "actividad y/o expresión delecionadas" o "actividad y/o expresión eliminadas" de una proteína tal como una enzima puede significar actividad catalítica específica no significativa o irrelevante de la enzima (por ejemplo, actividad eliminada) y/o concentraciones no significativas o irrelevantes de la enzima en la célula (por ejemplo, expresión eliminada).

La expresión "microorganismo de tipo silvestre" describe una célula que se da en la naturaleza, es decir, una célula que no ha sido modificada genéticamente. Un microorganismo de tipo silvestre puede modificarse genéticamente para expresar o sobreexpresar una primera enzima diana. Este microorganismo puede actuar como un microorganismo parental en la generación de un microorganismo modificado para expresar o sobreexpresar una segunda enzima diana. A su vez, el microorganismo modificado para expresar o sobreexpresar una primera y una segunda enzima diana se puede modificar para expresar o sobreexpresar una tercera enzima diana.

Por consiguiente, un "microorganismo parental" funciona como una célula de referencia para sucesivas modificaciones genéticas. Cada modificación se puede realizar introduciendo una molécula de ácido nucleico en la célula de referencia. La introducción facilita la expresión o sobreexpresión de una enzima diana. Se entiende que el término "facilita" abarca la activación de polinucleótidos endógenos que codifican una enzima diana mediante la modificación genética de, por ejemplo, una secuencia promotora en un microorganismo parental. Además, se entiende que el término "facilita" abarca la introducción de polinucleótidos heterólogos que codifican una enzima diana en un microorganismo parental.

El término "modificar mediante ingeniería genética" se refiere a cualquier manipulación de un microorganismo que produzca un cambio detectable en el microorganismo, en el que la manipulación incluye, pero sin limitación, insertar un polinucleótido y/o polipéptido heterólogo en el microorganismo y mutar un polinucleótido y/o polipéptido nativo del microorganismo.

El término "mutación" como se usa en el presente documento indica cualquier modificación de un ácido nucleico y/o polipéptido que das lugar a un ácido nucleico o polipéptido alterado. Las mutaciones incluyen, por ejemplo, mutaciones puntuales, eliminaciones o inserciones de uno o varios restos en un polinucleótido, lo que incluye alteraciones que surgen dentro de una región codificante de proteínas de un gen, así como alteraciones en regiones fuera de una secuencia codificante de proteínas, tales como, pero sin limitación, secuencias reguladoras o promotoras. Una alteración genética puede ser una mutación de cualquier tipo. Por ejemplo, la mutación puede constituir una mutación puntual, una mutación de marco de lectura, una mutación sin sentido, una inserción o una deleción de parte o la totalidad de un gen. Además, en algunas realizaciones del microorganismo modificado, una parte del genoma del microorganismo ha sido reemplazada por un polinucleótido heterólogo. En algunas realizaciones, las mutaciones son naturales. En otras realizaciones, Las mutaciones se identifican y/o se enriquecen a través de la presión de la selección

artificial. En otras realizaciones más, Las mutaciones en el genoma de los microorganismos son el resultado de la modificación mediante ingeniería genética.

La expresión "vía biosintética", también conocida como "vía metabólica", se refiere a un conjunto de reacciones bioquímicas anabólicas o catabólicas para convertir una especie química en otra. Los productos genéticos pertenecen a la misma "vía metabólica" si, en paralelo o en serie, actúan sobre el mismo sustrato, producen el mismo producto, o actúan o producen un producto intermedio metabólico (es decir, un metabolito) entre el mismo sustrato y el producto final del metabolito.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vía metabólica productora de isobutanol" se refiere a una vía enzimática que produce isobutanol a partir de piruvato.

El término "heterólogo", como se usa en el presente documento, con referencia a moléculas y, en particular, a enzimas y polinucleótidos, indica moléculas que se expresan en un organismo distinto al organismo del que se originaron o se encuentran en la naturaleza, Independientemente del nivel de expresión que puede ser inferior, igual o superior al nivel de expresión de la molécula en el microorganismo nativo.

Por otro lado, el término "nativo" o "endógeno", como se usa en el presente documento haciendo referencia a moléculas y, en particular, a enzimas y polinucleótidos, indica moléculas que se expresan en el organismo en el que se originaron o se encuentran en la naturaleza, independientemente del nivel de expresión que puede ser inferior o igual al nivel de expresión de la molécula en el microorganismo nativo. Se entiende que la expresión de polinucleótidos o enzimas nativas puede estar modificada en los microorganismos recombinantes.

La expresión "materias primas" se define como una materia de partida o mezcla de materias de partida suministradas a un microorganismo o proceso de fermentación a partir de la que se pueden fabricar otros productos. Por ejemplo, una fuente de carbono, tal como la biomasa o los compuestos de carbono derivados de la biomasa son una materia prima para un microorganismo que produce un biocombustible en un proceso de fermentación. Sin embargo, una materia prima puede contener nutrientes distintos de una fuente de carbono.

El término "sustrato" o la expresión "sustrato adecuado" se refieren a cualquier sustancia o compuesto que se convierte o pretende convertirse en otro compuesto por la acción de una enzima. El término incluye no solo un único compuesto, sino también combinaciones de compuestos, tales como soluciones, mezclas y otros materiales que contienen al menos un sustrato, o derivados de los mismos. Además, el término "sustrato" abarca no solo los compuestos que proporcionan una fuente de carbono adecuada para su uso como material de partida, tal como cualquier azúcar derivado de la biomasa, sino también los metabolitos de productos intermedios y finales usados en una vía asociada con un microorganismo recombinante como se describe en el presente documento.

La expresión "compuesto C2", como se usa como fuente de carbono para los microorganismos de levadura modificados genéticamente con mutaciones en todos los genes de la piruvato descarboxilasa (PDC), dando lugar a una reducción de la actividad de la piruvato descarboxilasa de dichos genes, se refiere a los compuestos orgánicos que se componen de dos átomos de carbono, incluyendo, pero sin limitación, etanol y acetato.

El término "fermentación" o la expresión "proceso de fermentación" se definen como un proceso en el que un microorganismo se cultiva en un medio de cultivo que contiene materias de partida, tales como materias primas y nutrientes, en el que el microorganismo convierte las materias de partida, tales como las materias primas, en productos.

Las expresiones "productividad volumétrica" o "tasa de producción" se definen como la cantidad de producto formado por volumen de medio por unidad de tiempo. La productividad volumétrica se presenta en gramos por litro por hora (g/l/h).

Las expresiones "productividad específica" o "tasa de producción específica" se definen como la cantidad de producto formado por volumen de medio por unidad de tiempo por cantidad de células. La productividad específica se presenta en gramos o miligramos por litro por hora por DO (g/l/h/DO).

El término "rendimiento" se define como la cantidad de producto obtenido por unidad de peso de materia prima, y se puede expresar como g DE producto por g de sustrato (g/g). El rendimiento puede expresarse como un porcentaje del rendimiento teórico. El "rendimiento teórico" se define como la cantidad máxima de producto que se puede generar por una cantidad determinada de sustrato según lo determinado por la estequiometría de la vía metabólica usada para la fabricación del producto. Por ejemplo, El rendimiento teórico para una conversión típica de glucosa en isobutanol es de 0,41 g/g. Como tal, un rendimiento de isobutanol a partir de glucosa de 0,39 g/g se expresaría como el 95 % del rendimiento teórico o el 95 % del rendimiento teórico.

El término "título" se define como la dosificación de una solución o la concentración de una sustancia en solución. Por ejemplo, el título de un biocombustible en un caldo de fermentación se describe como los g de biocombustible en solución por litro de caldo de fermentación (g/l).

Las "condiciones aeróbicas" se definen como las condiciones en las que la concentración de oxígeno en el medio de fermentación es lo suficientemente alta como para que un microorganismo aeróbico o anaeróbico facultativo lo use como un aceptor de electrones terminal.

5 Por el contrario, las "condiciones anaeróbicas" se definen como las condiciones en las que la concentración de oxígeno en el medio de fermentación es demasiado baja como para que el microorganismo lo use como un aceptor de electrones terminal. Las condiciones anaeróbicas pueden lograrse rociando un medio de fermentación con un gas inerte tal como nitrógeno hasta que no quede oxígeno disponible para el microorganismo como un aceptor de electrones terminal. Como alternativa, las condiciones anaeróbicas se pueden lograr si el microorganismo consume el oxígeno disponible de la fermentación hasta que el microorganismo no está disponible como un aceptor de electrones terminal. Los métodos para la producción de isobutanol en condiciones anaeróbicas se describen en publicaciones del mismo solicitante en trámite junto con la presente, documento US 2010/0143997.

15 "Metabolismo aeróbico" se refiere a un proceso bioquímico en el que el oxígeno se usa como un aceptor terminal de electrones para generar energía, normalmente, en la forma de ATP, a partir de hidratos de carbono. El metabolismo aeróbico ocurre, por ejemplo, a través de la glucólisis y el ciclo de TCA, en el que una sola molécula de glucosa se metaboliza completamente en dióxido de carbono en presencia de oxígeno.

20 Por el contrario, el "metabolismo anaeróbico" se refiere a un proceso bioquímico en el que el oxígeno no es el aceptor final de los electrones contenidos en la NADH. El metabolismo anaeróbico se puede dividir en la respiración anaeróbica, en la que los compuestos distintos del oxígeno sirven como aceptor de electrones terminales, y la fosforilación a nivel de sustrato, en la que los electrones de NADH se utilizan para generar un producto reducido a través de una "vía de fermentación".

25 En las "vías de fermentación", la NAD(P)H dona sus electrones a una molécula producida por la misma vía metabólica que produjo los electrones transportados en la NAD(P)H. Por ejemplo, en una de las vías de fermentación de ciertas cepas de levadura, la NAD(P)H generada a través de la glucólisis transfiere sus electrones al piruvato, produciendo etanol. Las vías de fermentación suelen ser activas en condiciones anaeróbicas, pero también pueden darse en condiciones aeróbicas, en condiciones en las que la NADH no se oxida completamente a través de la cadena respiratoria. Por ejemplo, por encima de ciertas concentraciones de glucosa, las levaduras Crabtree positivas producen grandes cantidades de etanol en condiciones aeróbicas.

30 El término "subproducto" o "sub-producto" significa un producto no deseado relacionado con la producción de un aminoácido, precursor de aminoácidos, producto químico, precursor químico, Biocombustible o precursor de biocombustible.

35 La expresión "sustancialmente libre" cuando se usa en referencia a la presencia o ausencia de actividades enzimáticas (3-KAR, ALDH, PDC, GPD, etc.) en las vías de carbono que compiten con la vía metabólica deseada (por ejemplo, una vía metabólica productora de isobutanol) significa que el nivel de la enzima es sustancialmente menor que el de la misma enzima en el hospedador de tipo silvestre, en el que se prefiere menos de aproximadamente el 50 % del nivel de tipo silvestre y se prefiere más de aproximadamente el 30 %. La actividad puede ser inferior a aproximadamente el 20 %, inferior a aproximadamente el 10 %, inferior a aproximadamente el 5 % o inferior a aproximadamente el 1 % de la actividad de tipo silvestre. Los microorganismos que están "sustancialmente libres" de una determinada actividad enzimática (3-KAR, ALDH, PDC, GPD, etc.) pueden crearse mediante medios recombinantes o identificados en la naturaleza.

40 La expresión "levadura no fermentadora" es una especie de levadura que no logra demostrar un metabolismo anaeróbico en el que los electrones de NADH se utilizan para generar un producto reducido a través de una vía de fermentación tal como la producción de etanol y CO₂ a partir de glucosa. La levadura no fermentativa puede identificarse mediante la "Prueba de la sonda de Durham" (J. A. Barnett, R.W. Payne y D. Yarrow. 2000. "Yeasts Characteristics and Identification". 3ª edición. pág. 28-29. Cambridge University Press, Cambridge, RU) o mediante el control de la producción de producciones de fermentación tales como el etanol y el CO₂.

55 El término "polinucleótido" se usa en el presente documento indistintamente con la expresión "ácido nucleico", y se refiere a un polímero orgánico compuesto de dos o más monómeros que incluyen nucleótidos, nucleósidos o análogos de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, ácido desoxirribonucleico (ADN) codificante o no codificante, monocatenario o bicatenario, de cualquier longitud y, cuando sea adecuado, ácido ribonucleico (ARN) codificante o no codificante, monocatenario o bicatenario, de cualquier longitud, incluyendo ARNip. El término "nucleótido" se refiere a cualquiera de varios compuestos que consisten en un azúcar ribosa o desoxirribosa unido a una base de purina o pirimidina y un grupo fosfato, y que son las unidades estructurales básicas de los ácidos nucleicos. El término "nucleósido" se refiere a un compuesto (como guanosina o adenosina) que consiste en una base de purina o pirimidina combinada con desoxirribosa o ribosa, y se encuentra especialmente en los ácidos nucleicos. la expresión "análogo de nucleótido" o "análogo de nucleósido" se refiere, respectivamente, a un nucleótido o nucleósido en el que uno o más átomos individuales han sido reemplazados por un átomo diferente o por un grupo funcional diferente. Por consiguiente, el término polinucleótido incluye ácidos nucleicos de cualquier longitud, ADN, ARN, análogos y

fragmentos de los mismos. Un polinucleótido de tres o más nucleótidos también se denomina oligómero nucleotídico u oligonucleótido.

Se entiende que los polinucleótidos descritos en el presente documento incluyen "genes" y que las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento incluyen "vectores" o "plásmidos". Por consiguiente, el término "gen", también denominado "gen estructural" se refiere a un polinucleótido que codifica una determinada secuencia de aminoácidos, que comprenden la totalidad o parte de una o más proteínas o enzimas, y puede incluir secuencias de ADN reguladoras (no transcritas), tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones en las que se expresa el gen. La región transcrita del gen puede incluir regiones no traducidas, incluyendo intrones, región no traducida en 5' (UTR), y UTR 3', así como la secuencia codificante.

El término "operón" se refiere a dos o más genes que se transcriben como una sola unidad de transcripción de un promotor común. En algunas realizaciones, los genes que comprenden el operón son genes contiguos. Se entiende que la transcripción de un operón completo puede modificarse (es decir, aumentarse, reducirse o deeleccionarse) modificando el promotor común. Como alternativa, se puede modificar cualquier gen o combinación de genes de un operón para alterar la función o actividad del polipéptido codificado. La modificación puede producir un aumento en la actividad del polipéptido codificado. Además, la modificación puede conferir nuevas actividades al polipéptido codificado. Las nuevas actividades ilustrativas incluyen el uso de sustratos alternativos y/o la capacidad de funcionar en condiciones ambientales alternativas.

Un "vector" es cualquier medio mediante el que un ácido nucleico puede propagarse y/o transferirse entre organismos, células o componentes celulares. Los vectores incluyen virus, bacteriófago, provirus, plásmidos, fagémidos, transposones y cromosomas artificiales tales como los YAC (cromosomas artificiales de levadura), BAC (cromosomas bacterianos artificiales) y PLAC (cromosomas artificiales de plantas) y similares, que son "episomas", es decir, que se replican de forma autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto de ADN como de ARN dentro de la misma cadena, un ADN o ARN conjugado con poli-lisina, un ADN o ARN conjugado con péptidos, un ADN conjugado con liposomas, o similar, que no son de naturaleza episomal, o puede ser un organismo que comprenda una o más de las construcciones polinucleotídicas anteriores, tales como una agrobacteria o una bacteria.

"Transformación" se refiere al proceso mediante el que un vector se introduce en una célula hospedadora. La transformación (o transducción, o transfección), se puede realizar mediante cualquiera de varios medios, incluyendo la transformación química (por ejemplo, la transformación con acetato de litio), electroporación, microinyección, biolística (o liberación mediada por bombardeo de partículas) o transformación mediada por agrobacterias.

El término "enzima", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que cataliza o promueve una o más reacciones químicas o bioquímicas, que, en general, incluye enzimas total o parcialmente compuestas de un polipéptido, pero puede incluir enzimas compuestas de una molécula diferente que incluye polinucleótidos.

El término "proteína", "péptido" o "polipéptido", como se usa en el presente documento, indica un polímero orgánico compuesto por dos o más monómeros de aminoácidos y/o análogos de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" o la expresión "monómero de aminoácido" se refiere a cualquier aminoácido natural y/o sintético, incluyendo la glicina y los isómeros ópticos tanto D como L. La expresión "análogo de aminoácido" se refiere a un aminoácido en el que uno o más átomos individuales han sido reemplazados, ya sea por un átomo diferente o por un grupo funcional diferente. Por consiguiente, el término polipéptido incluye un polímero de aminoácido de cualquier longitud que incluye proteínas y péptidos de longitud completa, así como análogos y fragmentos de los mismos. Un polipéptido de tres o más aminoácidos también se denomina oligómero u oligopéptido.

El término "homólogo" usado con respecto a una enzima o un gen original de una primera familia o especie, se refiere a distintas enzimas o genes de una segunda familia o especie que se determinan mediante análisis funcionales, estructurales o genómicos como una enzima o un gen de la segunda familia o especie que corresponde a la enzima o al gen original de la primera familia o especie. Muy a menudo, Los homólogos tendrán similitudes funcionales, estructurales o genómicas. Se conocen técnicas mediante las que los homólogos de una enzima o de un gen pueden clonarse fácilmente usando sondas genéticas y PCR. La identidad de las secuencias clonadas como homólogas se puede confirmar mediante ensayos funcionales y/o mediante la cartografía genómica de los genes.

Una proteína tiene "homología" o es "homóloga" a una segunda proteína si la secuencia de aminoácidos codificada por un gen tiene una secuencia de aminoácidos similar a la del segundo gen. Como alternativa, una proteína tiene homología con una segunda proteína si las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos "similares". (Por lo tanto, la expresión "proteínas homólogas" se define para significar que las dos proteínas tienen secuencias de aminoácidos similares).

El término "análogo" se refiere a las secuencias de ácidos nucleicos o de proteínas o estructuras de proteínas que están relacionadas entre sí solamente en la función, y no son de ascendencia común o no comparten una secuencia ancestral común. Los análogos pueden diferir en la secuencia, pero pueden compartir una estructura similar, debido

a la evolución convergente. Por ejemplo, dos enzimas son análogas si las enzimas catalizan la misma reacción de conversión de un sustrato a un producto, y no están relacionadas en la secuencia, independientemente de si las dos enzimas están relacionadas en su estructura.

5 Microorganismos recombinantes con acumulación reducida de subproductos

Las células de levadura convierten los azúcares para producir piruvato, que luego se utiliza en una serie de vías del metabolismo celular. En los últimos años, las células de levadura han sido modificadas mediante ingeniería genética para producir una serie de productos deseados a través de vías biosintéticas impulsadas por piruvato. En muchas de estas vías biosintéticas, la etapa de la vía inicial es la conversión del piruvato endógeno en un 3-ceto-ácido.

Como se usa en el presente documento, un "3-ceto-ácido" se refiere a un compuesto orgánico que contiene una fracción de ácido carboxílico en el átomo de carbono C1 y una fracción de cetona en el átomo de carbono C3. Por ejemplo, el acetolactato y el ácido 2-hidroxil-2-metil-3-oxobutanoico son 3-cetoácidos con un grupo cetona en el átomo de carbono C3 (véase, por ejemplo, la Figura 2).

Un ejemplo de un 3-ceto-ácido que es común a muchas vías biosintéticas es el acetolactato, que se forma a partir del piruvato por la acción de la enzima acetolactato sintasa (también conocida como acetohidroxiácido sintasa). Entre las vías biosintéticas que usan el acetolactato como producto intermedio se incluyen las vías para la producción de isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol y coenzima A. Las vías biosintéticas modificadas por ingeniería genética para la síntesis de estos metabolitos beneficiosos derivados del acetolactato se encuentran en la Tabla 1 y la Figura 18.

25 **Tabla 1.** Vías biosintéticas que utilizan el acetolactato como producto intermedio

Vía biosintética	Referencia
Isobutanol	Documento US 2009/0226991 (Feldman <i>et al.</i>), Documento US 2011/0020889 (Feldman <i>et al.</i>) y documento US 2010/0143997 (Buelter <i>et al.</i>)
1-Butanol	Documento WO/2010/017230 (Lynch), documento WO/2010/031772 (Wu <i>et al.</i>) y documento KR2011002130 (Lee <i>et al.</i>)
2-Butanol	Documento WO/2007/130518 (Donaldson <i>et al.</i>), Documento WO/2007/130521 (Donaldson <i>et al.</i>) y documento WO/ 2009/134276 (Donaldson <i>et al.</i>)
2-Butanona	Documento WO/2007/130518 (Donaldson <i>et al.</i>), Documento WO/2007/130521 (Donaldson <i>et al.</i>) y documento WO/ 2009/134276 (Donaldson <i>et al.</i>)
2-3-Butanodiol	Documento WO/2007/130518 (Donaldson <i>et al.</i>), Documento WO/2007/130521 (Donaldson <i>et al.</i>) y documento WO/ 2009/134276 (Donaldson <i>et al.</i>)
Acetoina	Documento WO/2007/130518 (Donaldson <i>et al.</i>), Documento WO/2007/130521 (Donaldson <i>et al.</i>) y documento WO/ 2009/134276 (Donaldson <i>et al.</i>)
Diacetilo	Gonzalez <i>et al.</i> , 2000, <i>J. Biol. Chem</i> 275: 35876-85 y Ehsani <i>et al.</i> , 2009, <i>App. Environ. Micro.</i> 75: 3196-205
Valina	Documento WO/2001/021772 (Yocum <i>et al.</i>) y McCourt <i>et al.</i> , 2006, "Amino Acids" 31: 173-210
Leucina	Documento WO/2001/021772 (Yocum <i>et al.</i>) y McCourt <i>et al.</i> , 2006, "Amino Acids" 31: 173-210
Ácido pantoténico	Documento WO/2001/021772 (Yocum <i>et al.</i>)
3-Metil-1-Butanol	Documento WO/2008/098227 (Liao <i>et al.</i>), Atsumi <i>et al.</i> , 2008, <i>Nature</i> 451: 86-89, y Connor <i>et al.</i> , 2008, <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 74: 5769-5775
4-Metil-1-pentanol	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105: 20653-20658
Coenzima A	Documento WO/2001/021772 (Yocum <i>et al.</i>)

Cada una de las vías biosintéticas enumeradas en la Tabla 1 comparte el 3-ceto-ácido intermedio común, acetolactato. Por lo tanto, el rendimiento del producto a partir de estas vías biosintéticas dependerá en parte de la cantidad de acetolactato que esté disponible para las enzimas dirección 3' de dichas vías biosintéticas.

Otro ejemplo de un 3-ceto-ácido que es común a muchas vías biosintéticas es el 2-aceto-2-hidroxi-3-butanona, que se

forma a partir del piruvato y del 2-cetobutirato por la acción de la enzima acetolactato sintasa (también conocida como acetohidroxiácido sintasa). Entre las vías biosintéticas que usan el 2-aceto-2-hidroxi-butirato como producto intermedio se incluyen las vías para la producción de 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol. Las vías biosintéticas modificadas por ingeniería genética para la síntesis de estos metabolitos

5 beneficiosos derivados del 2-aceto-2-hidroxi-butirato se encuentran en la Tabla 2 y la Figura 19.

Tabla 2. Vías biosintéticas que utilizan el 2-aceto-2-hidroxi-butirato como producto intermedio

Vía biosintética	Referencia
2-Metil-1-butanol	Documento WO/2008/098227 (Liao <i>et al.</i>), Documento WO/2009/076480 (Picataggio <i>et al.</i>) y Atsumi <i>et al.</i> , 2008, <i>Nature</i> 451: 86-89
Isoleucina	McCourt <i>et al.</i> , 2006, "Amino Acids" 31: 173-210
3-Metil-1-pentanol	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658
4-Metil-1-hexanol	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658
5-Metil-1-Heptanol	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658

10 Cada una de las vías biosintéticas enumeradas en la Tabla 2 comparte el 3-ceto-ácido intermedio común, 2-aceto-2-hidroxi-butirato. Por lo tanto, el rendimiento del producto a partir de estas vías biosintéticas dependerá en parte de la cantidad de acetolactato que esté disponible para las enzimas dirección 3' de dichas vías biosintéticas.

15 Análogamente, las células de levadura pueden modificarse por ingeniería genética para producir una serie de productos deseados a través de vías biosintéticas que utilizan un aldehído como producto intermedio de la vía. Las vías biosintéticas modificadas por ingeniería genética que comprenden un aldehído intermedio incluyen vías biosintéticas para la producción de isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-propanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-Metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol (véanse la Tabla 3 y las Figuras 18, 19 y 20).

20 **Tabla 3.** Vías biosintéticas que utilizan aldehído como producto intermedio

Vía biosintética	Aldehído intermedio	Referencia
Isobutanol	Isobutirilaldehído	Documento US 2009/0226991 (Feldman <i>et al.</i>), Documento US 2011/0020889 (Feldman <i>et al.</i>) y documento US 2010/0143997 (Buelter <i>et al.</i>)
1-Butanol	1-Butanal	Documento WO/2010/017230 (Lynch), Documento WO/2010/031772 (Wu <i>et al.</i>), Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Documento WO/2007/041269 (Donaldson <i>et al.</i>), Documento WO/2008/052991 (Raamsdonk <i>et al.</i>), Documento WO/2008/143704 (Buelter <i>et al.</i>) y documento WO/2008/080124 (Gunawardena <i>et al.</i>)
2-Metil-1-butanol	2-Metil-1-butanal	Documento WO/2008/098227 (Liao <i>et al.</i>), Documento WO/2009/076480 (Picataggio <i>et al.</i>) y Atsumi <i>et al.</i> , 2008, <i>Nature</i> 451: 86-89
3-Metil-1-Butanol	3-Metil-1-Butanal	Documento WO/2008/098227 (Liao <i>et al.</i>), Atsumi <i>et al.</i> , 2008, <i>Nature</i> 451: 86-89, y Connor <i>et al.</i> , 2008, <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 74: 5769-5775
1-Propanol	1-Propanal	Documento WO/2008/098227 (Liao <i>et al.</i>)
1-Pentanol	1-Pentanal	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658
1-Hexanol	1-Hexanal	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658
3-Metil-1-pentanol	3-Metil-1-pentanal	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658

(continuación)

Vía biosintética	Aldehído intermedio	Referencia
4-Metil-1-pentanol	4-Metil-1-pentanal	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658
4-Metil-1-hexanol	4-Metil-1-Hexanal	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658
5-Metil-1-Heptanol	5-Metil-1-Heptanal	Documento WO/2010/045629 (Liao <i>et al.</i>), Zhang <i>et al.</i> , 2008, <i>Proc Natl Acad Sci EE.UU.</i> 105:20653-20658

Cada una de las vías biosintéticas enumeradas en la Tabla 3 tiene un aldehído intermedio. Por ejemplo, el aldehído intermedio de la vía metabólica productora de isobutanol es isobutiraldehído (véase la Figura 1), mientras que las vías para la producción de 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-propanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol utilizan 1-butanal, 2-metil-1-butanal, 3-metil-1-butanal, 1-propanal, 1-pentanal, 1-hexanal, 3-metil-1-pentanal, 4-metil-1-pentanal, 4-metil-1-hexanal y 5-metil-1-heptanal como aldehídos intermedios, respectivamente. Por lo tanto, el rendimiento del producto en las vías biosintéticas que utilizan estos aldehídos intermedios dependerá en parte de la cantidad del aldehído intermedio que esté disponible para las enzimas dirección 3' de dichas vías biosintéticas.

Como se describe en el presente documento, los presentes inventores han descubierto las actividades enzimáticas responsables de la acumulación de subproductos no deseados derivados de 3-cetoácidos y/o aldehídos intermedios. Específicamente, han determinado que una 3-ceto-ácido reductasa y una aldehído deshidrogenasa son responsables de la conversión de los 3-ceto-ácidos y los aldehídos, respectivamente, en los subproductos no deseados. Se ha demostrado que las actividades de estas enzimas dificultan la productividad y el rendimiento óptimos de los productos derivados de 3-ceto-ácido y/o aldehído, incluyendo, pero sin limitación, los que figuran en las Tablas 1-3. Los presentes inventores han descubierto que la supresión de estas actividades enzimáticas recientemente caracterizadas reduce considerablemente o elimina la formación de subproductos no deseados y mejora concomitantemente los rendimientos y títulos de los metabolitos beneficiosos.

Acumulación reducida de 3-hidroxiácidos a partir de 3-ceto-ácidos

Como se describe en el presente documento, los presentes inventores han descubierto que los subproductos no deseados 3-hidroxiácidos pueden acumularse durante las reacciones de fermentación con microorganismos que comprenden una vía que implica un 3-ceto-ácido intermedio.

Como se usa en el presente documento, un "3-hidroxiácido" es un compuesto orgánico que contiene una fracción de ácido carboxílico en el átomo de carbono C1 y una fracción de alcohol en el átomo de carbono C3. Los 3-hidroxiácidos pueden obtenerse a partir de 3-ceto-ácidos mediante la reducción química de la fracción de cetona del 3-ceto-ácido a una fracción de alcohol. Por ejemplo, la reducción de la fracción de cetona en acetolactato o ácido 2-hidroxi-2-metil-3-oxobutanoico produce la formación de ácido 3-hidroxiácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (DH2MB) (véase, por ejemplo, la Figura 2).

Los presentes inventores han descubierto que el subproducto 3-hidroxiácido, el ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (CAS n.º 14868-24-7) (DH2MB), se acumula durante las reacciones de fermentación con microorganismos que comprenden vías biosintéticas en las que participa el 3-ceto-ácido intermedio, acetolactato. Se descubrió que la acumulación de este subproducto dificulta la productividad y el rendimiento óptimos del metabolito diana de la vía biosintética. Los presentes inventores encontraron que la producción de DH2MB es causada por la reducción del acetolactato. Para reducir o eliminar la actividad responsable de la producción de DH2MB, la actividad enzimática correspondiente que cataliza esta reacción tenía que ser identificada y reducida o eliminada. Los inventores han encontrado en *S. cerevisiae* que una de estas enzimas que cataliza la conversión del acetolactato en DH2MB es YMR226C (también conocida como *TMA29*). Este es el primer informe de una proteína de la levadura que convierte el acetolactato en DH2MB.

Los presentes inventores también han descubierto que el subproducto 3-hidroxiácido, 2-etil-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoato, se acumula durante las reacciones de fermentación con microorganismos que comprenden vías biosintéticas en las que participa el 3-ceto-ácido intermedio 2-aceto-2-hidroxi-2-metilbutirato. Se descubrió que la acumulación de este subproducto dificulta la productividad y el rendimiento óptimos del metabolito diana de la vía biosintética. Los presentes inventores encontraron que la producción de 2-etil-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoato es causada por la reducción de 2-aceto-2-hidroxi-2-metilbutirato. Para reducir o eliminar la actividad responsable de la producción de 2-etil-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoato, la actividad enzimática correspondiente que cataliza esta reacción tenía que ser identificada y reducida o eliminada. Los inventores han encontrado en *S. cerevisiae*, que la enzima YMR226C (también conocida como *TMA29*) que cataliza la conversión del acetolactato en DH2MB también cataliza la conversión de 2-aceto-2-hidroxi-2-metilbutirato en 2-etil-2,3-

dihidroxibutanoato. Este es el primer informe de una proteína de la levadura que convierte el 2-aceto-2-hidroxibutirato en 2-etil-2,3-dihidroxibutanoato.

Los presentes inventores describen en el presente documento múltiples estrategias para reducir la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en el correspondiente subproducto de 3-hidroxiácido, un proceso que se acompaña de un aumento en el rendimiento de metabolitos deseables. En una realización, el 3-ceto-ácido intermedio es el acetolactato y el 3-hidroxiácido correspondiente es DH2MB. Como se describe en el presente documento, la reducción de la conversión de acetolactato en DH2MB permite una mayor producción de metabolitos beneficiosos tales como el isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol, y coenzima A, que se derivan de vías biosintéticas que usan el acetolactato como producto intermedio. En otra realización, el 3-ceto-ácido intermedio es el 2-aceto-2-hidroxibutirato y el 3-hidroxiácido correspondiente es 2-etil-2,3-dihidroxibutanoato. Como se describe en el presente documento, la reducción de la conversión de 2-aceto-2-hidroxibutirato en 2-etil-2,3-dihidroxibutanoato permite el aumento de la producción de metabolitos beneficiosos tales como el 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

Por consiguiente, un aspecto de la invención se dirige a un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido como producto intermedio, en el que dicho microorganismo recombinante está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto de 3-hidroxiácido. En los microorganismos de la invención, el 3-ceto-ácido intermedio es acetolactato y el subproducto 3-hidroxiácido es DH2MB.

Como se usa en el presente documento, la expresión "3-ceto-ácido reductasa" se refiere a una ceto-reductasa (es decir, cetona reductasa) activa hacia el grupo 3-oxo de un 3-ceto-ácido. En la Figura 2, se muestra una ilustración de reacciones ilustrativas capaces de ser catalizadas por 3-ceto-ácido reductasas. En general, las 3-ceto-ácido reductasas adecuadas se encuentran en el subgrupo de clasificación de enzimas 1.1.1.X, siendo el dígito final X dependiente del sustrato. En la Figura 3, se muestra una lista no limitante de 3-ceto-ácido reductasas ilustrativas y su correspondiente número de clasificación enzimática.

En una realización ilustrativa, la 3-ceto-ácido reductasa es la proteína YMR226C (SEQ ID NO: 1) de *S. cerevisiae*, usada indistintamente en el presente documento con "TMA29". En algunas realizaciones, la 3-ceto-ácido reductasa es la proteína YMR226C (SEQ ID NO: 1) de *S. cerevisiae*, o un homólogo o una ante de la misma como se define en las reivindicaciones. En una realización, el homólogo puede seleccionarse del grupo que consiste en *Vanderwaltomyces polyspora* (SEQ ID NO: 2), *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 3), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 4), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 5), *Zygosaccharomyces rouxii* (SEQ ID NO: 6), *K. lactis* (SEQ ID NO: 7), *Ashbya gossypii* (SEQ ID NO: 8), *Saccharomyces kluyveri* (SEQ ID NO: 9), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 10), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 11), *Pichia stipitis* (SEQ ID NO: 12), *Debaromyces hanseni* (SEQ ID NO: 13), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 14), *Candida dubliniensis* (SEQ ID NO: 15), *Candida albicans* (SEQ ID NO: 16), *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID NO: 17), *Issatchenkia orientalis* (SEQ ID NO: 18), *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO: 19), *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 20), *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 21), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 22) y *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 23).

En una realización, el microorganismo recombinante de la invención incluye una mutación en al menos un gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa que da lugar a una reducción de la actividad de la 3-ceto-ácido reductasa de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización, el microorganismo recombinante incluye una delección parcial de un gen que codifica un gen de 3-ceto-ácido reductasa que da lugar a una reducción de la actividad de la 3-ceto-ácido reductasa de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización, el microorganismo recombinante comprende una delección completa de un gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa que da lugar a una reducción de la actividad de la 3-ceto-ácido reductasa de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización más, el microorganismo recombinante incluye una modificación de la región reguladora asociada con el gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa que da lugar a una reducción de la expresión de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización más, el microorganismo recombinante comprende una modificación del regulador de la transcripción que da lugar a una reducción de la transcripción de un gen que codifica una 3-ceto-ácido reductasa. En otra realización más, el microorganismo recombinante comprende mutaciones en todos los genes que codifican una 3-ceto-ácido reductasa que dan lugar a una reducción de la actividad de un polipéptido codificado por el/los gen/es. En una realización, dicho gen de 3-ceto-ácido reductasa es el gen TMA29 de *S. cerevisiae* (YMR226C) o un homólogo del mismo. Como se entenderá en la técnica, los homólogos naturales de TMA29 en levaduras distintas de *S. cerevisiae* se pueden inactivar de manera similar usando los métodos de la presente invención. En el presente documento, se describen homólogos de TMA29 y métodos para identificar dichos homólogos de TMA29.

Como entienden los expertos en la materia, hay varios mecanismos adicionales disponibles para reducir o interrumpir la actividad de una proteína tal como la 3-ceto-ácido reductasa, incluyendo, pero sin limitación, el uso de un promotor regulado, el uso de un promotor constitutivo débil, la alteración de una de las dos copias del gen en una levadura diploide, la alteración de dos copias del gen en una levadura diploide, la expresión de un ácido nucleico no codificante, la expresión de un ARNip, la sobreexpresión de un regulador negativo del promotor endógeno, la alteración de la actividad de un gen endógeno o heterólogo, el uso de un gen heterólogo con una menor actividad específica, similares

o combinaciones de los mismos.

Como se describe en el presente documento, los microorganismos recombinantes de la presente invención están modificados mediante ingeniería genética para producir menos subproducto de 3-hidroxiácido que un microorganismo parental no modificado. En una realización, el microorganismo recombinante produce el subproducto de 3-hidroxiácido a partir de una fuente de carbono con un rendimiento de carbono inferior a aproximadamente el 20 por ciento. En otra realización, el microorganismo produce el subproducto de 3-hidroxiácido de una fuente de carbono con un rendimiento de carbono inferior a aproximadamente el 10, inferior a aproximadamente el 5, inferior a aproximadamente el 2, inferior a aproximadamente el 1, inferior a aproximadamente el 0,5, inferior a aproximadamente el 0,1 o inferior a aproximadamente el 0,01 por ciento. En los microorganismos de la presente invención, el subproducto de 3-hidroxiácido es DH2MB, derivado del 3-ceto-ácido, acetolactato.

En una realización, el rendimiento de carbono del subproducto de 3-hidroxiácido derivado del 3-ceto-ácido se reduce en al menos aproximadamente el 50 % en un microorganismo recombinante en comparación con un microorganismo parental que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en el subproducto de 3-hidroxiácido. En otra realización, el subproducto de 3-hidroxiácido derivado del 3-ceto-ácido se reduce en al menos aproximadamente el 60 %, en al menos aproximadamente el 65 %, en al menos aproximadamente el 70 %, en al menos aproximadamente el 75 %, en al menos aproximadamente el 80 %, en al menos aproximadamente el 85 %, en al menos aproximadamente el 90 %, en al menos aproximadamente el 95 %, en al menos aproximadamente el 99 %, en al menos aproximadamente el 99,9 % o en al menos aproximadamente el 100 % en comparación con un microorganismo parental que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión del 3-ceto-ácido en el subproducto de 3-hidroxiácido. En los microorganismos de la presente invención, el subproducto de ácido 3-hidroxi es DH2MB, derivado del 3-ceto-ácido, acetolactato.

En una realización adicional, el rendimiento de un producto de fermentación deseable se aumenta en los microorganismos recombinantes que comprenden una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en el subproducto de 3-hidroxiácido. En una realización, el rendimiento de un producto de fermentación deseable se aumenta en al menos aproximadamente el 1 % en comparación con un microorganismo parental que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en el subproducto de 3-hidroxiácido. En otra realización, el rendimiento de un producto de fermentación deseable se aumenta en al menos aproximadamente el 5 %, en al menos aproximadamente el 10 %, en al menos aproximadamente el 25 % o en al menos aproximadamente el 50 % en comparación con un microorganismo parental que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en el subproducto de 3-hidroxiácido. En los microorganismos de la presente invención, el subproducto de 3-hidroxiácido es DH2MB, derivado del 3-ceto-ácido, acetolactato. Por consiguiente, en una realización, el producto de fermentación deseable se deriva de cualquier vía biosintética en la que el acetolactato actúa como un producto intermedio, incluyendo, pero sin limitación, isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoína, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol y coenzima A.

En realizaciones adicionales, enzimas adicionales que potencialmente catalizan la conversión de un 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto de 3-hidroxiácido se eliminan del genoma de un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido como producto intermedio. Los genes de levadura endógenos con el potencial de convertir un 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto de 3-hidroxiácido incluyen cetorreductasas, alcohol deshidrogenasas de cadena corta, alcohol deshidrogenasas de cadena media, miembros de la familia de las aldosa reductasas, miembros de la familia de la D-hidroxiácido deshidrogenasas, alcohol deshidrogenasas y lactato deshidrogenasas. En una realización, el subproducto de 3-hidroxiácido es DH2MB, derivado del 3-ceto-ácido, acetolactato. En otra realización, el subproducto de 3-hidroxiácido es 2-etil-2,3-dihidroxibutanoato, derivado del 3-ceto-ácido, 2-aceto-2-hidroxibutirato.

A continuación, se resumen los métodos para identificar enzimas adicionales que catalizan la conversión de un 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto de 3-hidroxiácido: genes de levadura endógenos que codifican cetorreductasas, alcohol deshidrogenasas de cadena corta, alcohol deshidrogenasas de cadena media, miembros de la familia de las aldosa reductasas, miembros de la familia de la D-hidroxiácido deshidrogenasas, alcohol deshidrogenasas y lactato deshidrogenasas se eliminan del genoma de una cepa de levadura que comprende una vía biosintética en la que un 3-ceto-ácido (por ejemplo, acetolactato o 2-aceto-2-hidroxibutirato) es un producto intermedio. Estas cepas con eliminación se comparan con la cepa parental mediante fermentación y análisis del caldo de fermentación para determinar la presencia y concentración del correspondiente subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB o 2-etil-2,3-dihidroxibutanoato), derivado de acetolactato y 2-aceto-2-hidroxibutirato, respectivamente). En *S. cerevisiae*, Las eliminaciones que reducen la producción del subproducto de 3-hidroxiácido se combinan mediante la construcción de cepas que portan múltiples eliminaciones. Los genes candidatos pueden incluir, pero sin limitación, YAL060W, YJR159W, YGL157W, YBL114W, YOR120W, YKL055C, YBR159W, YBR149W, YDL168W, YDR368W, YLR426W, YCR107W, YILL24W, YML054C, YOL151W, YMR318c, YBR046C, YHR104W, YIR036C, YDL174C, YDR541C,

YBR145W, YGL039W, YCR105W, YDL124W, YIR035C, YFL056C, YNL274c, YLR255C, YGL185C, YGL256W, YJR096W, YJR155W, YPL275W, YOR388C, YLR070C, YMR083W, YER081W, YJR139C, YDL243C, YPL113C, YOL165C, YML086C, YMR303C, YDL246C, YLR070C, YHR063C, YNL331C, YFL057C, YIL155C, YOL086C, YAL061W, YDR127W, YPR127W, YCL018W, YIL074C, YIL124W y YEL071W. Muchas de estas cepas de eliminación están disponibles en el mercado (por ejemplo, Open Biosystems YSC1054). Estas cepas de eliminación se transforman con un plásmido pGV2435 a partir del que el gen ALS (por ejemplo, *alsS* de *B. subtilis*) se expresa bajo el control del promotor *CUP1*. Los transformantes se cultivan en medio YPD que contiene 150 g/l de glucosa en matraces de agitación a 30 °C, 75 rpm en una incubadora de agitación durante 48 horas. Después de 48 h, se analizaron las muestras de los matraces de agitación mediante HPLC para determinar la concentración del subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB y 2-etil-2,3-dihidroxiбутаноato, derivado de acetolactato y 2-aceto-2-hidroxiбутирато, respectivamente). Como se entenderá en la técnica, los homólogos naturales de los genes de la 3-ceto-ácido reductasa (por ejemplo, *TMA29*) en levaduras distintas de *S. cerevisiae* pueden ser inactivados de manera similar. En el presente documento, se describen homólogos del gen de la 3-ceto-ácido reductasa (por ejemplo, *TMA29*) y los métodos para identificar dichos homólogos del gen de la 3-ceto-ácido reductasa.

Otra forma de seleccionar la biblioteca de eliminaciones es incubar células de levadura con el 3-ceto-ácido intermedio (por ejemplo, acetolactato o 2-aceto-2-hidroxiбутирато) y analizar el caldo para determinar la producción del correspondiente subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB o 2-etil-2,3-dihidroxiбутаноato, derivado de acetolactato y 2-aceto-2-hidroxiбутирато, respectivamente).

Algunos de los genes enumerados son el resultado de la duplicación en tándem o de duplicaciones del genoma completo, y se espera que tengan especificidades de sustrato similares. Los ejemplos son YAL061W (*BDH1*) y YAL060W (*BDH2*), YDR368W (*YPR1*) y YOR120W (*Gcy1*). La delección de solo uno de los genes duplicados es probable que no dé lugar a un fenotipo. Estos pares de genes deben analizarse en cepas portadoras de eliminaciones en ambos genes.

Un enfoque alternativo para encontrar actividad endógena adicional responsable de la producción del subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB o 2-etil-2,3-dihidroxiбутаноato, derivado de acetolactato y 2-aceto-2-hidroxiбутирато, respectivamente) es analizar cepas de levadura que sobreexpresan los genes sospechosos de codificar la enzima responsable de la producción del subproducto de 3-hidroxiácido. Dichas cepas están disponibles en el mercado para muchos de los genes candidatos enumerados anteriormente (por ejemplo, Open Biosystems YSC3870). Las cepas que sobreexpresan el ORF se procesan de la misma manera que las cepas de eliminación. Se transforman con un plásmido para la expresión de ALS y se analizan los niveles de producción del subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB o 2-etil-2,3-dihidroxiбутаноato). Para reducir la lista de posibles genes que causan la producción del subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB o 2-etil-2,3-dihidroxiбутаноato), su expresión se puede analizar en muestras de fermentación. Los genes que no se expresan durante una fermentación que produjo el subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB o 2-etil-2,3-dihidroxiбутаноato) pueden excluirse de la lista de posibles dianas. Este análisis se puede realizar mediante la extracción de ARN de muestras del fermentador y la presentación de estas muestras para el análisis de la expresión del genoma completo, por ejemplo, por Roche NimbleGen.

Como se describe en el presente documento, las cepas que producen de manera natural niveles bajos de uno o más subproductos de 3-hidroxiácido también pueden tener aplicabilidad de producir niveles elevados de productos de fermentación deseables que se derivan de vías biosintéticas que comprenden un 3-ceto-ácido intermedio. Como entenderá un experto en la materia dotado de la presente divulgación, las cepas que producen de manera natural niveles bajos de uno o más subproductos de 3-hidroxiácido pueden presentar inherentemente niveles bajos o indetectables de actividad enzimática endógena, dando lugar a la conversión reducida de 3-cetoácidos en 3-hidroxiácidos, un rasgo favorable para la producción de un producto de fermentación deseable tal como isobutanol. En el presente documento, se describen varios enfoques para identificar un microorganismo hospedador nativo que está sustancialmente libre de actividad de 3-ceto-ácido reductasa. Por ejemplo, un enfoque para encontrar un microorganismo hospedador que presente actividad enzimática endógena inherentemente baja o no detectable responsable de la producción del subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB o 2-etil-2,3-dihidroxiбутаноato) es analizar las cepas de levadura incubando las células de levadura con un 3-ceto-ácido (por ejemplo, acetolactato o 2-aceto-2-hidroxiбутирато) y analizar el caldo para la producción del correspondiente subproducto de 3-hidroxiácido (por ejemplo, DH2MB o 2-etil-2,3-dihidroxiбутаноato, derivado de acetolactato y 2-aceto-2-hidroxiбутирато, respectivamente).

Los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento que producen un metabolito beneficioso derivado de una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido como producto intermedio se pueden modificar mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la actividad enzimática para la conversión de piruvato en productos distintos del 3-ceto-ácido (por ejemplo, acetolactato y/o 2-aceto-2-hidroxiбутирато). En una realización, la actividad enzimática de la piruvato descarboxilasa (PDC), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato oxidasa, piruvato deshidrogenasa y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) se reduce o elimina.

En una realización específica, el metabolito beneficioso se produce en un microorganismo de levadura GPD⁻ PDC⁻ recombinante que sobreexpresa un gen de acetolactato sintasa (ALS). En otra realización específica, la ALS está

codificado por alsS de *B. subtilis*.

Acumulación reducida de los subproductos ácidos de los aldehídos intermedios

5 Como se describe más adelante en los ejemplos, los presentes inventores también han descubierto que los subproductos ácidos no deseados (por ejemplo, isobutirato en el caso de isobutanol), pueden acumularse durante las reacciones de fermentación con microorganismos que comprenden una vía en la que participa un aldehído intermedio (por ejemplo, isobutiraldehído en el caso de isobutanol).

10 Como se usa en el presente documento, un "subproducto ácido" se refiere a un compuesto orgánico que contiene una fracción de ácido carboxílico. Se puede obtener un subproducto ácido mediante la oxidación de un aldehído. Por ejemplo, la oxidación de isobutiraldehído produce la formación de ácido isobutírico (Véase, por ejemplo, la Figura 4).

15 Los presentes inventores han encontrado que la acumulación de estos subproductos ácidos dificulta la productividad y el rendimiento óptimos de la vía biosintética que utiliza los aldehídos intermedios. Los presentes inventores encontraron que la producción de estos subproductos ácidos está causada por la deshidrogenación del correspondiente aldehído. Para reducir o eliminar la actividad responsable de la producción del subproducto ácido, la actividad enzimática correspondiente que cataliza esta reacción tenía que ser identificada y reducida o eliminada. Los inventores han encontrado en *S. cerevisiae* que una de dichas enzimas que cataliza la conversión de los aldehídos en subproductos ácidos es la aldehído deshidrogenasa.

20 Los presentes inventores describen en el presente documento múltiples estrategias para reducir la formación de subproductos ácidos, un proceso que se acompaña de un aumento en el rendimiento de metabolitos deseados tales como el isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-propanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

25 Por consiguiente, en el presente documento se describe un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa un aldehído como producto intermedio, en el que dicho microorganismo recombinante está sustancialmente libre de una enzima que cataliza la conversión de un aldehído en un subproducto ácido.

30 En el presente documento también se describe un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa un aldehído como producto intermedio, en el que dicho microorganismo recombinante está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una o más enzimas que catalizan la conversión del aldehído en un subproducto ácido.

35 En una realización, el aldehído intermedio es isobutiraldehído y el subproducto ácido es isobutirato. En otra realización, el aldehído intermedio es 1-butanal y el subproducto ácido es butirato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 2-metil-1-butanal y el subproducto ácido es 2-metil-1-butirato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 3-metil-1-butanal y el subproducto ácido es 3-metil-1-butirato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 1-propanal y el subproducto ácido es propionato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 1-pentanal y el subproducto ácido es pentanoato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 1-hexanal y el subproducto ácido es hexanoato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 3-metil-1-pentanal y el subproducto ácido es 3-metil-1-pentanoato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 4-metil-1-pentanal y el subproducto ácido es 4-metil-1-pentanoato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 4-metil-1-hexanal y el subproducto ácido es 4-metil-1-hexanoato. En otra realización más, el aldehído intermedio es 5-metil-1-heptanal y el subproducto ácido es 5-metil-1-heptanoato.

45 En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, la proteína que participa en la catalización de la conversión de un aldehído en un subproducto ácido es una aldehído deshidrogenasa (ALDH).

50 Como se usa en el presente documento, el término "aldehído deshidrogenasa" se refiere a una enzima que cataliza la reacción:



55 En la Figura 4, se muestra una ilustración de reacciones ilustrativas capaces de ser catalizadas por aldehído deshidrogenasas. Las aldehído deshidrogenasas adecuadas se encuentran generalmente en el subgrupo de clasificación de las enzimas EC 1.2.1.X, en el que el dígito final X depende del sustrato o del cofactor. Por ejemplo, EC 1.2.1.3 cataliza la siguiente reacción: un aldehído + NAD⁺ + H₂O = un ácido + NADH + H⁺; EC 1.2.1.4 cataliza la siguiente reacción: un aldehído + NADP⁺ + H₂O = un ácido + NADPH + H⁺; y EC 1.2.1.5 cataliza la siguiente reacción: un aldehído + NAD(P)⁺ + H₂O = un ácido + NAD(P)H + H⁺.

60 Como se describe en el presente documento, la proteína que participa en la catalización de la conversión de un aldehído en un subproducto ácido es una aldehído deshidrogenasa (ALDH). En una realización, la aldehído deshidrogenasa es codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste en *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5*, *ALD6* y *HFD1*, y homólogos y variantes de los mismos. En una realización ilustrativa, la aldehído deshidrogenasa es la

aldehído deshidrogenasa ALD6 (SEQ ID NO: 25) de *S. cerevisiae*, o un homólogo o una variante de la misma. En una realización, el homólogo se puede seleccionar del grupo que consiste en *Saccharomyces castelli* (SEQ ID NO: 26), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 27), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 28), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 29), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 30), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 31), *Saccharomyces cerevisiae* YJ789 (SEQ ID NO: 32), *Saccharomyces cerevisiae* JAY291 (SEQ ID NO: 33), *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (SEQ ID NO: 34), *Saccharomyces cerevisiae* DBY939 (SEQ ID NO: 35), *Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631 (SEQ ID NO: 36), *Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a (SEQ ID NO: 37), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 38), *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 39), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 40) y *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 41).

En una realización, el microorganismo recombinante incluye una mutación en al menos un gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que da lugar a una reducción de la actividad de la aldehído deshidrogenasa de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización, el microorganismo recombinante incluye una delección parcial del gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que da lugar a una reducción de la actividad de la aldehído deshidrogenasa de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización, el microorganismo recombinante comprende una delección completa de un gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que da lugar a una reducción de la actividad de la aldehído deshidrogenasa de un polipéptido codificado por el gen. En otra realización más, el microorganismo recombinante incluye una modificación de la región reguladora asociada con el gen que codifica una aldehído deshidrogenasa que da lugar a una reducción de la expresión de un polipéptido codificado por dicho gen. En otra realización más, el microorganismo recombinante comprende una modificación del regulador de la transcripción que da lugar a una reducción de la transcripción de un gen que codifica una aldehído deshidrogenasa. En otra realización más, el microorganismo recombinante comprende mutaciones en todos los genes que codifican una aldehído deshidrogenasa que dan lugar a una reducción de la actividad de un polipéptido codificado por el/los gen/es. En una realización, dicha aldehído deshidrogenasa es codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste en *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5*, *ALD6*, y *HFD1*, y homólogos y variantes de los mismos. Como se entenderá en la técnica, los homólogos naturales de aldehído deshidrogenasa en levaduras distintas de *S. cerevisiae* se pueden inactivar de manera similar usando los métodos de la presente invención. Los homólogos de aldehído deshidrogenasa y los métodos para identificar dichos homólogos de aldehído deshidrogenasa se describen en el presente documento.

Como entienden los expertos en la materia, hay varios mecanismos adicionales disponibles para reducir o interrumpir la actividad de una proteína tal como la aldehído deshidrogenasa, incluyendo, pero sin limitación, el uso de un promotor regulado, el uso de un promotor constitutivo débil, la alteración de una de las dos copias del gen en una levadura diploide, la alteración de dos copias del gen en una levadura diploide, la expresión de un ácido nucleico no codificante, la expresión de un ARNip, la sobreexpresión de un regulador negativo del promotor endógeno, la alteración de la actividad de un gen endógeno o heterólogo, el uso de un gen heterólogo con una menor actividad específica, similares o combinaciones de los mismos.

Como entenderán los expertos en la materia, puede reducirse o eliminarse la actividad o expresión de más de una aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, se reduce o elimina la actividad o expresión de *ALD4* y *ALD6* u homólogos o variantes de las mismas. En otra realización específica, se reduce o elimina la actividad o expresión de *ALD5* y *ALD6* u homólogos o variantes de las mismas. En otra realización específica más, se reduce o elimina la actividad o expresión de *ALD4*, *ALD5* y *ALD6* u homólogos o variantes de las mismas. En otra realización específica más, la actividad o expresión de las aldehído deshidrogenasas ubicadas en el citosol *ALD2*, *ALD3* y *ALD6*, u homólogos o variantes de las mismas se reduce o se elimina. En otra realización específica más, la actividad o expresión de las aldehído deshidrogenasas ubicadas en las mitocondrias *ALD4* y *ALD5*, u homólogos o variantes de las mismas, se reduce o se elimina.

Como se describe en el presente documento, los microorganismos recombinantes de la presente invención están modificados mediante ingeniería genética para producir menos subproducto ácido que un microorganismo parental no modificado. En una realización, el microorganismo recombinante produce el subproducto ácido de una fuente de carbono con un rendimiento de carbono inferior a aproximadamente el 50 por ciento en comparación con un microorganismo parental. En otra realización, el microorganismo produce el subproducto ácido de una fuente de carbono de una fuente de carbono con un rendimiento de carbono inferior a aproximadamente el 25, inferior a aproximadamente el 10, inferior a aproximadamente el 5, inferior a aproximadamente el 1, inferior a aproximadamente el 0,5, inferior a aproximadamente el 0,1 o inferior a aproximadamente el 0,01 por ciento en comparación con un microorganismo parental. En una realización, el subproducto ácido es isobutirato, derivado del isobutiraldehído, un producto intermedio de la vía biosintética del isobutanol. En otra realización, el subproducto ácido es butirato, derivado de 1-butanol, un producto intermedio de la vía biosintética del 1-butanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 2-metil-1-butarato, derivado de 2-metil-1-butanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 2-metil-1-butanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 3-metil-1-butarato, derivado de 3-metil-1-butanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 3-metil-1-butanol. En otra realización más, el subproducto ácido es propionato, derivado de 1-propanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 1-propanol. En otra realización más, el subproducto ácido es pentanoato, derivado de 1-pentanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 1-pentanol. En otra realización más, el subproducto ácido es hexanoato, derivado de 1-hexanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 1-hexanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 3-metil-1-pentanoato, derivado de 3-metil-1-pentanal, un producto intermedio de la 3-metil-1-pentanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 4-metil-

1-pentanoato, derivado de 4-metil-1-pentanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 4-metil-1-pentanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 4-metil-1-hexanoato, derivado de 4-metil-1-hexanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 4-metil-1-hexanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 5-metil-1-heptanoato, derivado de 5-metil-1-heptanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 5-metil-1-heptanol.

En una realización, el rendimiento de carbono del subproducto ácido del correspondiente aldehído se reduce en al menos aproximadamente el 50 % en un microorganismo recombinante en comparación con un microorganismo parental que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas que participan en la catalización de la conversión de un aldehído en un subproducto ácido. En otra realización, el rendimiento de carbono del subproducto ácido del acetolactato se reduce en al menos aproximadamente el 60 %, en al menos aproximadamente el 65 %, en al menos aproximadamente el 70 %, en al menos aproximadamente el 75 %, en al menos aproximadamente el 80 %, en al menos aproximadamente el 85 %, en al menos aproximadamente el 90 %, en al menos aproximadamente el 95 %, en al menos aproximadamente el 99 %, en al menos aproximadamente el 99,9 % o en al menos aproximadamente el 100 % en comparación con un microorganismo parental que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas que participan en la catalización de la conversión de un aldehído en el subproducto ácido. En una realización, el subproducto ácido es isobutirato, derivado del isobutiraldehído, un producto intermedio de la vía biosintética del isobutanol. En otra realización, el subproducto ácido es butirato, derivado de 1-butanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 1-butanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 2-metil-1-butirato, derivado de 2-metil-1-butanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 2-metil-1-butanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 3-metil-1-butirato, derivado de 3-metil-1-butanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 3-metil-1-butanol. En otra realización más, el subproducto ácido es propionato, derivado de 1-propanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 1-propanol. En otra realización más, el subproducto ácido es pentanoato, derivado de 1-pentanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 1-pentanol. En otra realización más, el subproducto ácido es hexanoato, derivado de 1-hexanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 1-hexanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 3-metil-1-pentanoato, derivado de 3-metil-1-pentanal, un producto intermedio de la 3-metil-1-pentanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 4-metil-1-pentanoato, derivado de 4-metil-1-pentanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 4-metil-1-pentanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 4-metil-1-hexanoato, derivado de 4-metil-1-hexanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 4-metil-1-hexanol. En otra realización más, el subproducto ácido es 5-metil-1-heptanoato, derivado de 5-metil-1-heptanal, un producto intermedio de la vía biosintética del 5-metil-1-heptanol.

En una realización adicional, el rendimiento de un producto de fermentación deseable se aumenta en los microorganismos recombinantes que comprenden una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas que participan en la catalización de la conversión un aldehído en el subproducto ácido. En una realización, el rendimiento de un producto de fermentación deseable se aumenta en al menos aproximadamente el 1 % en comparación con un microorganismo parental que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un aldehído en el subproducto ácido. En otra realización, el rendimiento de un producto de fermentación deseable se aumenta en al menos aproximadamente el 5 %, en al menos aproximadamente el 10 %, en al menos aproximadamente el 25 % o en al menos aproximadamente el 50 % en comparación con un microorganismo parental que no comprende una reducción o eliminación de la actividad o expresión de una o más proteínas endógenas que participan en la catalización de la conversión de un aldehído en el subproducto ácido. Como se describe en el presente documento, el producto de fermentación deseable se puede derivar de cualquier vía biosintética en la que un aldehído actúe como un producto intermedio, incluyendo, pero sin limitación, isobutanol, 1-butanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-propanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

A continuación, se resumen métodos para identificar enzimas adicionales que catalizan la conversión de un aldehído en un subproducto ácido: Los genes de levadura endógenos que codifican supuestas aldehído y alcohol deshidrogenasas se eliminan del genoma de una cepa de levadura. Estas cepas de eliminación se comparan con la cepa parental mediante un ensayo enzimático. Muchas de estas cepas de eliminación están disponibles en el mercado (por ejemplo, Open Biosystems YSC1054).

Otra forma de seleccionar la biblioteca de eliminaciones es incubar células de levadura con un aldehído (por ejemplo, isobutiraldehído o 1-butanal) y analizar el caldo para determinar la producción del correspondiente subproducto ácido (por ejemplo, isobutirato o butirato, derivado de isobutiraldehído o 1-butanal, respectivamente).

Un enfoque alternativo para encontrar actividad endógena adicional responsable de la producción del subproducto ácido (por ejemplo, isobutirato o butirato, derivado de isobutiraldehído o 1-butanal, respectivamente) es analizar cepas de levadura que sobreexpresan los genes sospechosos de codificar la enzima responsable de la producción del subproducto ácido. Dichas cepas están disponibles en el mercado para muchos de los genes candidatos enumerados anteriormente (por ejemplo, Open Biosystems YSC3870). Las cepas de sobreexpresión de ORF se analizan para aumentar los niveles de producción de subproductos ácidos. Como alternativa, los lisados celulares de las cepas que sobreexpresan ORF se analizan para determinar el aumento de la actividad de oxidación del aldehído. Para reducir la lista de posibles genes causantes de la producción de subproductos ácidos, su expresión se puede analizar en muestras de fermentación. Los genes que no se expresan durante una fermentación que produce un subproducto

ácido pueden excluirse de la lista de posibles dianas. Este análisis se puede realizar mediante la extracción de ARN de muestras del fermentador y la presentación de estas muestras para el análisis de la expresión del genoma completo, por ejemplo, por Roche NimbleGen.

5 Como se describe en el presente documento, las cepas que producen de manera natural niveles bajos de uno o más subproductos ácidos también pueden tener aplicabilidad de producir niveles elevados de productos de fermentación deseables que se derivan de vías biosintéticas que comprenden un aldehído intermedio. Como entenderá un experto en la materia dotado de la presente divulgación, las cepas que producen de manera natural niveles bajos de uno o más subproductos ácidos pueden presentar inherentemente niveles bajos o indetectables de actividad enzimática endógena, dando lugar a la conversión reducida de aldehídos en subproductos ácidos, un rasgo favorable para la producción de un producto de fermentación deseable tal como isobutanol. En el presente documento, se describen varios enfoques para identificar un microorganismo hospedador nativo que está sustancialmente libre de actividad de aldehído deshidrogenasa. Por ejemplo, un enfoque para encontrar un microorganismo hospedador que presente una actividad enzimática endógena intrínsecamente baja o no detectable responsable de la producción del subproducto ácido (por ejemplo, isobutirato o butirato) es analizar las cepas de levadura incubando las células de levadura con un aldehído (por ejemplo, isobutiraldehído o 1-butanal) y analizar el caldo para determinar la producción del correspondiente subproducto ácido (por ejemplo, isobutirato o butirato, derivado de isobutiraldehído o 1-butanal, respectivamente).

20 Como se describe anteriormente, una estrategia para reducir la producción del subproducto ácido, isobutirato, es reducir o eliminar la actividad o expresión de una o más proteínas de aldehído deshidrogenasa endógenas presentes en levaduras que pueden estar convirtiendo el isobutiraldehído en isobutirato.

25 Otra estrategia para reducir la producción de isobutirato es la reducción o eliminación de la actividad o expresión de uno o más alcohol deshidrogenasas de levadura endógenas. La reducción de la expresión o la eliminación de una o más alcohol deshidrogenasas incluyendo, pero sin limitación, ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7 y SFA1 de *S. cerevisiae*, y homólogos y variantes de las mismas, en general, conducirá a una producción reducida de isobutirato y a un aumento concomitante en el rendimiento de isobutanol. La reducción y/o eliminación de deshidrogenasas adicionales se contemplan en el presente documento y se consideran dentro del alcance de la presente invención. Estas deshidrogenasas incluyen alcohol deshidrogenasas adicionales, tales como BDH1, BDH2, SOR1, SOR2 y XYL1 de *S. cerevisiae*, y homólogos y variantes de las mismas, así como aril alcohol deshidrogenasas tales como AAD3, AAD4, AAD6, AAD10, AAD14, AAD15, AAD16 y YPL088W, y homólogos y variantes de las mismas.

35 En otra realización, la invención proporciona microorganismos recombinantes diseñados para reducir y/o deletar uno o más genes adicionales que codifican carbonilo/aldehído reductasas. Estas carbonilo/aldehído reductasas incluyen AR11, YPR1, TMA29, YGL039W y UGA2 de *S. cerevisiae*, y homólogos o variantes de las mismas.

40 Una estrategia adicional descrita en el presente documento para reducir la producción de subproducto de isobutirato es reducir o eliminar la actividad o expresión de proteínas endógenas presentes en la levadura que puede producir isobutirato a partir de la vía del isobutanol intermedio 2-cetoisovalerato. Dichas enzimas se denominan en general cetoácido deshidrogenasas (KDH). La eliminación o reducción de la actividad o expresión de estas proteínas endógenas puede reducir o eliminar la producción del subproducto no deseado isobutirato. La actividad de la enzima KDH se ha identificado en *S. cerevisiae* (Dickinson, J. R. y I. W. Dawes, 1992, "The catabolism of branched-chain amino acids occurs via a 2-oxoacid dehydrogenase in *S. cerevisiae*". *J. Gen. Microbiol.* 138: 2029-2033). La reducción de la expresión o la eliminación de una o más ceto-ácido deshidrogenasas y homólogos o variantes de las mismas, en general, conducirá a una producción reducida de isobutirato y a un aumento concomitante en el rendimiento de isobutanol.

50 La reducción de la expresión o la eliminación de genes en *S. cerevisiae* y otras levaduras puede lograrse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como el reemplazo o intercambio alélico, así como la alteración de genes mediante la inserción de otro gen o casete marcador.

55 Otra estrategia descrita en el presente documento para reducir la producción del subproducto de isobutirato es aumentar la actividad y/o la expresión de una alcohol deshidrogenasa (ADH) responsable de la conversión del isobutiraldehído en isobutanol. Esta estrategia previene la competencia por enzimas endógenas por el producto intermedio de vía del isobutanol, el isobutiraldehído. Un aumento en la actividad y/o expresión de la alcohol deshidrogenasa se puede lograr mediante diversos medios. Por ejemplo, la actividad de la alcohol deshidrogenasa se puede aumentar utilizando un promotor con una mayor fuerza potenciadora, aumentando el número de copias del gen de la alcohol deshidrogenasa, o utilizando una alcohol deshidrogenasa alternativa o modificada con un aumento de la actividad específica.

65 Una estrategia alternativa descrita en el presente documento para reducir la producción del subproducto de isobutirato es utilizar una alcohol deshidrogenasa (ADH) en la vía del isobutanol responsable de la conversión del isobutiraldehído en isobutanol, que muestre una disminución en la constante de Michaelis-Menten (K_M). Esta estrategia también previene la competencia por parte de las enzimas endógenas por el producto intermedio de la vía del isobutanol, el isobutiraldehído.

Otra estrategia descrita en el presente documento para reducir la producción del subproducto de isobutirato es utilizar una alcohol deshidrogenasa (ADH) en la vía del isobutanol responsable de la conversión del isobutiraldehído en isobutanol, que presente una mayor actividad y una disminución en la constante de Michaelis-Menten (K_M). Esta estrategia también previene la competencia por parte de las enzimas endógenas por el producto intermedio de la vía del isobutanol, el isobutiraldehído.

Además, utilizando una enzima ADH modificada, los presentes inventores pueden establecer una situación en la que la reacción directa (es decir, la conversión del isobutiraldehído en isobutanol) sea la reacción preferida frente a la reacción inversa (es decir, la conversión del isobutanol en isobutiraldehído).

Las estrategias descritas anteriormente generalmente conducen a una disminución en el rendimiento del isobutirato, que se acompaña de un aumento en el rendimiento del isobutanol. Por tanto, las estrategias anteriores son útiles para disminuir el rendimiento y/o el título del isobutirato, y para aumentar la proporción de rendimiento de isobutanol frente al rendimiento de isobutirato.

En una realización, el rendimiento del isobutirato (mol de isobutirato por mol de glucosa) es inferior a aproximadamente el 5 %. En otra realización, el rendimiento del isobutirato (mol de isobutirato por mol de glucosa) es inferior a aproximadamente el 1 %. En otra realización más, el rendimiento del isobutirato (mol de isobutirato por mol de glucosa) es inferior a aproximadamente el 0,5 %, inferior a aproximadamente el 0,1 %, inferior a aproximadamente el 0,05 % o inferior a aproximadamente el 0,01 %.

En una realización, la proporción de rendimiento del isobutanol con respecto al isobutirato es de al menos aproximadamente 2. En otra realización, el rendimiento del isobutanol con respecto al isobutirato es de al menos aproximadamente 5. En otra realización más, la proporción del rendimiento del isobutanol con respecto al isobutirato es de al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 500 o al menos aproximadamente 1000.

Los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento que producen un metabolito beneficioso derivado de una vía biosintética que usa un aldehído como producto intermedio se pueden modificar mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la actividad enzimática para la conversión de piruvato en productos distintos de un 3-ceto-ácido (por ejemplo, acetolactato y/o 2-aceto-2-hidroxi-butirato). En una realización, la actividad enzimática de la piruvato descarboxilasa (PDC), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato oxidasa, piruvato deshidrogenasa y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) se reduce o elimina.

En una realización específica, el metabolito beneficioso se produce en un microorganismo de levadura GPD⁻ PDC⁻ recombinante que sobreexpresa un gen de acetolactato sintasa (ALS). En otra realización específica, la ALS está codificado por alsS de *B. subtilis*.

Acumulación reducida de subproductos de 3-hidroxiácido y subproductos ácidos

Los presentes inventores describen en el presente documento múltiples estrategias para reducir la conversión de un 3-ceto-ácido intermedio en un correspondiente subproducto de 3-hidroxiácido, un proceso que se acompaña de un aumento en el rendimiento de metabolitos deseables. Los presentes inventores también describen en el presente documento múltiples estrategias para reducir la conversión de un aldehído intermedio en un subproducto ácido correspondiente, proceso que se acompaña de un aumento adicional en el rendimiento de metabolitos deseables.

Por consiguiente, en el presente documento, se describe además un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido como producto intermedio y un aldehído como producto intermedio, en el que dicho microorganismo recombinante está (i) sustancialmente libre de una enzima que cataliza la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto de 3-hidroxiácido y (ii) sustancialmente libre de una enzima que cataliza la conversión de un aldehído en un subproducto ácido. En una realización, el 3-ceto-ácido intermedio es acetolactato. La vía biosintética que usa acetolactato y un aldehído como productos intermedios puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de isobutanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol. En otra realización, el 3-ceto-ácido intermedio es 2-aceto-2-hidroxi-butirato. La vía biosintética que usa 2-aceto-2-hidroxi-butirato y un aldehído como productos intermedios puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

En el presente documento se describe además un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido como producto intermedio y un aldehído como producto intermedio, en el que dicho microorganismo recombinante está (i) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en un subproducto de 3-hidroxiácido; e (ii) está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una o más enzimas que catalizan la conversión del aldehído en un subproducto ácido. En una realización, el 3-ceto-ácido intermedio es acetolactato. La vía biosintética que usa acetolactato y un aldehído como productos intermedios puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de isobutanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol. En otra realización, el 3-ceto-

ácido intermedio es 2-aceto-2-hidroxi-butarato. La vía biosintética que usa 2-aceto-2-hidroxi-butarato y un aldehído como productos intermedios puede seleccionarse de una vía para la biosíntesis de 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

5 En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, la proteína que participa en catalizar la conversión del 3-ceto-ácido intermedio en el subproducto de 3-hidroxiácido es una cetorreductasa. En una realización ilustrativa, la cetorreductasa es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR). En una realización ilustrativa adicional, la 3-cetoácido reductasa es la proteína YMR226C (SEQ ID NO: 1) de *S. cerevisiae*, o un homólogo o una variante de la misma. En una realización, el homólogo puede seleccionarse del grupo que consiste en *Vanderwaltozyma polyspora* (SEQ ID NO: 2), *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 3), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 4), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 5), *Zygosaccharomyces rouxii* (SEQ ID NO: 6), *K. lactis* (SEQ ID NO: 7), *Ashbya gossypii* (SEQ ID NO: 8), *Saccharomyces kluyveri* (SEQ ID NO: 9), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 10), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 11), *Pichia stipitis* (SEQ ID NO: 12), *Debaromyces hansenii* (SEQ ID NO: 13), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 14), *Candida dubliniensis* (SEQ ID NO: 15), *Candida albicans* (SEQ ID NO: 16), *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID NO: 17), *Issatchenkia orientalis* (SEQ ID NO: 18), *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO: 19), *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 20), *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 21), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 22) y *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 23).

En diferentes realizaciones descritas en el presente documento, la proteína que participa en la catalización de la conversión de un aldehído en un subproducto ácido es una aldehído deshidrogenasa (ALDH). En una realización, la aldehído deshidrogenasa es codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste en *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5*, *ALD6* y *HFD1*, y homólogos y variantes de los mismos. En una realización ilustrativa, la aldehído deshidrogenasa es la aldehído deshidrogenasa *ALD6* (SEQ ID NO: 25) de *S. cerevisiae*, o un homólogo o una variante de la misma. En una realización, el homólogo se puede seleccionar del grupo que consiste en *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 26), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 27), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 28), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 29), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 30), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 31), *Saccharomyces cerevisiae* YJ789 (SEQ ID NO: 32), *Saccharomyces cerevisiae* JAY291 (SEQ ID NO: 33), *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (SEQ ID NO: 34), *Saccharomyces cerevisiae* DBY939 (SEQ ID NO: 35), *Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631 (SEQ ID NO: 36), *Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a (SEQ ID NO: 37), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 38), *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 39), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 40) y *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 41).

Los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento que producen un metabolito beneficioso derivado de una vía biosintética que usa un 3-ceto-ácido y un aldehído como producto intermedio se pueden modificar mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la actividad enzimática para la conversión de piruvato en productos distintos de un 3-ceto-ácido (por ejemplo, acetolactato y/o 2-aceto-2-hidroxi-butarato). En una realización, la actividad enzimática de la piruvato descarboxilasa (PDC), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato oxidasa, piruvato deshidrogenasa y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) se reduce o elimina.

En una realización específica, el metabolito beneficioso se produce en un microorganismo de levadura GPD⁻ PDC⁻ recombinante que sobreexpresa un gen de acetolactato sintasa (ALS). En otra realización específica, la ALS está codificado por *alsS* de *B. subtilis*.

Realizaciones ilustrativas de estrategias para reducir la acumulación de subproductos de 3-hidroxiácidos y/o subproductos ácidos

En una realización ilustrativa específica, el microorganismo recombinante comprende una vía metabólica productora de isobutanol de la que el acetolactato y el isobutiraldehído son productos intermedios, en la que dicho microorganismo recombinante está sustancialmente libre de enzimas que catalizan la conversión del acetolactato intermedio en DH2MB y del isobutiraldehído intermedio en isobutirato. En otra realización específica, el microorganismo recombinante comprende una vía metabólica productora de isobutanol de la que el acetolactato y el isobutiraldehído son productos intermedios, en la que dicho microorganismo recombinante está (i) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una o más enzimas que catalizan la conversión de acetolactato en DH2MB; e (ii) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una o más enzimas que catalizan la conversión del isobutiraldehído en isobutirato. En una realización, la enzima que cataliza la conversión de acetolactato en DH2MB es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR). En otra realización, la enzima que cataliza la conversión del isobutiraldehído en isobutirato es una aldehído deshidrogenasa (ALDH). En la Figura 5, se muestra un ejemplo no limitante de una vía de este tipo, en la que se eliminan una 3-cetoácido reductasa (3-KAR) y una aldehído deshidrogenasa (ALDH).

En una realización ilustrativa específica adicional, el microorganismo recombinante comprende una vía metabólica productora de 3-metil-1-butanol de la que el acetolactato y el 3-metil-1-butanal son productos intermedios, en la que dicho microorganismo recombinante está sustancialmente libre de enzimas que catalizan la conversión del acetolactato intermedio en DH2MB y del 3-metil-1-butanal intermedio en 3-metil-1-butirato. En otra realización específica, el microorganismo recombinante comprende una vía metabólica productora de 3-metil-1-butanol de la que el acetolactato y el 3-metil-1-butanal son productos intermedios, en la que dicho microorganismo recombinante está

(i) modificado por ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una o más enzimas que catalizan la conversión del acetolactato en DH2MB; e (ii) modificado por ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una o más enzimas que catalizan la conversión de 3-metil-1-butanal en 3-metil-1-butirato. En una realización, la enzima que cataliza la conversión de acetolactato en DH2MB es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR). En otra realización, la enzima que cataliza la conversión de 3-metil-1-butanal en 3-metil-1-butirato es una aldehído deshidrogenasa (ALDH). En la Figura 6, se muestra un ejemplo no limitante de dicha vía, en el que se eliminan una 3-cetoácido reductasa (3-KAR) y una aldehído deshidrogenasa (ALDH).

En una realización ilustrativa específica adicional, el microorganismo recombinante comprende una vía metabólica productora de 2-metil-1-butanol de la que el acetolactato y el 2-metil-1-butanal son productos intermedios, en la que dicho microorganismo recombinante está sustancialmente libre de enzimas que catalizan la conversión del 2-aceto-2-hidroxi-2-butanal intermedio en 2-etil-2,3-dihidroxi-2-butanal y del 2-metil-1-butanal intermedio en 2-metil-1-butirato. En otra realización específica, el microorganismo recombinante comprende una vía metabólica productora de 2-metil-1-butanol de la que 2-aceto-2-hidroxi-2-butanal y 2-metil-1-butanal son productos intermedios, en la que dicho microorganismo recombinante está (i) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una o más enzimas que catalizan la conversión del 2-aceto-2-hidroxi-2-butanal en 2-etil-2,3-dihidroxi-2-butanal; e (ii) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una o más enzimas que catalizan la conversión del 2-metil-1-butanal en 2-metil-1-butirato. En una realización, la enzima que cataliza la conversión de 2-aceto-2-hidroxi-2-butanal en 2-etil-2,3-dihidroxi-2-butanal es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR). En otra realización, la enzima que cataliza la conversión del 2-metil-1-butanal en 2-metil-1-butirato es una aldehído deshidrogenasa (ALDH). En la Figura 7, se muestra un ejemplo no limitante de dicha vía, en el que se eliminan una 3-cetoácido reductasa (3-KAR) y una aldehído deshidrogenasa (ALDH).

Sobreexpresión de enzimas que convierten DH2MB en productos intermedios de la vía del isobutanol

Un enfoque diferente para reducir o eliminar la producción de ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (CAS n.º 14868-24-7) en la levadura productora de isobutanol es sobreexpresar una enzima que convierte DH2MB en un producto intermedio de la vía del isobutanol. Una forma de lograr esto es mediante el uso de una enzima que cataliza la interconversión del DH2MB y acetolactato, pero favorece la oxidación de DH2MB. Por lo tanto, en el presente documento, también se describe un microorganismo recombinante para producir isobutanol, en el que dicho microorganismo recombinante sobreexpresa una proteína endógena o heteróloga capaz de convertir DH2MB en acetolactato.

En una realización, la proteína endógena o heteróloga favorece cinéticamente la reacción oxidativa. En otra realización, la proteína endógena o heteróloga tiene un bajo K_M para DH2MB y un alto K_M para el acetolactato. En otra realización más, la proteína endógena o heteróloga tiene un bajo K_M para la forma oxidada de su cofactor y un alto K_M para la forma reducida correspondiente de su cofactor. En otra realización más, la proteína endógena o heteróloga tiene un k_{cat} más alto para la reacción oxidativa que para la dirección reductora. Esta proteína endógena o heteróloga debe tener preferentemente la capacidad de usar un cofactor redox con una alta concentración de su forma oxidada en comparación con su forma reducida.

En una realización, la proteína endógena o heteróloga está codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste en YAL060W, YJR159W, YGL157W, YBL114W, YOR120W, YKL055C, YBR159W, YBR149W, YDL168W, YDR368W, YLR426W, YCR107W, YILL24W, YML054C, YOL151W, YMR318c, YBR046C, YHR104W, YIR036C, YDL174C, YDR541C, YBR145W, YGL039W, YCR105W, YDL124W, YIR035C, YFL056C, YNL274c, YLR255C, YGL185C, YGL256W, YJR096W, YJR155W, YPL275W, YOR388C, YLR070C, YMR083W, YER081W, YJR139C, YDL243C, YPL113C, YOL165C, YML086C, YMR303C, YDL246C, YLR070C, YHR063C, YNL331C, YFL057C, YIL155C, YOL086C, YAL061W, YDR127W, YPR127W, YCL018W, YIL074C, YIL124W y YEL071W. Además, Los genes heterólogos se pueden sobreexpresar en levaduras productoras de isobutanol. Por ejemplo, las beta-hidroxiácido deshidrogenasas (EC1.1.1.45 y EC1.1.1.60) serían candidatas para la sobreexpresión.

En otra realización, la proteína endógena o heteróloga cinética que favorece la reacción reductora está modificada por ingeniería genética para favorecer la reacción oxidativa. En otra realización, la proteína está modificada por ingeniería genética para tener una K_M baja para DH2MB y una K_M alta para el acetolactato. En otra realización más, la proteína está modificada por ingeniería genética para tener una K_M baja para la forma oxidada de su cofactor y una K_M alta para la forma reducida correspondiente de su cofactor. En otra realización más, la proteína está modificada por ingeniería genética para tener una k_{cat} más alta para la reacción oxidativa que para la dirección reductora. Esta proteína modificada por ingeniería genética debe tener preferentemente la capacidad de usar un cofactor redox con una alta concentración de su forma oxidada en comparación con su forma reducida.

Como alternativa, se podría sobreexpresar una enzima que isomerizara DH2MB en DHIV. Este enfoque representa una nueva vía para la producción de isobutanol a partir de piruvato. Por lo tanto, en una realización, la presente solicitud describe un microorganismo recombinante para producir isobutanol, en el que dicho microorganismo recombinante sobreexpresa una proteína endógena o heteróloga capaz de convertir DH2MB en 2,3-dihidroxiisovalerato.

Sobreexpresión de enzimas que convierten 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato en productos intermedios de la vía biosintética

Un enfoque diferente para reducir o eliminar la producción de 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato en levaduras es la sobreexpresión de una enzima que convierte el 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato en un producto intermedio de la vía biosintética. Este enfoque es útil para cualquier vía biosintética que utilice 2-aceto-2-hidroxi-butirato como producto intermedio, incluyendo, pero sin limitación, 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol. Una forma de lograr esto es mediante el uso de una enzima que cataliza la interconversión de 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato y 2-aceto-2-hidroxi-butirato, pero favorece la oxidación del 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un producto seleccionado entre 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol, en la que dicho microorganismo recombinante sobreexpresa una proteína endógena o heteróloga capaz de convertir el 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato en 2-aceto-2-hidroxi-butirato.

En una realización, la proteína endógena o heteróloga favorece cinéticamente la reacción oxidativa. En otra realización, la proteína endógena o heteróloga tiene un bajo K_M para 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato y un alto K_M para el 2-aceto-2-hidroxi-butirato. En otra realización más, la proteína endógena o heteróloga tiene un bajo K_M para la forma oxidada de su cofactor y un alto K_M para la forma reducida correspondiente de su cofactor. En otra realización más, la proteína endógena o heteróloga tiene un k_{cat} más alto para la reacción oxidativa que para la dirección reductora. Esta proteína endógena o heteróloga debe tener preferentemente la capacidad de usar un cofactor redox con una alta concentración de su forma oxidada en comparación con su forma reducida.

En una realización, la proteína endógena o heteróloga está codificada por un gen seleccionado del grupo que consiste en YAL060W, YJR159W, YGL157W, YBL114W, YOR120W, YKL055C, YBR159W, YBR149W, YDL168W, YDR368W, YLR426W, YCR107W, YILL24W, YML054C, YOL151W, YMR318c, YBR046C, YHR104W, YIR036C, YDL174C, YDR541C, YBR145W, YGL039W, YCR105W, YDL124W, YIR035C, YFL056C, YNL274c, YLR255C, YGL185C, YGL256W, YJR096W, YJR155W, YPL275W, YOR388C, YLR070C, YMR083W, YER081W, YJR139C, YDL243C, YPL113C, YOL165C, YML086C, YMR303C, YDL246C, YLR070C, YHR063C, YNL331C, YFL057C, YIL155C, YOL086C, YAL061W, YDR127W, YPR127W, YCL018W, YIL074C, YIL124W y YEL071W. Además, se pueden sobreexpresar genes heterólogos en levaduras productoras de isoleucina. Por ejemplo, las beta-hidroxiácido deshidrogenasas (EC1.1.1.45 y EC1.1.1.60) serían candidatas para la sobreexpresión.

Como alternativa, se podría sobreexpresar una enzima que isomerice 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato en 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato. Este enfoque representa una nueva vía para la producción de 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, y 5-metil-1-heptanol a partir de piruvato. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante para producir un producto seleccionado entre 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol, en la que dicho microorganismo recombinante sobreexpresa una proteína endógena o heteróloga capaz de convertir el 2-etil-2,3-dihidroxi-butanoato en α,β -dihidroxi- β -metilvalerato.

Uso de cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) sobreexpresada y/o cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) modificada para reducir la producción de DH2MB

Como se describe en el presente documento, la conversión del acetolactato en DH2MB compete con la vía del isobutanol por el acetolactato intermedio. En las cepas actuales de producción de isobutanol de levadura, la cetol-ácido reductoisomerasa (KARI) cataliza la conversión del acetolactato en DHIV.

En el presente documento, también se describen microorganismos recombinantes que tienen una cetol-ácido reductoisomerasa sobreexpresada (KARI), que cataliza la conversión del acetolactato en 2,3-dihidroxiisovalerato (DHIV). La sobreexpresión de KARI tiene el efecto de reducir la producción de DH2MB. En una realización, KARI tiene al menos 0,01 U/mg de actividad en el lisado. En otra realización, la KARI tiene al menos 0,03 U/mg de actividad en el lisado. En otra realización más, la KARI tiene al menos 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 5 o 10 U/mg de actividad en el lisado.

En una realización preferida, la KARI sobreexpresado está modificada mediante ingeniería genética para presentar una K_M reducida para el acetolactato en comparación con una KARI de tipo silvestre o parental. Se espera que el uso de la KARI modificada con una K_M más baja para el acetolactato reduzca la producción del subproducto de DH2MB. Una KARI con una K_M del sustrato inferior se identifica mediante la selección de homólogos. Como alternativa, la KARI puede modificarse por ingeniería genética para presentar una K_M reducida por evolución dirigida utilizando técnicas conocidas en la técnica.

En cada una de estas realizaciones, la KARI puede ser una variante enzimática que utilice NADH (en lugar de NADPH) como un cofactor. Dichas enzimas se describen en la publicación del mismo solicitante en trámite junto con la presente, US 2010/0143997.

Uso de la dihidróxido deshidratasa (DHAD) sobreexpresada para reducir la producción de DH2MB

Como se describe en el presente documento, los presentes inventores han descubierto que la sobreexpresión de la

enzima de la vía del isobutanol, dihidroxiácido deshidratasa (DHAD), reduce la producción del subproducto, DH2MB.

Por consiguiente, en una realización, la presente solicitud describe microorganismos recombinantes que tienen una dihidroxiácido deshidratasa (DHAD) que cataliza la conversión de 2,3-dihidroxiisovalerato (DHIV) en 2-cetoisovalerato (KIV). La sobreexpresión de DHAD tiene el efecto de reducir la producción de DH2MB. En una realización, la DHAD tiene al menos 0,01 U/mg de actividad en el lisado. En otra realización, la DHAD tiene al menos 0,03 U/mg de actividad en el lisado. En otra realización más, la DHAD tiene al menos 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 5 o 10 U/mg de actividad en el lisado.

Microorganismos recombinantes para la producción de 3-hidroxiácidos

La presente solicitud describe, en aspectos adicionales, microorganismos recombinantes para la producción de 3-hidroxiácidos como un producto o un producto intermedio metabólico. En una realización, estos microorganismos recombinantes productores de 3-hidroxiácidos expresan acetolactato sintasa (ALS) y una 3-cetoácido reductasa que cataliza la reducción de 2-aceto-actato en DH2MB. En otra realización, estos microorganismos recombinantes productores de 3-hidroxiácidos expresan acetolactato sintasa (ALS) y una 3-ceto-ácido reductasa que cataliza la reducción del 2-aceto-2-hidroxibutirato en 2-etil-2,3-dihidroxibutirato.

Estos microorganismos recombinantes productores de 3-hidroxiácidos pueden ser modificados por ingeniería genética además para reducir o eliminar la actividad enzimática para la conversión de piruvato en productos distintos al acetolactato. En una realización, la actividad enzimática de la piruvato descarboxilasa (PDC), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato oxidasa, piruvato deshidrogenasa y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) se reduce o elimina.

En una realización específica, DH2MB se produce en un microorganismo de levadura GPD⁻ PDC⁻ recombinante que sobreexpresa un gen ALS y expresa una 3-cetoácido reductasa. En una realización, la 3-cetoácido reductasa se expresa de forma nativa. En otra realización, la 3-cetoácido reductasa se expresa de manera heteróloga. En otra realización más, la 3-cetoácido reductasa está sobreexpresada. En una realización específica, la 3-ceto-ácido reductasa está codificada por el gen *TMA29* de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo. En otra realización específica, la ALS está codificado por AlsS de *B. subtilis*.

En otra realización específica, el 2-etil-2,3-dihidroxibutirato se produce en un microorganismo de levadura GPD⁻ PDC⁻ recombinante que sobreexpresa un gen ALS y expresa una 3-cetoácido reductasa. En una realización, la 3-cetoácido reductasa se expresa de forma nativa. En otra realización, la 3-cetoácido reductasa se expresa de manera heteróloga. En otra realización más, la 3-cetoácido reductasa está sobreexpresada. En una realización específica, la 3-ceto-ácido reductasa está codificada por el gen *TMA29* de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo. En otra realización específica, la ALS está codificado por AlsS de *B. subtilis*.

De acuerdo con estos aspectos adicionales, La presente solicitud también describe un método para producir ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (DH2MB), que comprende: (a) proporcionar un microorganismo recombinante productor de DH2MB que expresa acetolactato sintasa (ALS) y una 3-cetoácido reductasa que cataliza la reducción de 2-acetolactato en DH2MB; y (b) cultivar dicho microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono, hasta que se produzca una cantidad recuperable de DH2MB.

De acuerdo con estos aspectos adicionales, la presente solicitud también describe un método para producir 2-etil-2,3-dihidroxibutirato, que comprende: (a) proporcionar un microorganismo recombinante productor de 2-etil-2,3-dihidroxibutirato que expresa acetolactato sintasa (ALS) y una 3-cetoácido reductasa que cataliza la reducción del 2-aceto-2-hidroxibutirato en 2-etil-2,3-dihidroxibutirato; y (b) cultivar dicho microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono, hasta que se produzca una cantidad recuperable de 2-etil-2,3-dihidroxibutirato.

Microorganismos recombinantes para la producción de productos ácidos

La presente solicitud también describe microorganismos recombinantes para la producción de productos ácidos derivados de aldehídos. En una realización, estos productos ácidos que producen microorganismos recombinantes expresan una aldehído deshidrogenasa que cataliza la conversión de un aldehído en un producto ácido correspondiente. Estos microorganismos recombinantes productores de productos ácidos pueden modificarse por ingeniería genética para reducir o eliminar la actividad enzimática competitiva para la conversión no deseada de metabolitos dirección 5' del producto ácido deseado.

En una realización específica, el producto ácido se produce en un microorganismo de levadura recombinante que sobreexpresa una aldehído deshidrogenasa. En una realización, la aldehído deshidrogenasa se expresa de forma nativa. En otra realización, la aldehído deshidrogenasa se expresa de forma heteróloga. En otra realización más, la aldehído deshidrogenasa está sobreexpresada. En una realización específica, la aldehído deshidrogenasa está codificada por el gen *ALD6* de *S. cerevisiae* o un homólogo del mismo.

De acuerdo con este aspecto adicional, la presente solicitud también describe un método para producir un producto ácido, que comprende: (a) proporcionar un microorganismo recombinante productor de producto ácido que expresa

una aldehído deshidrogenasa que cataliza la conversión de un aldehído en producto ácido; y (b) cultivar dicho microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono, hasta que se produzca una cantidad recuperable del producto ácido deseado.

5 **El microorganismo en general**

Los microorganismos recombinantes proporcionados en el presente documento pueden expresar una pluralidad de enzimas heterólogas y/o nativas que participan en vías para la producción de metabolitos beneficiosos tales como el isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, coenzima A, 2-metil-1-butanol, isoleucina, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol y 1-propanol de una fuente de carbono adecuada. Una lista no limitante de metabolitos beneficiosos producidos en vías biosintéticas modificadas por ingeniería genética se encuentra en las Tablas 1-3.

Como se describe en el presente documento, los microorganismos "modificados por ingeniería genética" o "modificados" se producen a través de la introducción de material genético en un microorganismo hospedador o parental de elección y/o mediante la modificación de la expresión de genes nativos, modificando o alternado así la fisiología celular y la bioquímica del microorganismo. A través de la introducción de material genético y/o la modificación de la expresión de genes nativos, el microorganismo parental adquiere nuevas propiedades, por ejemplo, la capacidad de producir nuevas cantidades, o mayores de, un metabolito intracelular y/o extracelular. Como se describe en el presente documento, la introducción de material genético en y/o la modificación de la expresión de genes nativos en un microorganismo parental genera una capacidad nueva o modificada para producir metabolitos beneficiosos tales como el isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, coenzima A, 2-metil-1-butanol, isoleucina, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol y 1-propanol de una fuente de carbono adecuada. El material genético introducido en y/o los genes modificados para la expresión en el microorganismo parental contiene genes, o partes de genes, que codifican una o más de las enzimas que participan en una vía biosintética para la producción de uno o más metabolitos seleccionados entre isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, coenzima A, 2-metil-1-butanol, isoleucina, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol y 1-propanol, y también pueden incluir elementos adicionales para la expresión y/o regulación de la expresión de estos genes, por ejemplo, secuencias promotoras.

Además de la introducción de un material genético en un microorganismo hospedador o parental, un microorganismo modificado mediante ingeniería genética o modificado también puede incluir la alteración, ruptura, delección o desactivación de un gen o polinucleótido para alterar la fisiología celular y la bioquímica del microorganismo. A través de la alteración, ruptura, delección o desactivación de un gen o polinucleótido, el microorganismo adquiere propiedades nuevas o mejoradas (por ejemplo, la capacidad de producir un nuevo metabolito o mayores cantidades de un metabolito intracelular, para mejorar el flujo de un metabolito por una vía deseada, y/o para reducir la producción de subproductos).

Los microorganismos recombinantes proporcionados en el presente documento también pueden producir metabolitos en cantidades no disponibles en el microorganismo parental. Un "metabolito" se refiere a cualquier sustancia producida por el metabolismo o una sustancia necesaria para o que participa en un determinado proceso metabólico. Un metabolito puede ser un compuesto orgánico que sea un material de partida (por ejemplo, glucosa o piruvato), un producto intermedio (por ejemplo, 2-cetoisovalerato) o un producto final (por ejemplo, isobutanol) del metabolismo. Los metabolitos pueden usarse para construir moléculas más complejas, o pueden descomponerse en moléculas más sencillas. Se pueden sintetizar metabolitos intermedios a partir de otros metabolitos, quizás usados para crear sustancias más complejas, o descomponerse en compuestos más sencillos, a menudo con la liberación de energía química.

La divulgación identifica genes específicos útiles en los métodos, composiciones y organismos de la divulgación; sin embargo, se reconocerá que no es necesaria una identidad absoluta con dichos genes. Por ejemplo, pueden realizarse cambios en un gen o polinucleótido particular que comprende una secuencia que codifica un polipéptido o enzima, y explorarse con respecto a la actividad. Por lo general, dichos cambios comprenden mutaciones conservativas y mutaciones silenciosas. Dichos polinucleótidos y polipéptidos modificados o mutados pueden seleccionarse con respecto a la expresión de una enzima funcional usando métodos conocidos en la técnica.

Debido a la degeneración intrínseca del código genético, también pueden usarse otros polinucleótidos que codifican sustancialmente los mismos polipéptidos o polipéptidos funcionalmente equivalentes para clonar y expresar los polinucleótidos que codifican dichas enzimas.

Como entenderán los expertos en la materia, puede ser ventajoso modificar una secuencia codificante para potenciar su expresión en un hospedador particular. El código genético es redundante con 64 codones posibles, pero la mayoría de los organismos normalmente usan una subserie de estos codones. Los codones que se utilizan con más frecuencia en una especie se denominan codones óptimos, y los no utilizados con mucha frecuencia se clasifican como codones

ratos o de bajo uso. Los codones pueden sustituirse para reflejar el uso de codones preferido del hospedador, en un proceso algunas veces denominado "optimización de codones" o "control de sesgo de codones entre especies".

Se pueden preparar secuencias de codificación optimizadas que contienen codones preferidos por un determinado hospedador procariota o eucariota (Murray *et al.*, 1989, *Nucl Acids Res.* 17: 477-508), por ejemplo, para aumentar la velocidad de traducción o para producir transcritos de ARN recombinante que tengan propiedades deseables, tales como una mayor semivida, en comparación con los transcritos producidos a partir de una secuencia no optimizada. También pueden modificarse codones de terminación de la traducción para reflejar la preferencia por el hospedador. Por ejemplo, son codones de terminación típicos para *S. cerevisiae* y mamíferos UAA y UGA, respectivamente. El codón de terminación típico para plantas monocotiledóneas es UGA, mientras que los insectos y *E. coli* normalmente usan UAA como codón de terminación (Dalphin *et al.*, 1996, *Nucl Acids Res.* 24: 216-8). Se proporciona una metodología para optimizar una secuencia de nucleótidos para la expresión en una planta, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 6.015.891, y las referencias citadas en la misma.

Los expertos en la materia reconocerán que, debido a la naturaleza degenerada del código genético, puede usarse diversos compuestos de ADN que difieren en sus secuencias de nucleótidos para codificar una enzima dada de la divulgación. La secuencia de ADN nativa que codifica las enzimas biosintéticas descritas anteriormente se menciona en el presente documento simplemente para ilustrar una realización de la divulgación, y la divulgación incluye compuestos de ADN de cualquier secuencia que codifica las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos y proteínas de las enzimas utilizadas en los métodos de la divulgación. De forma similar, un polipéptido normalmente puede tolerar una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones e inserciones en su secuencia de aminoácidos sin pérdida o pérdida significativa de una actividad deseada. La divulgación incluye dichos polipéptidos con secuencias de aminoácidos diferentes a las de las proteínas específicas descritas en el presente documento siempre que los polipéptidos modificados o variantes tengan la actividad anabólica o catabólica enzimática del polipéptido de referencia. Además, las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN mostradas en el presente documento simplemente ilustran realizaciones de la divulgación.

Además, Los homólogos de enzimas útiles para generar metabolitos están englobados por los microorganismos y métodos proporcionados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, dos proteínas (o una región de las proteínas) son sustancialmente homólogas cuando las secuencias de aminoácidos tienen al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden ignorarse con fines comparativos). En una realización, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos un 30 %, normalmente al menos un 40 %, más normalmente al menos un 50 %, incluso más normalmente al menos un 60 % e incluso más normalmente al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

Cuando se usa "homólogo" haciendo referencia a proteínas o péptidos, se reconoce que las posiciones de restos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es aquella en la que un resto de aminoácido está sustituido por otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral (grupo R) con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en los que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservativas, el porcentaje de identidad de secuencia o grado de homología puede ajustarse hacia arriba para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos para los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Pearson W. R., 1994, *Methods in Mol Biol* 25: 365-89).

Cada uno de los seis grupos siguientes contienen aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Alanina (A), Valina (V), y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

La homología de secuencia para polipéptidos, que también se denomina porcentaje de identidad de secuencia, se mide normalmente usando un programa informático de análisis de secuencias. Véase la solicitud del mismo solicitante en trámite junto con la presente US 2009/0226991. Un algoritmo típico usado que compara la secuencia de una molécula con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa

informático BLAST. Cuando se busca una base de datos que contiene secuencias de un gran número de organismos diferentes, es típico comparar secuencias de aminoácidos. La búsqueda en la base de datos usando secuencias de aminoácidos se puede medir mediante algoritmos descritos en la solicitud de patente del mismo solicitante en trámite junto con la presente US 2009/0226991.

5 Se entiende que es posible modificar una selección de microorganismos para incluir una vía metabólica recombinante adecuada para la producción de metabolitos beneficiosos a partir de vías biosintéticas que requieren productos intermedios de acetolactato y/o aldehído. En diversas realizaciones, los microorganismos pueden seleccionarse a partir de microorganismos de levadura. Microorganismos de levadura para la producción de un metabolito tal como el
10 isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, coenzima A, 2-metil-1-butanol, isoleucina, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol y el 1-propanol se pueden seleccionar en función de ciertas características:

15 Una característica puede incluir la propiedad de que el microorganismo se selecciona para convertir varias fuentes de carbono en metabolitos beneficiosos, tales como el isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, coenzima A, 2-metil-1-butanol, isoleucina, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol y 1-propanol. La expresión "fuente de carbono" se refiere, en general, a una sustancia adecuada para su uso como una
20 fuente de carbono para el crecimiento de células procariotas o eucariotas. Los ejemplos de fuentes de carbono adecuadas se describen en la solicitud del mismo solicitante en trámite junto con la presente US 2009/0226991. Por consiguiente, en una realización, el microorganismo recombinante descrito en el presente documento puede convertir varias fuentes de carbono en productos, incluyendo, pero sin limitación, glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, lactosa, sacarosa y mezclas de las mismas.

25 El microorganismo recombinante puede incluir además una vía para la producción de isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, coenzima A, 2-metil-1-butanol, isoleucina, 1-pentanol, 1-hexanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol, 5-metil-1-heptanol y 1-propanol a partir de azúcares de cinco átomos de carbono (pentosa), incluyendo la
30 xilosa. La mayoría de las especies de levadura metabolizan la xilosa a través de una vía compleja, en la que la xilosa se reduce primero a xilitol a través de una enzima xilosa reductasa (XR). El xilitol se oxida luego a xilulosa a través de una enzima xilitol deshidrogenasa (XDH). La xilulosa se fosforila a través de una enzima xiluloquinasa (XK). Esta vía opera de manera ineficaz en las especies de levadura, porque introduce un desequilibrio redox en la célula. La etapa de xilosa a xilitol usa la NADH como cofactor, mientras que la etapa de xilitol a xilulosa usa NADPH como cofactor.
35 Otros procesos deben funcionar para restablecer el desequilibrio redox dentro de la célula. Esto a menudo significa que el organismo no puede crecer anaeróbicamente en xilosa ni en otros azúcares pentosa. Por consiguiente, es muy deseable una especie de levadura que pueda fermentar eficazmente la xilosa y otros azúcares pentosa en un producto de fermentación deseado.

40 Por lo tanto, en un aspecto, el microorganismo recombinante está modificado mediante ingeniería genética para expresar una xilosa isomerasa exógena funcional. Las xilosa isomerasas exógenas funcionales en levaduras son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Rajgarhia *et al.*, documento US2006/0234364. En una realización de acuerdo con este aspecto, el gen de la xilosa isomerasa exógena está unido operativamente a secuencias promotoras y terminadoras que son funcionales en la célula de levadura. En una realización preferida, el microorganismo
45 recombinante tiene además una delección o alteración de un gen nativo que codifica una enzima (por ejemplo, XR y/o XDH) que cataliza la conversión de xilosa en xilitol. En una realización preferida adicional, el microorganismo recombinante también contiene un gen de la xiluloquinasa (XK) exógeno funcional ligado operativamente a las secuencias del promotor y del terminador que son funcionales en la célula de levadura. En una realización, el gen de la xiluloquinasa (XK) está sobreexpresado.

50 En una realización, el microorganismo tiene actividad piruvato descarboxilasa (PDC) reducida o nula. La PDC cataliza la descarboxilación del piruvato en acetaldehído, que luego es reducido en etanol por la ADH a través de una oxidación de NADH en NAD⁺. La producción de etanol es la principal vía para oxidar la NADH de la glucólisis. La eliminación de esta vía aumenta el piruvato y los equivalentes reductores (NADH) disponibles para la vía biosintética. Por
55 consiguiente, la delección de los genes *PDC* puede aumentar aún más el rendimiento de los metabolitos deseados.

En otra realización, el microorganismo tiene una actividad glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) reducida o nula. La GPD cataliza la reducción de la fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) en glicerol-3-fosfato (G3P) a través de la oxidación de NADH en NAD⁺. El glicerol se produce luego a partir de G3P mediante glicerol-3-fosfatasa (GPP). La
60 producción de glicerol es una vía secundaria para oxidar el exceso de NADH de la glucólisis. La reducción o eliminación de esta vía aumentaría el piruvato y los equivalentes reductores (NADH) disponibles para la vía biosintética. Por lo tanto, la delección de los genes *GPD* puede aumentar aún más el rendimiento de los metabolitos deseados.

En otra realización más, el microorganismo tienen actividad de PDC reducida o nula, y actividad de GPD reducida o
65 nula. Las cepas de producción de levadura PDC/GPD⁻ se describen en las publicaciones del mismo solicitante en trámite junto con la presente US 2009/0226991 y US 2011/0020889.

En una realización, los microorganismos de levadura pueden seleccionarse del "clado de las levaduras de *Saccharomyces*", como se describe en la solicitud del mismo solicitante en trámite junto con la presente US 2009/0226991.

La expresión grupo taxonómico "*Saccharomyces* en sentido estricto" es un grupo de especies de levadura que están altamente relacionadas con *S. cerevisiae* (Rainieri *et al.*, 2003, *J. Biosci Bioengin* 96: 1-9). Las especies de levaduras *Saccharomyces* en sentido estricto incluyen, pero sin limitación, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. uvarum*, *S. carocanis* e híbridos derivados de estas especies (Masneuf *et al.*, 1998, *Yeast* 7: 61-72).

Se produjo un evento antiguo de duplicación del genoma completo (WGD) durante la evolución de la levadura hemiascomiceta, y se descubrió usando herramientas genómicas comparativas (Kellis *et al.*, 2004, *Nature* 428: 617-24; Dujon *et al.*, 2004, *Nature* 430:35-44; Langkjaer *et al.*, 2003, *Nature* 428: 848-52; Wolfe *et al.*, 1997, *Nature* 387: 708-13). Usando este gran evento evolutivo, la levadura se puede dividir en especies que divergieron de un ancestro común después del evento de WGD (denominadas "levadura post-WGD" en el presente documento) y especies que divergieron del linaje de la levadura antes del evento de WGD (denominadas "levadura pre-WGD" en el presente documento).

Por consiguiente, en una realización, el microorganismo de levadura puede seleccionarse de un género de levaduras post-WGD, incluyendo, pero sin limitación, *Saccharomyces* y *Candida*. Las especies de levadura post-WGD favorecidas incluyen: *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. castell*, y *C. glabrata*.

En otra realización, el microorganismo de levadura puede seleccionarse de un género de levaduras previas a la duplicación del genoma completo (pre-WGD) que incluye, pero sin limitación, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Yarrowia* y *Schizosaccharomyces*. Las especies representativas de levadura pre-WGD incluyen: *S. kluyveri*, *K. thermotolerans*, *K. marxianus*, *K. waltii*, *K. lactis*, *C. tropicalis*, *P. pastoris*, *P. anomala*, *P. stipitis*, *I. orientalis*, *I. occidentalis*, *I. scutulata*, *D. hansenii*, *H. anomala*, *Y. lipolytica* y *S. pombe*.

Un microorganismo de levadura puede ser Crabtree negativo o Crabtree positivo como se describe en la solicitud del mismo solicitante en trámite junto con la presente US 2009/0226991. En una realización, el microorganismo de levadura puede seleccionarse de levadura con un fenotipo Crabtree negativo que incluye, entre otros, los siguientes géneros: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Issatchenkia*, *Hansenula* y *Candida*. Las especies Crabtree-negativas incluyen, pero sin limitación: *S. kluyveri*, *K. lactis*, *K. marxianus*, *P. anomala*, *P. stipitis*, *I. orientalis*, *I. occidentalis*, *I. scutulata*, *H. anomala* y *C. utilis*. En otra realización, el microorganismo de levadura puede seleccionarse de levadura con un fenotipo Crabtree-positivo, incluyendo, pero sin limitación, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia* y *Schizosaccharomyces*. Las especies de levadura Crabtree positivas incluyen, pero sin limitación: *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. castelli*, *K. thermotolerans*, *C. glabrata*, *Z. bailli*, *Z. rouxii*, *D. hansenii*, *P. pastoris* y *S. pombe*.

Otra característica puede incluir la propiedad de que el microorganismo sea no fermentador. En otras palabras, no puede metabolizar anaeróbicamente una fuente de carbono, mientras que la levadura es capaz de metabolizar una fuente de carbono en presencia de oxígeno. La levadura no fermentadora se refiere tanto a las levaduras naturales como a las levaduras genéticamente modificadas. Durante la fermentación anaeróbica con levadura fermentativa, la principal vía para oxidar la NADH de la glucólisis es a través de la producción de etanol. El etanol es producido por la alcohol deshidrogenasa (ADH) a través de la reducción del acetaldehído que es generado a partir del piruvato por piruvato descarboxilasa (PDC). En una realización, se puede modificar por ingeniería genética una levadura fermentativa para que no sea fermentativa mediante la reducción o eliminación de la actividad de PDC nativa. Por lo tanto, la mayor parte del piruvato producido por la glucólisis no es consumido por PDC, y está disponible para la vía del isobutanol. La eliminación de esta vía aumenta el piruvato y los equivalentes reductores disponibles para la vía biosintética. Las vías fermentativas contribuyen al bajo rendimiento y la baja productividad de los metabolitos deseados, tales como el isobutanol. Por consiguiente, la delección de los genes *PDC* puede aumentar el rendimiento y la productividad de los metabolitos deseados tales como el isobutanol.

En algunas realizaciones, los microorganismos recombinantes pueden ser microorganismos que son microorganismos de levadura no fermentadores, incluyendo, pero sin limitación, los clasificados en un género seleccionado del grupo que consiste en *Tricosporon*, *Rhodotorula*, *Myxozyma* o *Candida*. En una realización específica, la levadura no fermentadora es *C. xestobii*.

Microorganismos de levadura productores de isobutanol

Como se describe en el presente documento, en una realización, se modifica por ingeniería genética un microorganismo de levadura para convertir una fuente de carbono, tal como glucosa, en piruvato por glucólisis, y el piruvato se convierte en isobutanol a través de una vía metabólica que produce isobutanol (véanse, por ejemplo, los documentos WO/2007/050671, WO/2008/098227 y Atsumi *et al.*, 2008, *Nature* 45: 86-9). Se han descrito vías alternativas para la producción del isobutanol en el documento WO/2007/050671 y en Dickinson *et al.*, 1998, *J Biol*

Chem 273:25751-6.

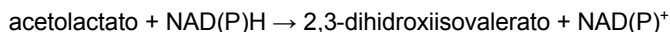
Por consiguiente, en una realización, la vía metabólica que produce isobutanol para convertir el piruvato en isobutanol puede estar compuesta por las siguientes reacciones:

5

1.



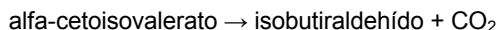
2.



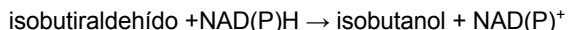
3.



4.



5.



Estas reacciones son llevadas a cabo por las enzimas 1) AcetoLactato Sintasa (ALS), 2) Cetol-ácido Reducto-Isomerasa (KARI), 3) Dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD), 4) Ceto-isovalerato descarboxilasa (KIVD) y 5) una alcohol deshidrogenasa (ADH) (Figura 1). En otra realización, el microorganismo de levadura se modifica mediante ingeniería genética para sobreexpresar estas enzimas. Por ejemplo, estas enzimas pueden ser codificadas por genes nativos. Como alternativa, estas enzimas pueden ser codificadas por genes heterólogos. Por ejemplo, la ALS puede ser codificada por el gen *alsS* de *B. subtilis*, *alsS* de *L. lactis*, o el gen *ilvK* de *K. pneumonia*. Por ejemplo, KARI puede ser codificada por los genes *ilvC* de *E. coli*, *C. glutamicum*, *M. maripaludis* o *Piromyces sp E2*. Por ejemplo, DHAD puede ser codificada por los genes *ilvC* de *E. coli*, *C. glutamicum* o *L. lactis*. Por ejemplo, KIVD puede estar codificada por el gen *kivD* de *L. lactis*. ADH puede ser codificada por *ADH2*, *ADH6* o *ADH7* de *S. cerevisiae* o *adhA* de *L. lactis*.

En una realización, las etapas 2 y 5 de la vía pueden ser llevadas a cabo por enzimas KARI y ADH que utilizan NADH (en lugar de NADPH) como un cofactor. Dichas enzimas se describen en la publicación del mismo solicitante en trámite junto con la presente, documento US 2010/0143997. Los presentes inventores han encontrado que la utilización de enzimas KARI y ADH dependientes de NADH para catalizar las etapas 2 y 5 de la vía, respectivamente, sorprendentemente, permite la producción de isobutanol en condiciones anaeróbicas. Por lo tanto, en una realización, los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento pueden usar una KARI dependiente de NADH para catalizar la conversión del acetolactato (+NADH) para producir 2,3-dihidroxiisovalerato. En otra realización, los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento pueden usar una ADH dependiente de NADH para catalizar la conversión del isobutiraldehído (+NADH) para producir isobutanol. En otra realización más, los microorganismos recombinantes descritos en el presente documento pueden usar una KARI dependiente de NADH para catalizar la conversión del acetolactato (+NADH) para producir 2,3-dihidroxiisovalato, y una ADH dependiente de NADH para catalizar la conversión del isobutiraldehído (+NADH) para producir isobutanol.

En otra realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener una mayor capacidad para convertir el piruvato en isobutanol. En una realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener una mayor capacidad para convertir el piruvato en isobutiraldehído. En otra realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener una mayor capacidad de convertir el piruvato en ceto-isovalerato. En otra realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener una mayor capacidad para convertir el piruvato en 2,3-dihidroxiisovalerato. En otra realización, el microorganismo de levadura puede modificarse por ingeniería genética para tener una mayor capacidad para convertir el piruvato en acetolactato.

Además, cualquiera de los genes que codifican las enzimas anteriores (o cualquier otra mencionada en el presente documento) (o cualquiera de los elementos reguladores que controlan o modulan su expresión)) puede optimizarse por técnicas de modificación por ingeniería genética/de proteínas, tales como evolución dirigida o mutagénesis racional, que se conocen por los expertos en la materia. Dicha acción permite a los expertos en la materia optimizar las enzimas para su expresión y actividad en levaduras.

Además, pueden identificarse genes que codifican estas enzimas a partir de otras especies fúngicas y bacterianas y pueden expresarse para la modulación de esta vía. Diversos organismos podrían servir como fuentes para estas enzimas, incluyendo, pero sin limitación, *Saccharomyces* sp., incluyendo *S. cerevisiae* y *S. uvarum*, *Kluyveromyces* sp., incluyendo *K. thermotolerans*, *K. lactis* y *K. marxianus*, *Pichia* sp., *Hansenula* sp., incluyendo *H. polymorpha*, *Candida* sp., *Trichosporon* sp., *Yamadazyma* sp., incluyendo *Y. sp. stipitis*, *Torulaspora pretoriensis*, *Issatchenkia orientalis*, *Schizosaccharomyces* sp., incluyendo *S. pombe*, *Cryptococcus* sp., *Aspergillus* sp., *Neurospora* sp. o *Ustilago* sp. Las fuentes de genes de hongos anaeróbicos incluyen, pero sin limitación, *Piromyces* sp., *Orpinomyces* sp. o *Neocallimastix* sp. Las fuentes de enzimas procariotas que son útiles incluyen, pero sin limitación, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Lactococcus* sp., *Enterobacter* sp. y *Salmonella* sp.

En una realización, la invención se dirige a un microorganismo recombinante para producir isobutanol, en la que dicho microorganismo recombinante comprende una vía metabólica que produce isobutanol y en la que dicho microorganismo está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en DH2MB, como se expone en las reivindicaciones. En una realización específica, la 3-cetoácido reductasa está codificada por el gen *TMA29* de *S. cerevisiae* (YMR226C) o un homólogo del mismo como se establece en las reivindicaciones. En una realización, el homólogo puede seleccionarse del grupo que consiste en *Vanderwaltozyma polyspora* (SEQ ID NO: 2), *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 3), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 4), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 5), *Zygosaccharomyces rouxii* (SEQ ID NO: 6), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 7), *Ashbya gossypii* (SEQ ID NO: 8), *Saccharomyces kluyveri* (SEQ ID NO: 9), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 10), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 11), *Pichia stipitis* (SEQ ID NO: 12), *Debaromyces hansenii* (SEQ ID NO: 13), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 14), *Candida dubliniensis* (SEQ ID NO: 15), *Candida albicans* (SEQ ID NO: 16), *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID NO: 17), *Issatchenkia orientalis* (SEQ ID NO: 18), *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO: 19), *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 20), *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 21), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 22) y *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 23).

En el presente documento, también se describe un microorganismo recombinante para producir isobutanol, en el que dicho microorganismo recombinante comprende una vía metabólica que produce isobutanol y en la que dicho microorganismo está modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del isobutirinaldehído en isobutirato. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza la conversión de isobutirinaldehído en isobutirato es una aldehído deshidrogenasa. En una realización ilustrativa, la aldehído deshidrogenasa es la aldehído deshidrogenasa ALD6 (SEQ ID NO: 25) de *S. cerevisiae*, o un homólogo o una variante de la misma. En una realización, el homólogo se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 26), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 27), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 28), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 29), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 30), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 31), *Saccharomyces cerevisiae* YJ789 (SEQ ID NO: 32), *Saccharomyces cerevisiae* JAY291 (SEQ ID NO: 33), *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (SEQ ID NO: 34), *Saccharomyces cerevisiae* DBY939 (SEQ ID NO: 35), *Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631 (SEQ ID NO: 36), *Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a (SEQ ID NO: 37), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 38), *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 39), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 40) y *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 41).

En el presente documento, también se describe un microorganismo recombinante para producir isobutanol, en el que dicho microorganismo recombinante comprende una vía metabólica que produce isobutanol y en el que dicho microorganismo está (i) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en DH2MB; e (ii) modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del isobutirinaldehído en isobutirato. En algunas realizaciones, la enzima que cataliza la conversión de acetolactato en DH2MB es una 3-ceto-ácido reductasa (3-KAR). En una realización específica, la 3-ceto-ácido reductasa está codificada por el gen *TMA29* (YMR226C) de *S. cerevisiae*, o un homólogo o una variante del mismo. En una realización, el homólogo se selecciona del grupo que consiste en *Vanderwaltozyma polyspora* (SEQ ID NO: 2), *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 3), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 4), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 5), *Zygosaccharomyces rouxii* (SEQ ID NO: 6), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 7), *Ashbya gossypii* (SEQ ID NO: 8), *Saccharomyces kluyveri* (SEQ ID NO: 9), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 10), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 11), *Pichia stipitis* (SEQ ID NO: 12), *Debaromyces hansenii* (SEQ ID NO: 13), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 14), *Candida dubliniensis* (SEQ ID NO: 15), *Candida albicans* (SEQ ID NO: 16), *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID NO: 17), *Issatchenkia orientalis* (SEQ ID NO: 18), *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO: 19), *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 20), *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 21), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 22) y *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 23). En algunas realizaciones, la enzima que cataliza la conversión de isobutirinaldehído en isobutirato es una aldehído deshidrogenasa. En una realización específica, la aldehído deshidrogenasa es la aldehído deshidrogenasa ALD6 (SEQ ID NO: 25) de *S. cerevisiae*, o un homólogo o una variante de la misma. En una realización, el homólogo se selecciona del grupo que consiste en *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 26), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 27), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 28), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 29), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 30), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 31), *Saccharomyces cerevisiae* YJ789 (SEQ ID NO: 32), *Saccharomyces cerevisiae* JAY291 (SEQ ID NO: 33), *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (SEQ ID NO: 34), *Saccharomyces cerevisiae* DBY939 (SEQ ID NO: 35), *Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631 (SEQ ID NO: 36), *Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a (SEQ ID NO: 37), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 38), *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 39), *Schizosaccharomyces*

pombe (SEQ ID NO: 40) y *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 41).

En una realización, la vía metabólica productora de isobutanol comprende al menos un gen exógeno que cataliza una etapa de la conversión del piruvato en isobutanol. En otra realización, la vía metabólica productora de isobutanol comprende al menos dos genes exógenos que catalizan etapas de la conversión del piruvato en isobutanol. En otra realización más, la vía metabólica productora de isobutanol comprende al menos tres genes exógenos que catalizan etapas de la conversión del piruvato en isobutanol. En otra realización más, la vía metabólica productora de isobutanol comprende al menos cuatro genes exógenos que catalizan etapas de la conversión del piruvato en isobutanol. En otra realización más, la vía metabólica productora de isobutanol comprende cinco genes exógenos que catalizan etapas de la conversión del piruvato en isobutanol.

En una realización, uno o más de los genes de la vía del isobutanol codifican una enzima que se ubica en el citosol. En una realización, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con al menos una enzima de la vía del isobutanol ubicada en el citosol. En otra realización, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con al menos dos enzimas de la vía del isobutanol ubicadas en el citosol. En otra realización más, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con al menos tres enzimas de la vía del isobutanol ubicadas en el citosol. En otra realización más, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con al menos cuatro enzimas de la vía del isobutanol ubicadas en el citosol. En una realización ilustrativa, los microorganismos recombinantes comprenden una vía metabólica que produce isobutanol con cinco enzimas de la vía del isobutanol ubicadas en el citosol. Las vías metabólicas productoras de isobutanol en las que uno o más genes están ubicados en el citosol se describen en la solicitud estadounidense del mismo solicitante en trámite junto con la presente de número de serie 12/855.276.

Expresión de alcohol deshidrogenasas modificadas en la producción de isobutanol

Otra estrategia descrita en el presente documento para reducir la producción del subproducto de isobutirato es aumentar la actividad y/o la expresión de una alcohol deshidrogenasa (ADH) responsable de la conversión del isobutiraldehído en isobutanol. Esta estrategia previene la competencia por enzimas endógenas por el producto intermedio de vía del isobutanol, el isobutiraldehído. Un aumento en la actividad y/o expresión de la ADH se puede lograr mediante diversos medios. Por ejemplo, La actividad de la ADH puede aumentarse utilizando un promotor con una mayor fuerza potenciadora o aumentando el número de copias del gen de la alcohol deshidrogenasa.

En realizaciones alternativas, la producción del subproducto de isobutirato se puede reducir utilizando una ADH con una actividad específica aumentada para el isobutiraldehído. Dichas enzimas ADH con una actividad específica aumentada para el isobutiraldehído pueden identificarse en la naturaleza, o pueden resultar de modificaciones en la enzima ADH, tales como las modificaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, estas modificaciones producirán una disminución en la constante de Michaelis-Menten (K_M) para el isobutiraldehído. Mediante el uso de dichas enzimas ADH modificadas, la competitividad por enzimas endógenas por el isobutiraldehído es aún más limitada. En una realización, el rendimiento del isobutirato (mol de isobutirato por mol de glucosa) en un microorganismo recombinante que comprende una ADH modificada como se describe en el presente documento es inferior a aproximadamente el 5 %. En otra realización, el rendimiento del isobutirato (mol de isobutirato por mol de glucosa) en un microorganismo recombinante que comprende una ADH modificada como se describe en el presente documento es inferior a aproximadamente el 1 %. En otra realización más, el rendimiento de isobutirato (mol de isobutirato por mol de glucosa) en un microorganismo recombinante que comprende una ADH modificada como se describe en el presente documento es inferior a aproximadamente el 0,5 %, inferior a aproximadamente el 0,1 %, inferior a aproximadamente el 0,05 % o inferior a aproximadamente el 0,01 %.

Además, utilizando una enzima ADH modificada, los presentes inventores pueden establecer una situación en la que la reacción directa (es decir, la conversión del isobutiraldehído en isobutanol) sea la reacción preferida frente a la reacción inversa (es decir, la conversión del isobutanol en isobutiraldehído).

Las estrategias descritas anteriormente generalmente conducen a una disminución en el rendimiento del isobutirato, que se acompaña de un aumento en el rendimiento del isobutanol. Por tanto, las estrategias anteriores son útiles para disminuir el rendimiento y/o el título del isobutirato, y para aumentar la proporción de rendimiento de isobutanol frente al rendimiento de isobutirato.

Por consiguiente, en un aspecto, La presente solicitud describe la generación de ADH modificadas con una actividad mejorada que puede facilitar una producción mejorada de isobutanol cuando se expresan conjuntamente con las cuatro enzimas restantes de la vía del isobutanol. En una realización de acuerdo con este aspecto, la presente solicitud está dirigida a microorganismos recombinantes que comprenden una o más ADH modificadas. En una realización, el microorganismo recombinante se modifica mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en DH2MB como se describe en el presente documento. En otra realización, el microorganismo recombinante se modifica mediante ingeniería genética para reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del isobutiraldehído en isobutirato como se describe en el presente documento.

Además de la vía biosintética del isobutanol, otras vías biosintéticas utilizan enzimas ADH para la conversión de un aldehído en un alcohol. Por ejemplo, Las enzimas ADH convierten diferentes aldehídos en alcoholes como parte de las vías biosintéticas para la producción de 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 1-pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-y metil-1-butanol.

Como se usan en el presente documento, el término "ADH", o las expresiones "enzima ADH" o "alcohol deshidrogenasa" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una enzima que cataliza la conversión del isobutiraldehído en isobutanol. Las secuencias de ADH están disponibles en una amplia selección de microorganismos, incluyendo, pero sin limitación, *L. lactis* (SEQ ID NO: 175), *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Las enzimas ADH modificables mediante los métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, las desveladas en la publicación de patente estadounidense del mismo solicitante en trámite junto con la presente n.º 2010/0143997. En la Tabla 97, se puede encontrar una lista representativa de enzimas ADH modificables por los métodos descritos en el presente documento.

Enzimas ADH modificadas

Se puede hacer cualquier número de mutaciones a las enzimas ADH, y en una realización, se pueden hacer múltiples mutaciones para producir una mayor capacidad para convertir el isobutiraldehído en isobutanol. Dichas mutaciones incluyen mutaciones puntuales, mutaciones de marco de lectura, eliminaciones e inserciones, prefiriéndose una o más (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis, etc.) mutaciones puntuales. En una realización ilustrativa, la enzima ADH modificada comprende una o más mutaciones en las posiciones correspondientes a los aminoácidos seleccionados entre: (a) tirosina 50 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (b) glutamina 77 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (c) valina 108 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (d) tirosina 113 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (e) isoleucina 212 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); y (f) leucina 264 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185), estando AdhA (SEQ ID NO: 185) codificada por el gen *adhA* de la alcohol deshidrogenasa de *L. lactis* (ADH) (SEQ ID NO: 184) o una versión optimizada en codones del mismo (SEQ ID NO: 206).

Se pueden introducir mutaciones en las enzimas ADH descritas en el presente documento usando cualquier metodología conocida por los expertos en la materia. Las mutaciones se pueden introducir al azar, por ejemplo, realizando una reacción de PCR en presencia de manganeso como un cofactor de ión metálico divalente. Como alternativa, se puede usar la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para crear las enzimas ADH modificadas que permitan todas las clases posibles de cambios de pares de bases en cualquier sitio determinado a lo largo de la molécula de ADN codificante. En general, esta técnica implica la hibridación de un oligonucleótido complementario (excepto para uno o más emparejamientos erróneos) a una secuencia de nucleótidos monocatenaria que codifica la enzima ADH de interés. El oligonucleótido con emparejamiento erróneo es luego extendido por la ADN polimerasa, generando una molécula de ADN bicatenaria que contiene el cambio deseado en secuencia en una cadena. Los cambios en secuencia pueden, por ejemplo, dar como resultado la delección, sustitución o inserción de un aminoácido. El polinucleótido bicatenario puede entonces insertarse en un vector de expresión apropiado, y así se puede producir un polipéptido mutante o modificado. La mutagénesis dirigida a oligonucleótidos descrita anteriormente puede, por ejemplo, llevarse a cabo mediante PCR.

Las enzimas para su uso en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento incluyen cualquier enzima que tenga la capacidad de convertir el isobutiraldehído en isobutanol. Dichas enzimas incluyen, pero sin limitación, la AdhA de *L. lactis*, la AdhA de *S. pneumoniae*, la AdhA de *S. aureus* y la AdhA de *Bacillus cereus*, entre otras. Las enzimas ADH adicionales modificables por los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, las desveladas en la publicación de patente estadounidense del mismo solicitante en trámite junto con la presente n.º 2010/0143997. En la Tabla 16, se puede encontrar una lista representativa de enzimas ADH modificables por los métodos descritos en el presente documento. Como apreciará el experto en la materia, las enzimas ADH modificadas pueden obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética o recombinantes que son rutinarias y bien conocidas en la técnica. Las enzimas ADH modificadas pueden, por ejemplo, obtenerse mutando el gen o los genes que codifican la enzima ADH de interés mediante mutagénesis dirigida o aleatoria. Dichas mutaciones pueden incluir mutaciones puntuales, mutaciones de delección y mutaciones de inserción. Por ejemplo, se pueden usar una o más mutaciones puntuales (por ejemplo, la sustitución de uno o más aminoácidos con uno o más aminoácidos diferentes) para construir enzimas ADH modificadas.

La solicitud describe además enzimas ADH homólogas que son un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a nivel de los aminoácidos a una enzima ADH de tipo silvestre (por ejemplo, AdhA de *L. lactis* o AdhA de *E. coli*) y que presentan una mayor capacidad para convertir el isobutiraldehído en isobutanol. También se describen en el presente documento enzimas ADH, que son un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a nivel de aminoácidos a una enzima ADH que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 185 y que presentan una mayor capacidad para convertir el isobutiraldehído en isobutanol en comparación con la enzima de tipo silvestre no modificada. La solicitud también describe moléculas de ácido nucleico que codifican las enzimas ADH descritas anteriormente.

La solicitud también describe fragmentos de enzimas ADH que comprenden al menos 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 o 600 restos de aminoácidos y que conservan una o más actividades asociadas con las enzimas ADH. Dichos fragmentos pueden obtenerse mediante mutación por delección, mediante técnicas recombinantes que son rutinarias y bien conocidas en la técnica, o por digestión enzimática de la/s enzima/s ADH de interés usando cualquiera de una serie de enzimas proteolíticas bien conocidas. También se describen en el presente documento moléculas de ácido nucleico que codifican las enzimas ADH modificadas y los fragmentos de enzimas ADH que se han descrito anteriormente.

Por una proteína o fragmento de proteína que tiene al menos una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, un 50 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de referencia, se entiende que la secuencia de aminoácidos de la proteína es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia de proteínas puede incluir hasta 50 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia. En otras palabras, para obtener una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos al menos un 50 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, se puede eliminar o sustituir por otro aminoácido hasta el 50 % de los restos de aminoácido en la secuencia de referencia, o se puede insertar en la secuencia de referencia un número de aminoácidos de hasta el 50 % del total de restos de aminoácidos en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden darse en las posiciones terminales amino (N-) y/o carboxi (C-) de la secuencia de aminoácidos de referencia y/o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los restos en la secuencia de referencia y/o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. En la práctica, si una secuencia de aminoácidos dada es, por ejemplo, al menos un 50 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una proteína de referencia puede determinarse convencionalmente usando programas informáticos conocidos como los descritos anteriormente para las determinaciones de la identidad de secuencia de ácido nucleico, o usando el programa CLUSTAL W (Thompson, J. D., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 22:4673 4680 (1994)).

En un aspecto, las sustituciones de aminoácidos se realizan en una o más de las posiciones identificadas anteriormente (es decir, posiciones de aminoácidos equivalentes o correspondientes a Y50, Q77, V108, Y113, 1212 o L264 de AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185)). Por lo tanto, los aminoácidos en estas posiciones pueden ser sustituidos con cualquier otro aminoácido incluyendo Ala, Asn, Arg, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val. Un ejemplo específico de una enzima ADH que presenta una mayor capacidad para convertir el isobutiraldehído en isobutanol es una ADH en la que (1) la tirosina de la posición 50 se ha reemplazado por un resto de fenilalanina o triptófano; (2) la glutamina de la posición 77 ha sido reemplazada por un resto de arginina o serina; (3) la valina de la posición 108 ha sido reemplazada por un resto de serina o alanina; (4) la tirosina de la posición 113 ha sido reemplazada por un resto de fenilalanina o glicina; (5) la isoleucina de la posición 212 ha sido reemplazada por un resto de treonina o valina; y/o (6) la leucina de la posición 264 ha sido reemplazada por un resto de valina.

Los polipéptidos que tienen la capacidad de convertir el isobutiraldehído en isobutanol pueden aislarse de sus fuentes procariontas o eucariotas naturales de acuerdo con los procedimientos convencionales para aislar y purificar proteínas naturales que son bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Houts, G. E., *et al.*, *J. Virol.* 29:517 (1979)). Además, los polipéptidos que tienen la capacidad de convertir el isobutiraldehído en isobutanol pueden prepararse mediante técnicas de ADN recombinante que son familiares para un experto en la materia (véase, por ejemplo, Kotewicz, M. L., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 16: 265 (1988); Soltis, D. A. y Skalka, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:3372 3376 (1988)).

En un aspecto, Las enzimas ADH modificadas se elaboran mediante técnicas recombinantes. Para clonar un gen u otra molécula de ácido nucleico que codifique una enzima ADH que se vaya a modificar, se pueden usar el ADN aislado que contiene el gen de la enzima ADH o el marco de lectura abierto para construir una biblioteca de ADN recombinante. Se puede usar cualquier vector, bien conocido en la técnica, para clonar la enzima ADH de interés. Sin embargo, el vector usado debe ser compatible con el hospedador en el que se transformará el vector recombinante.

Los vectores procariontas para construir la biblioteca de plásmidos incluyen plásmidos tales como aquellos capaces de realizar la replicación en *E. coli* tales como, por ejemplo, pBR322, ColE1, pSC101, vectores de pUC (pUC18, pUC19, etc.: en: "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982); y en Sambrook *et al.*, en: "Molecular Cloning A Laboratory Manual" (2d ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Los plásmidos de *Bacillus* incluyen pC194, pUB110, pE194, pC221, pC217, etc. Dichos plásmidos son desvelados por Glyczan, T. En: "The Molecular Biology Bacilli", Academic Press, York (1982), 307 329. Los plásmidos de *Streptomyces* adecuados incluyen pIJ 101 (Kendall *et al.*, *J. Bacteriol.* 169:4177 4183 (1987)). También se pueden usar plásmidos de *Pseudomonas* son revisados por John *et al.*, (*Rad. Insec. Dis.* 8:693 704 (1986)) y Igaki, (*Jpn. J. Bacteriol.* 33:729 742 (1978)). También se pueden usar plásmidos o cósmidos de amplio espectro de hospedadores, tales como pCP13 (Darzins y Chakrabarty, *J. Bacteriol.* 159:9 18 (1984)).

Los hospedadores adecuados para clonar las moléculas de ácido nucleico de ADH de interés son los hospedadores procariontas. Un ejemplo de un hospedador procarionta es *E. coli*. Sin embargo, las moléculas de ácido nucleico de ADH deseadas pueden clonarse en otros hospedadores procariontas que incluyen, pero sin limitación, hospedadores de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, y *Proteus*.

Los hospedadores eucariotas para la clonación y expresión de la enzima ADH de interés incluyen células de hongos

y levaduras. Un hospedador eucariota particularmente preferido es la levadura. La expresión de la enzima ADH deseada en dichas células eucariotas puede requerir el uso de regiones reguladoras eucariotas que incluyen promotores eucariotas. La clonación y expresión de la molécula de ácido nucleico de ADH en células eucariotas se puede realizar mediante técnicas bien conocidas, usando sistemas de vectores eucariotas bien conocidos.

Se pueden realizar una o más mutaciones en cualquier enzima ADH de interés para aumentar la capacidad de la enzima para convertir el isobutiraldehído en isobutanol, o conferir otras propiedades descritas en el presente documento a la enzima. Dichas mutaciones incluyen mutaciones puntuales, mutaciones de marco de lectura, eliminaciones e inserciones. Preferentemente, se usan una o más mutaciones puntuales, que den lugar a una o más sustituciones de aminoácidos, para producir enzimas ADH que tengan una capacidad mejorada para convertir el isobutiraldehído en isobutanol. En un aspecto preferido, se pueden realizar una o más mutaciones en posiciones equivalentes o correspondientes a la posición Y50 (por ejemplo, Y50W o Y50F), Q77 (por ejemplo, Q77S o Q77R), V108 (por ejemplo, V108S o V108A), Y113 (por ejemplo, Y113F o Y113G), I212 (por ejemplo, I212T o I212V) y/o L264 (por ejemplo, L264V) de la enzima AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185) para producir el resultado deseado en otras enzimas ADH de interés.

Las posiciones correspondientes de las enzimas ADH identificadas en el presente documento (por ejemplo, la AdhA de *L. lactis* de SEQ ID NO: 185) pueden ser identificadas fácilmente para otras enzimas ADH por parte de un experto en la materia. Por lo tanto, dada la región definida y los ensayos descritos en la presente solicitud, un experto en la materia puede realizar una o varias modificaciones que producirían una mayor capacidad para convertir el isobutiraldehído en isobutanol en cualquier enzima ADH de interés.

En una realización preferida, las enzimas ADH modificadas tienen de 1 a 6 sustituciones de aminoácidos seleccionadas de las posiciones correspondientes a Y50, Q77, V108, Y113, I212 o L264 en comparación con las enzimas ADH de tipo silvestre. En otras realizaciones, las enzimas ADH modificadas tienen sustituciones de aminoácidos adicionales en otras posiciones en comparación con las respectivas enzimas ADH de tipo silvestre. Por lo tanto, las enzimas ADH modificadas pueden tener al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 restos diferentes en otras posiciones en comparación con las respectivas enzimas ADH de tipo silvestre. Como apreciarán los expertos en la materia, el número de posiciones adicionales que pueden tener sustituciones de aminoácidos dependerá de la enzima ADH de tipo silvestre usada para generar las variantes. Por lo tanto, en algunos casos, hasta 50 posiciones diferentes pueden tener sustituciones de aminoácidos.

Se entiende que diversos microorganismos pueden actuar como "fuentes" de material genético que codifica enzimas ADH adecuadas para su uso en un microorganismo recombinante proporcionado en el presente documento. Por ejemplo, Además, pueden identificarse genes que codifican estas enzimas a partir de otras especies fúngicas y bacterianas y pueden expresarse para la modulación de esta vía. Diversos organismos podrían servir como fuentes para estas enzimas, incluyendo, pero sin limitación, *Lactococcus* sp., incluyendo *L. lactis*, *Lactobacillus* sp., incluyendo *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. hilgardii*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. vaginalis*, *L. antri*, *L. oris*, y *L. coleohominis*, *Pediococcus* sp., incluyendo *P. acidilactici*, *Bacillus* sp., incluyendo *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. coagulans*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* y *B. amyloliquefaciens*, *Leptotrichia* sp., incluyendo *L. goodfellowii*, *L. buccalis* y *L. hofstadii*, *Actinobacillus* sp., incluyendo *A. pleuropneumoniae*, *Streptococcus* sp., incluyendo *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. gordonii*, *S. pneumoniae* y *S. mitis*, *Streptobacillus* sp., incluyendo *S. moniliformis*, *Staphylococcus* sp., incluyendo *S. aureus*, *Eikenella* sp., including *E. corrodens*, *Weissella* sp., including *W. paramesenteroides*, *Kingella* sp., incluyendo *K. oralis* y *Rothia* sp., incluyendo *R. dentocariosa* y *Exiguobacterium* sp.

Se conocen las secuencias de nucleótidos para varias enzimas ADH. Por ejemplo, se dispone de las secuencias de enzimas ADH de una amplia selección de microorganismos, incluyendo, pero sin limitación, *L. lactis* (SEQ ID NO: 185), *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *Bacillus cereus*. Las enzimas ADH modificables por los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, las desveladas en la publicación de patente estadounidense del mismo solicitante en trámite junto con la presente n.º 2010/0143997. En la Tabla 97, se puede encontrar una lista representativa de enzimas ADH modificables por los métodos descritos en el presente documento.

Además, se puede usar cualquier método para identificar genes que codifiquen enzimas ADH con una actividad específica. En general, se pueden identificar genes homólogos o análogos con actividad similar mediante análisis funcionales, estructurales y/o genéticos. En la mayoría de los casos, los genes homólogos o análogos con actividad similar tendrán similitudes funcionales, estructurales o genéticas. Las técnicas conocidas por los expertos en la materia pueden ser adecuadas para identificar genes homólogos y enzimas homólogas. En general, los genes análogos y/o las enzimas análogas pueden identificarse por análisis funcional y tendrán similitudes funcionales. Para identificar genes análogos y enzimas análogas pueden ser adecuadas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, para identificar genes homólogos o análogos, proteínas, o enzimas, las técnicas pueden incluir, pero sin limitación, la clonación de un gen por PCR usando cebadores basados en una secuencia publicada de un gen/una enzima o por PCR degenerada usando cebadores degenerados diseñados para amplificar una región conservada entre un gen. Además, un experto en la materia puede usar técnicas para identificar genes homólogos o análogos, proteínas o enzimas con homología funcional o similitud. Las técnicas incluyen examinar una célula o un cultivo celular para determinar la eficiencia catalítica o la actividad específica de una enzima a través de ensayos enzimáticos *in vitro*.

para dicha actividad, luego aislar la enzima con dicha actividad mediante purificación, determinar la secuencia proteica de la enzima mediante técnicas tales como degradación de Edman, el diseño de cebadores de PCR para la secuencia de ácido nucleico probable, la amplificación de dicha secuencia de ADN a través de PCR y clonación de dicha secuencia de ácido nucleico. Para identificar genes homólogos o análogos con actividad similar, las técnicas también incluyen la comparación de datos relacionados con un gen o enzima candidata con bases de datos tales como BRENDA, KEGG o MetaCYC. El gen o la enzima candidata puede identificarse dentro de las bases de datos mencionadas anteriormente de acuerdo con las enseñanzas del presente documento. Además, La actividad enzimática se puede determinar fenotípicamente.

10 Métodos para crear enzimas ADH con eficiencia catalítica mejorada

La presente solicitud describe además métodos de modificación por ingeniería genética de enzimas ADH para mejorar su eficiencia catalítica.

15 Un enfoque para aumentar la eficiencia catalítica de las enzimas ADH es mediante mutagénesis de saturación con bibliotecas de NNK. Estas bibliotecas se pueden examinar en busca de aumentos en la eficiencia catalítica para identificar qué mutaciones individuales contribuyen a una mayor capacidad para convertir el isobutiraldehído en isobutanol. Las combinaciones de mutaciones en los restos mencionados anteriormente pueden investigarse mediante cualquier método. Por ejemplo, una biblioteca combinatoria de mutantes puede modificarse por ingeniería genética basándose en los resultados de los estudios de mutagénesis de saturación.

Otro enfoque consiste en usar la mutagénesis oligonucleotídica aleatoria para generar una diversidad mediante la incorporación de mutaciones aleatorias, codificadas en un oligonucleótido sintético, en la enzima. El número de mutaciones en enzimas individuales dentro de la población puede controlarse variando la longitud de la secuencia diana y el grado de aleatorización durante la síntesis de los oligonucleótidos. Las ventajas de este enfoque más definido son que se pueden encontrar todas las posibles mutaciones de aminoácidos y también mutaciones acopladas.

Si las mejores variantes de los experimentos descritos anteriormente no muestran suficiente actividad, se puede usar la evolución dirigida a través de la PCR propensa a errores para obtenerse mejoras adicionales. Puede realizarse una mutagénesis por PCR propensa a errores de la enzima ADH seguida de la detección de la actividad de ADH.

Eficiencia catalítica de ADH mejorada

En un aspecto, se mejora la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada. Como se usa en el presente documento, la expresión "eficiencia catalítica" se refiere a la propiedad de la enzima ADH que le permite convertir el isobutiraldehído en isobutanol.

En una realización, la eficiencia catalítica de la ADH modificada se ve aumentada en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 5 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 15 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 25 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 50 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 75 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 100 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 200 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 500 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 1000 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 2000 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Más preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 3000 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental. Muy preferentemente, la eficiencia catalítica de la enzima ADH modificada se potencia en al menos aproximadamente un 3500 % en comparación con la ADH de tipo silvestre o parental.

60 Expresión génica de enzimas ADH modificadas

En el presente documento, se proporcionan métodos para la expresión de uno o más de los genes de la enzima ADH modificada que participan en la producción de metabolitos beneficiosos y vectores de expresión de ADN recombinante útiles en el método. Por lo tanto, se incluyen dentro del alcance de la divulgación los vectores de expresión recombinantes que incluyen dichos ácidos nucleicos. El término vector de expresión se refiere a un ácido nucleico que puede introducirse en un microorganismo hospedador o en un sistema de transcripción y traducción sin células. Un

vector de expresión se puede mantener de forma permanente o transitoria en un microorganismo, ya sea como parte del ADN cromosómico u otro ADN del microorganismo o en cualquier compartimiento celular, tal como un vector replicante en el citoplasma. Un vector de expresión también comprende un promotor que impulsa la expresión de un ARN, que normalmente se traduce en un polipéptido en el microorganismo o extracto celular. Para la traducción eficiente de ARN en proteína, el vector de expresión normalmente también contiene una secuencia de sitio de unión a ribosoma situada dirección 5' del codón de inicio de la secuencia de codificación del gen que se va a expresar. Otros elementos, tales como potenciadores, secuencias de señales de secreción, secuencias de terminación de la transcripción, y uno o más genes marcadores mediante los que se pueden identificar y/o seleccionar los microorganismos hospedadores que contienen el vector, también pueden estar presentes en un vector de expresión. Se usan marcadores seleccionables, es decir, genes que confieren resistencia o sensibilidad a los antibióticos, y confieren un fenotipo seleccionable en células transformadas cuando las células se cultivan en un medio selectivo apropiado.

Los diferentes componentes de un vector de expresión pueden variar ampliamente, dependiendo del uso previsto del vector y la/s célula/s hospedadora/s en las que el vector está destinado a replicarse o dirigir la expresión. Los componentes del vector de expresión adecuados para la expresión de genes y el mantenimiento de vectores en *E. coli*, levaduras, *Streptomyces* y otras células de uso común son ampliamente conocidas y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, los promotores adecuados para la inclusión en los vectores de expresión de la divulgación incluyen aquellos que funcionan en microorganismos hospedadores eucariotas o procariotas. Los promotores pueden comprender secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión en relación con el crecimiento del microorganismo hospedador o que hagan que la expresión de un gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico. Para *E. coli* y otras ciertas células hospedadoras bacterianas, se pueden usar promotores derivados de genes para enzimas biosintéticas, enzimas que confieren resistencia a los antibióticos y proteínas fágicas, e incluyen, por ejemplo, la galactosa, lactosa (lac), maltosa, triptófano (Trp), beta-lactamasa (bla), bacteriófago lambda PL y promotores T5. Además, también se pueden usar promotores sintéticos, tales como el promotor tac (Patente de EE.UU. n.º 4.551.433). Para los vectores de expresión de *E. coli*, es útil incluir un origen de replicación de *E. coli*, tal como, por ejemplo, pUC, p1P, p1 y pBR.

Por lo tanto, los vectores de expresión recombinante contienen al menos un sistema de expresión, que, a su vez, se compone de al menos una parte de un gen biosintético que codifica secuencias unidas operativamente a un promotor y, opcionalmente, secuencias de terminación que operan para efectuar la expresión de la secuencia codificante en células hospedadoras compatibles. Las células hospedadoras se modifican mediante la transformación con los vectores de expresión de ADN recombinante de la divulgación para contener las secuencias del sistema de expresión como elementos extracromosómicos o integrados en el cromosoma.

Por otra parte, se conocen muy bien métodos para expresar un polipéptido a partir de una molécula de ácido nucleico que son específicos de un determinado microorganismo (es decir, un microorganismo de levadura). Por ejemplo, se conocen bien construcciones de ácido nucleico que se usan para la expresión de polipéptidos heterólogos dentro de *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.859.596 y 4.943.529, para *Kluyveromyces* y, por ejemplo, Gellissen *et al.*, "Gene" 190(1):87-97 (1997) para *Saccharomyces*). Los plásmidos de levadura tienen un marcador seleccionable y un origen de replicación, también conocido como secuencias de replicación autónoma (ARS). Además, ciertos plásmidos también pueden contener una secuencia centromérica. En general, estos plásmidos centroméricos son un plásmido de copia única o baja. Los plásmidos sin una secuencia centromérica y que utilizan un origen de replicación de 2 micrómetros (*S. cerevisiae*) o de 1,6 micrómetros (*K. lactis*) son plásmidos de copia alta. El marcador seleccionable puede ser prototrófico, tal como *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *URA3* o *ADE2*, o de resistencia a los antibióticos, tales como, *bar*, *ble*, *hph* o *kan*.

Se puede amplificar un ácido nucleico de la divulgación usando ADNc, ADN sintético de ARNm, o como alternativa, ADN genómico, como plantilla y cebadores de oligonucleótidos apropiados de acuerdo con las técnicas de amplificación por PCR convencionales y los procedimientos descritos en la sección de ejemplos que figura a continuación. El ácido nucleico así amplificado puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse mediante el análisis de la secuencia de ADN. Además, los oligonucleótidos correspondientes a secuencias de nucleótidos pueden prepararse mediante técnicas sintéticas convencionales, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado.

También se entiende que es posible crear una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido homólogo a las enzimas descritas en el presente documento mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en particular, de modo que se introducen una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en la proteína codificada. Se pueden introducir mutaciones en el polinucleótido mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por la PCR. En contraste con aquellas posiciones en las que puede ser deseable hacer sustituciones de aminoácidos no conservativas (véase arriba), en algunas posiciones, es preferible realizar sustituciones de aminoácidos conservativas. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina,

glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

- 5 Aunque el efecto de un cambio de aminoácido varía dependiendo de factores tales como la fosforilación, la glicosilación, los enlaces intracatenarios, la estructura terciaria y el papel del aminoácido en el sitio activo o un posible sitio alostérico, en general, se prefiere que el aminoácido sustituido sea del mismo grupo que el aminoácido por el que se reemplaza. Hasta cierto punto, los siguientes grupos contienen aminoácidos que son intercambiables: los aminoácidos básicos lisina, arginina e histidina; los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos polares neutros serina, treonina, cisteína, glutamina, asparagina y, en un menor grado, metionina; los aminoácidos alifáticos no polares glicina, alanina, valina, isoleucina y leucina (sin embargo, debido al tamaño, la glicina y la alanina están más estrechamente relacionadas, y la valina, la isoleucina y la leucina están más estrechamente relacionadas); y los aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptófano y tirosina. Además, aunque clasificados en diferentes categorías, la alanina, la glicina y la serina parecen ser intercambiables en cierta medida, y la cisteína también encaja en este grupo, o puede clasificarse con los aminoácidos neutros polares.

Métodos en general

Identificación de homólogos de la 3-cetoácido reductasa

- 20 Se puede usar cualquier método para identificar genes que codifiquen enzimas con actividad de 3-cetoácido reductasa, incluyendo, pero sin limitación, TMA29 de *S. cerevisiae*. En general, los genes que son homólogos o similares a las 3-cetoácido reductasas tales como TMA29 se pueden identificar mediante análisis funcional, estructural y/o genético. En la mayoría de los casos, los genes homólogos o similares y/o las enzimas homólogas o similares tendrán similitudes funcionales, estructurales o genéticas.

- El gen *TMA29* de *S. cerevisiae* también se conoce como YMR226C. El marco de lectura abierto (ORF) YMR226C se encuentra en el Cromosoma XIII de *S. cerevisiae* en las posiciones 722395...721592. La ubicación cromosómica de YMR226C es una región altamente sinténica a los cromosomas en muchas levaduras relacionadas [Byrne, K.P. y K. H. Wolfe (2005) "The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species". *Genome Res.* 15(10):1456-61. Scannell, D. R., K. P. Byrne, J. L. Gordon, S. Wong y K. H. Wolfe (2006) "Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploidy yeasts". *Nature* 440: 341-5. Scannell, D. R., A. C. Frank, G. C. Conant, K. P. Byrne, M. Woolfit y K. H. Wolfe (2007) "Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 104: 8397-402.]

- Por ejemplo, las ubicaciones de las versiones sinténicas de YMR226C de otras especies de levaduras se pueden encontrar en el Cromosoma 13 de *Candida glabrata*, Cromosoma 1 de *Zygosaccharomyces rouxii*, Cromosoma 2 de *K. lactis*, Cromosoma 6 de *Ashbya gossypii*, Cromosoma 8 de *S. kluyveri*, Cromosoma 4 de *K. thermotolerance* y el Cromosoma 8 de las especies de levadura ancestrales inferidas [Gordon, J. L., K. P. Byrne y K. H. Wolfe (2009) "Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern *Saccharomyces cerevisiae* genome". *PLoS Genet.* 5: e1000485.]

- Usando esta relación sinténica, se identifican fácilmente las versiones específicas de cada especie de este gen, y se pueden encontrar ejemplos en la Tabla 4.

Tabla 4. YMR226C y sus homólogos.

Especie	Nombre del gen	SEQ ID NO:
<i>S. cerevisiae</i>	YMR226C	1
<i>K. polyspora</i>	Kpol_1043p53	2
<i>S. castellii</i>	Scas_594.12d	3
<i>C. glabrata</i>	CAGL0M11242 g	4
<i>S. bayanus</i>	Sbay_651.2	5
<i>Z. rouxii</i>	ZYRO0A05742p	6
<i>K. lactis</i>	KLLA0B08371 g	7
<i>A. gossypii</i>	AFR561Wp	8
<i>S. kluyveri</i>	SAKL0H04730 g	9

(continuación)

Especie	Nombre del gen	SEQ ID NO:
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH0D13002p	10
<i>K. waltii</i>	Kwal_26.9160	11

Además de la sintenia, un experto en la materia puede identificar homólogos de hongos en el gen *TMA29* de *S. cerevisiae* a través de herramientas tales como BLAST y alineamiento de secuencias. Estos otros homólogos pueden eliminarse de una manera similar de las respectivas especies de levaduras para eliminar la acumulación del subproducto de 3-hidroxiácido. Se pueden encontrar ejemplos de proteínas homólogas en *Vanderwaltozyma polyspora* (SEQ ID NO: 2), *Saccharomyces castellii* (SEQ ID NO: 3), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 4), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 5), *Zygosaccharomyces rouxii* (SEQ ID NO: 6), *K. lactis* (SEQ ID NO: 7), *Ashbya gossypii* (SEQ ID NO: 8), *Saccharomyces kluyveri* (SEQ ID NO: 9), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 10), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 11), *Pichia stipitis* (SEQ ID NO: 12), *Debaromyces hansenii* (SEQ ID NO: 13), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 14), *Candida dubliniensis* (SEQ ID NO: 15), *Candida albicans* (SEQ ID NO: 16), *Yarrowia lipolytica* (SEQ ID NO: 17), *Issatchenkia orientalis* (SEQ ID NO: 18), *Aspergillus nidulans* (SEQ ID NO: 19), *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 20), *Neurospora crassa* (SEQ ID NO: 21), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 22) y *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 23).

Las técnicas conocidas por los expertos en la materia pueden ser adecuadas para identificar genes homólogos y enzimas homólogas adicionales. En general, los genes análogos y/o las enzimas análogas pueden identificarse por análisis funcional y tendrán similitudes funcionales. Para identificar genes análogos y enzimas análogas pueden ser adecuadas técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, para identificar genes homólogos o análogos, proteínas, o enzimas, las técnicas pueden incluir, pero sin limitación, la clonación de un gen de deshidratasa por PCR usando cebadores basados en una secuencia publicada de un gen/una enzima o por PCR degenerada usando cebadores degenerados diseñados para amplificar una región conservada entre genes de deshidratasa. Además, un experto en la materia puede usar técnicas para identificar genes homólogos o análogos, proteínas o enzimas con homología funcional o similitud. Las técnicas incluyen el examen de una célula o un cultivo celular con respecto a la actividad catalítica de una enzima a través de un ensayo enzimático *in vitro* de dicha actividad (por ejemplo, como se describe en el presente documento o en Kiritani, "Branched-chain Amino Acids Methods Enzymology", 1970), después el aislamiento de la enzima con dicha actividad mediante purificación, la determinación de la secuencia proteica de la enzima mediante técnicas tales como degradación de Edman, el diseño de cebadores de PCR para la secuencia de ácido nucleico probable, la amplificación de dicha secuencia de ADN a través de PCR y clonación de dicha secuencia de ácido nucleico. Para identificar a genes homólogos o similares y/o enzimas homólogas o similares, genes análogos y/o enzimas o proteínas análogas, las técnicas también incluyen la comparación de datos relacionados con un gen o enzima candidata con bases de datos tales como BRENDA, KEGG o MetaCYC. El gen o la enzima candidata puede identificarse dentro de las bases de datos mencionadas anteriormente de acuerdo con las enseñanzas del presente documento.

Identificación de homólogos de aldehído deshidrogenasa

Se puede usar cualquier método para identificar genes que codifiquen enzimas con actividad de aldehído deshidrogenasa, incluyendo, pero sin limitación, la ALD6 de *S. cerevisiae*. En general, los genes que son homólogos o similares a las aldehído deshidrogenasas tales como la ALD6 se pueden identificar mediante análisis funcional, estructural y/o genético. En la mayoría de los casos, los genes homólogos o similares y/o las enzimas homólogas o similares tendrán similitudes funcionales, estructurales o genéticas.

El gen *ALD6* de *S. cerevisiae* también se conoce por su nombre sistemático YPL061W. El marco de lectura abierto (ORF) YPL061W se encuentra en el Cromosoma XVI de *S. cerevisiae* en las posiciones 432585...434087. La ubicación cromosómica de YPL061W es una región altamente sinténica a los cromosomas en muchas levaduras relacionadas [Byrne, K.P. y K. H. Wolfe (2005) "The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species". *Genome Res.* 15: 1456-61. Scannell, D. R., K. P. Byrne, J. L. Gordon, S. Wong y K. H. Wolfe (2006) "Multiple rounds of speciation associated with reciprocal gene loss in polyploidy yeasts". *Nature* 440: 341-5. Scannell, D. R., A. C. Frank, G. C. Conant, K. P. Byrne, M. Woolfit y K. H. Wolfe (2007) "Independent sorting-out of thousands of duplicated gene pairs in two yeast species descended from a whole-genome duplication". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 104: 8397-402.]

Por ejemplo, las ubicaciones de las versiones sinténicas de YPL061W de otras especies de levaduras se pueden encontrar en el Cromosoma 8 de *Candida glabrata*, Cromosoma 5 de *K. lactis*, Cromosoma 5 de *K. thermotolerance* y el Cromosoma 8 de las especies de levadura ancestrales inferidas [Gordon, J. L., K. P. Byrne y K. H. Wolfe (2009) "Additions, losses, and rearrangements on the evolutionary route from a reconstructed ancestor to the modern *Saccharomyces cerevisiae* genome". *PLoS Genet.* 5: e1000485.]

Usando esta relación sinténica, se identifican fácilmente las versiones específicas de cada especie de este gen, y se

pueden encontrar ejemplos en la Tabla 5.

Tabla 5. ALD6 y sus homólogos.

Especie	Nombre del gen	SEQ ID NO:
<i>S. cerevisiae</i>	YPL061W	25
<i>S. castellii</i>	Scas_664.24	26
<i>C. glabrata</i>	CAGL0H05137 g	27
<i>S. bayanus</i>	Sbay_623.4	28
<i>K. lactis</i>	KLLA0E23057	29
<i>K. thermotolerans</i>	KLTH0E12210 g	30
<i>K. waltii</i>	Kwal_27.119760	31

- 5 Además de la sintenia, un experto en la materia puede identificar homólogos de hongos en el gen *ALD6* de *S. cerevisiae* a través de herramientas tales como BLAST y alineamiento de secuencias. Estos otros homólogos pueden eliminarse de una manera similar de las respectivas especies de levaduras para eliminar la acumulación del subproducto de aldehído. Se pueden encontrar ejemplos de proteínas homólogas en *Saccharomyces castelli* (SEQ ID NO: 26), *Candida glabrata* (SEQ ID NO: 27), *Saccharomyces bayanus* (SEQ ID NO: 28), *Kluyveromyces lactis* (SEQ ID NO: 29), *Kluyveromyces thermotolerans* (SEQ ID NO: 30), *Kluyveromyces waltii* (SEQ ID NO: 31), *Saccharomyces cerevisiae* YJ789 (SEQ ID NO: 32), *Saccharomyces cerevisiae* JAY291 (SEQ ID NO: 33), *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 (SEQ ID NO: 34), *Saccharomyces cerevisiae* DBY939 (SEQ ID NO: 35), *Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631 (SEQ ID NO: 36), *Saccharomyces cerevisiae* RM11-1a (SEQ ID NO: 37), *Pichia pastoris* (SEQ ID NO: 38), *Kluyveromyces marxianus* (SEQ ID NO: 39), *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 40) y *Schizosaccharomyces pombe* (SEQ ID NO: 41).

Identificación de una ADH o KDH en un microorganismo

- 20 Se puede usar cualquier método para identificar genes que codifiquen enzimas con actividad de alcohol deshidrogenasa (ADH) o cetoácido deshidrogenasa (KDH). La alcohol deshidrogenasa (ADH) puede catalizar la conversión reversible del isobutanol en isobutiraldehído. Las cetoácido deshidrogenasas (KDH) pueden catalizar la conversión del 2-cetoisovalerato en isobutiril-CoA, que puede convertirse además en isobutirato por la acción de enzimas transacetilasa y ácido carboxílico quinasa. En general, los genes que son homólogos o similares a las alcohol deshidrogenasas y cetoácido deshidrogenasas pueden identificarse mediante análisis funcionales, estructurales y/o genéticos. En la mayoría de los casos, los genes de alcohol deshidrogenasa homólogos o similares y/o las enzimas alcohol deshidrogenasa homólogas o similares tendrán similitudes funcionales, estructurales o genéticas. Análogamente, los genes de cetoácido deshidrogenasa homólogos o similares y/o las enzimas cetoácido deshidrogenasa homólogas o similares tendrán similitudes funcionales, estructurales o genéticas.

Identificación de PDC y GPD en un microorganismo de levadura

- 30 Se puede usar cualquier método para identificar genes que codifiquen enzimas con actividad de piruvato descarboxilasa (PDC) o actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD). Los métodos adecuados para la identificación de PDC y GPD se describen en las publicaciones del mismo solicitante en trámite junto con la presente US 2009/0226991 y US 2011/0020889, ambas de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

Inserciones y eliminaciones genéticas

- 40 Se puede usar cualquier método para introducir una molécula de ácido nucleico en la levadura, y muchos de estos métodos son bien conocidos. Por ejemplo, la transformación y la electroporación son métodos comunes para introducir ácido nucleico en células de levadura. Véase, por ejemplo, Gietz *et al.*, 1992, *Nuc Acids Res.* 27: 69-74; Ito *et al.*, 1983, *J. Bacteriol.* 153: 163-8; y Becker *et al.*, 1991, *Methods in Enzymology* 194: 182-7.
- 45 En una realización, la integración de un gen de interés en un fragmento de ADN o gen diana de un microorganismo de levadura ocurre de acuerdo con el principio de recombinación homóloga. De acuerdo con dicha realización, un casete de integración que contiene un módulo que comprende al menos un gen marcador de levadura y/o el gen que se va a integrar (módulo interno) está flanqueado en cada lado por fragmentos de ADN homólogos a los de los extremos del sitio de integración diana (secuencias recombinogénicas). Después de transformar la levadura con el casete mediante métodos apropiados, una recombinación homóloga entre las secuencias recombinogénicas puede dar lugar a que el módulo interno reemplace a la región cromosómica entre los dos sitios del genoma correspondientes a las secuencias recombinogénicas del casete de integración. (Orr-Weaver *et al.*, 1981, *PNAS EE.UU.* 78: 6354-58).

En una realización, el casete de integración para la integración de un gen de interés en un microorganismo de levadura incluye el gen heterólogo bajo el control de un promotor y un terminador apropiados junto con el marcador seleccionable flanqueado por secuencias recombinogénicas para la integración de un gen heterólogo en el cromosoma de levadura. En una realización, el gen heterólogo incluye un gen nativo apropiado que se desea para aumentar el número de copias de uno o varios genes nativos. El gen marcador seleccionable puede ser cualquier gen marcador usado en la levadura, incluyendo, pero sin limitación, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *URA3*, *bar*, *ble*, *hph* y *kan*. Las secuencias recombinogénicas se pueden elegir a voluntad, dependiendo del sitio de integración deseado adecuado para la aplicación deseada.

En otra realización, la integración de un gen en el cromosoma del microorganismo de levadura puede producirse a través de la integración aleatoria (Kooistra *et al.*, 2004, *Yeast* 21: 781-792).

Además, en una realización, se eliminan ciertos genes marcadores introducidos del genoma usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, la pérdida del marcador *URA3* puede obtenerse sembrando en placas células que contienen *URA3* en un medio que contiene FOA (ácido 5-fluoroorótico) y seleccionando colonias resistentes a FOA (Boeke *et al.*, 1984, *Mol. Gen. Genet* 197: 345-47).

La molécula de ácido nucleico exógena contenida dentro de una célula de levadura de la divulgación puede mantenerse dentro de esa célula en cualquier forma. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico exógenas pueden integrarse en el genoma de la célula o mantenerse en un estado episomal que puede transmitirse ("heredarse") de manera estable a las células hijas. Dichos elementos genéticos extracromosómicos (tales como los plásmidos, el genoma mitocondrial, etc.) pueden contener además marcadores de selección que garantizan la presencia de dichos elementos genéticos en células hijas. Por otra parte, las células de levadura pueden transformarse de forma estable o transitoria. Además, las células de levadura descritas en el presente documento pueden contener una sola copia, o múltiples copias de una determinada molécula de ácido nucleico exógena como se ha descrito anteriormente.

Reducción de la actividad enzimática

Los microorganismos de levadura como los descritos en el presente documento pueden tener una actividad enzimática reducida tal como la actividad de 3-cetoácido reductasa, PDC, ALDH o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) reducida. El término "reducido" como se usa en el presente documento con respecto a una determinada actividad enzimática se refiere a un nivel de actividad enzimática inferior al medido en una célula de levadura comparable de la misma especie. El término reducido también se refiere a la eliminación de la actividad enzimática en comparación con una célula de levadura comparable de la misma especie. Por lo tanto, las células de levadura que carecen de actividad de 3-cetoácido reductasa, PDC, ALDH o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) se considera que tienen una actividad de 3-cetoácido reductasa, PDC, ALDH o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) reducida, ya que la mayoría, si no todas, las cepas de levadura comparables tienen al menos algo de actividad de 3-cetoácido reductasa, PDC, ALDH o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD). Dichas actividades enzimáticas reducidas pueden producir una menor concentración de enzimas, menor actividad específica de una enzima, o una combinación de las mismas. Se pueden usar muchos métodos diferentes para producir levaduras que tengan una actividad enzimática reducida. Por ejemplo, se puede modificar por ingeniería genética una célula de levadura para que tenga un locus de codificación enzimática alterado, usando mutagénesis común o tecnología de desactivación. Véase, por ejemplo, "Methods in Yeast Genetics" (edición de 1997), Adams, Gottschling, Kaiser y Stens, Cold Spring Harbor Press (1998). Además, se pueden introducir ciertas mutaciones puntuales que dan lugar a una enzima con actividad reducida. También se incluyen cepas de levadura que, cuando se encuentran en la naturaleza, están sustancialmente libres de una o más actividades seleccionadas entre la actividad de 3-cetoácido reductasa, PDC, ALDH o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD).

Como alternativa, se puede usar tecnología no codificante para reducir la actividad enzimática. Por ejemplo, se puede modificar por ingeniería genética la levadura para que contenga un ADNc que codifique una molécula no codificante que evite que se produzca una enzima. La expresión "molécula no codificante", como se usa en el presente documento, abarca cualquier molécula de ácido nucleico que contiene secuencias que corresponden a la cadena codificante de un polipéptido endógeno. Una molécula no codificante también puede tener secuencias flanqueantes (por ejemplo, secuencias reguladoras). Así como que las moléculas no codificantes pueden ser ribozimas u oligonucleótidos no codificantes. Una ribozima puede tener cualquier estructura general, incluyendo, sin limitación, estructuras de horquilla, de cabeza de martillo o de cabeza de hacha, siempre que la molécula escinda el ARN.

Las levaduras que tienen una actividad enzimática reducida pueden identificarse usando muchos métodos. Por ejemplo, se puede identificar fácilmente la levadura con actividad de 3-cetoácido reductasa, PDC, ALDH o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) usando métodos comunes, que pueden incluir, por ejemplo, la medición de la formación de glicerol mediante cromatografía líquida.

Sobreexpresión de genes heterólogos

Los métodos para sobreexpresar un polipéptido de una molécula de ácido nucleico nativo o heterólogo son bien

conocidos. Dichos métodos incluyen, sin limitación, la construcción de una secuencia de ácido nucleico de modo que un elemento regulador potencie la expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifique el polipéptido deseado. Por lo general, los elementos reguladores son secuencias de ADN que regulan la expresión de otras secuencias de ADN en el nivel de transcripción. Por lo tanto, los elementos reguladores incluyen, sin limitación, promotores, potenciadores, y similares. Por ejemplo, los genes exógenos pueden estar bajo el control de un promotor inducible o un promotor constitutivo. Por otra parte, los métodos para expresar un polipéptido a partir de una molécula de ácido nucleico exógena en levadura son bien conocidos. Por ejemplo, se conocen bien construcciones de ácido nucleico que se usan para la expresión de polipéptidos exógenos dentro de *Kluyveromyces* y *Saccharomyces* (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.859.596 y 4.943.529, para *Kluyveromyces* y, por ejemplo, Gellissen *et al.*, "Gene" 190(1):87-97 (1997) para *Saccharomyces*). Los plásmidos de levadura tienen un marcador seleccionable y un origen de replicación. Además, ciertos plásmidos también pueden contener una secuencia centromérica. En general, estos plásmidos centroméricos son un plásmido de copia única o baja. Los plásmidos sin una secuencia centromérica y que utilizan un origen de replicación de 2 micrómetros (*S. cerevisiae*) o de 1,6 micrómetros (*K. lactis*) son plásmidos de copia alta. El marcador seleccionable puede ser prototrófico, tal como *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*, *URA3* o *ADE2*, o resistencia a antibióticos, tales como, *bar*, *ble*, *hph* o *kan*.

En otra realización, se pueden usar elementos de control heterólogos para activar o reprimir la expresión de genes endógenos. Además, cuando la expresión debe ser reprimida o eliminada, el gen para la enzima, la proteína o el ARN en cuestión se puede eliminar mediante técnicas de delección conocidas.

Como se describe en el presente documento, cualquier levadura dentro del alcance de la divulgación puede identificarse mediante técnicas de selección específicas para la enzima que se esté expresando, sobreexpresando o reprimiendo en particular. Los métodos para identificar las cepas con el fenotipo deseado son bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen, sin limitación, PCR, RT-PCR y técnicas de hibridación de ácidos nucleicos tales como el análisis Northern y de Southern, capacidades de crecimiento alteradas en un sustrato particular o en presencia de un sustrato particular, un compuesto químico, un agente de selección y similares. En algunos casos, se pueden usar técnicas de inmunohistoquímica y bioquímica para determinar si una célula contiene un determinado ácido nucleico mediante la detección de la expresión del polipéptido codificado. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo que tenga especificidad por una enzima codificada para determinar si una célula de levadura en particular contiene esa enzima codificada. Además, se pueden usar técnicas bioquímicas para determinar si una célula contiene una determinada molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido enzimático detectando un producto producido como resultado de la expresión del polipéptido enzimático. Por ejemplo, la transformación de una célula con un vector que codifica acetolactato sintasa y la detección de concentraciones aumentadas de acetolactato en comparación con una célula sin el vector indica que el vector está presente y que el producto genético está activo. Los métodos para detectar actividades enzimáticas específicas o la presencia de determinados productos son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la presencia de acetolactato se puede determinar según lo descrito por Hugenholtz y Starrenburg, 1992, *Appl. Micro. Biot.* 38:17-22.

Aumento de la actividad enzimática

Los microorganismos de levadura como los descritos en el presente documento pueden modificarse por ingeniería genética para tener una mayor actividad de las enzimas (por ejemplo, una mayor actividad de las enzimas que participan en una vía metabólica que produce isobutanol). El término "aumentado" como se usa en el presente documento con respecto a una determinada actividad enzimática se refiere a un nivel de actividad enzimática superior al medido en una célula de levadura comparable de la misma especie. Por ejemplo, la sobreexpresión de una enzima específica puede llevar a un mayor nivel de actividad en las células para esa enzima. El aumento de las actividades para las enzimas que participan en la glucólisis o la vía del isobutanol produciría un aumento de la productividad y del rendimiento del isobutanol.

Los expertos en la materia conocen métodos para aumentar la actividad enzimática. Dichas técnicas pueden incluir aumentar la expresión de la enzima mediante el aumento del número de copias y/o el uso de un promotor potente, la introducción de mutaciones para paliar la regulación negativa de la enzima, la introducción de mutaciones específicas para aumentar la actividad específica y/o la disminución de la *K_m* para el sustrato, o por evolución dirigida. Véase, por ejemplo, "Methods in Molecular Biology" (vol. 231), ed. Arnold y Georgiou, Humana Press (2003).

Métodos de uso de microorganismos recombinantes para fermentaciones de alto rendimiento

Para que un biocatalizador produzca un metabolito beneficioso más de manera más económica, es deseable producir dicho metabolito con un alto rendimiento. Preferentemente, el único producto producido es el metabolito deseado, como los productos adicionales (es decir, subproductos) conducen a una reducción del rendimiento del metabolito deseado y a un aumento de los costes de capital y operativos, particularmente, si los productos adicionales tienen poco o ningún valor. Estos productos adicionales también requieren capital y costes operativos adicionales para separar estos productos del metabolito deseado.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un metabolito beneficioso derivado de un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética como se describe en las reivindicaciones.

En una realización, el método incluye cultivar un microorganismo recombinante como se establece en las reivindicaciones en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono hasta que se produce una cantidad recuperable del metabolito beneficioso y recuperar el metabolito. El metabolito beneficioso puede derivarse de cualquier vía biosintética que use acetolactato como producto intermedio, incluyendo, pero sin limitación, las vías biosintéticas para la producción de isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoina, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol y coenzima A. En una realización específica, el metabolito beneficioso es isobutanol. El metabolito beneficioso puede derivarse de cualquier vía biosintética que usa 2-aceto-2-hidroxi-butirato como producto intermedio, incluyendo, pero sin limitación, las vías biosintéticas para la producción de 2-metil-1-butanol, isoleucina, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

En el presente documento también se describe un método que incluye cultivar un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa acetolactato y un aldehído como productos intermedios en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono hasta que se produce una cantidad recuperable del metabolito beneficioso y, opcionalmente, recuperar el metabolito. En una realización ilustrativa, dicho microorganismo recombinante se modifica por ingeniería genética para (i) reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en DH2MB y (ii) reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión de un aldehído en subproducto ácido. El metabolito beneficioso se puede derivar de cualquier vía biosintética que use acetolactato y un aldehído como productos intermedios, incluyendo, pero sin limitación, las vías biosintéticas para la producción de isobutanol, 1-butanol y 3-metil-1-butanol. En una realización específica, el metabolito beneficioso es isobutanol.

En el presente documento, también se describe un método para cultivar un microorganismo recombinante que comprende una vía biosintética que usa 2-aceto-2-hidroxi-butirato y un aldehído como productos intermedios en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono hasta que se produce una cantidad recuperable del metabolito beneficioso y, opcionalmente, recuperar el metabolito. En una realización ilustrativa, dicho microorganismo recombinante se modifica por ingeniería genética para (i) reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión de 2-aceto-2-hidroxi-butirato en 2-etil-2,3-dihidroxi-butirato y (ii) reducir o eliminar la expresión o actividad de una enzima que cataliza la conversión de un aldehído en un subproducto ácido. El metabolito beneficioso puede derivarse de cualquier vía biosintética que use 2-aceto-2-hidroxi-butirato y un aldehído como productos intermedios, incluyendo, pero sin limitación, las vías biosintéticas para la producción de 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-pentanol, 4-metil-1-hexanol y 5-metil-1-heptanol.

En otra realización, se describe un método para producir un metabolito beneficioso derivado de una vía biosintética que requiere alcohol deshidrogenasa (ADH). En una realización, el método incluye cultivar un microorganismo recombinante que comprende una ADH modificada descrita en el presente documento en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono hasta que se produce una cantidad recuperable del metabolito beneficioso y, opcionalmente, recuperar el metabolito. El metabolito beneficioso puede derivarse de cualquier vía biosintética que requiera ADH, incluyendo, pero sin limitación, las vías biosintéticas para la producción de 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, 1-pentanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol. En una realización específica, el metabolito beneficioso es isobutanol.

En un método para producir un metabolito beneficioso a partir de una fuente de carbono, el microorganismo de levadura se cultiva en un medio de cultivo apropiado que contiene una fuente de carbono. En ciertas realizaciones, el método incluye además aislar el metabolito beneficioso del medio de cultivo. Por ejemplo, se puede aislar el isobutanol del medio de cultivo por cualquier método conocido por los expertos en la materia, tal como la destilación, pervaporación o extracción líquido-líquido.

En una realización, el microorganismo recombinante puede producir el metabolito beneficioso a partir de una fuente de carbono con un rendimiento de al menos el 5 por ciento teórico. En otra realización, el microorganismo puede producir el metabolito beneficioso de una fuente de carbono con un rendimiento de al menos aproximadamente el 10 por ciento, al menos aproximadamente el 15 por ciento, al menos aproximadamente el 20 por ciento, al menos aproximadamente el 25 por ciento, al menos aproximadamente el 30 por ciento, al menos aproximadamente el 35 por ciento, al menos aproximadamente el 40 por ciento, al menos aproximadamente el 45 por ciento, al menos aproximadamente el 50 por ciento, al menos aproximadamente el 55 por ciento, al menos aproximadamente el 60 por ciento, al menos aproximadamente el 65 por ciento, al menos aproximadamente el 70 por ciento, al menos aproximadamente el 75 por ciento, al menos aproximadamente el 80 por ciento, al menos aproximadamente el 85 por ciento, al menos aproximadamente el 90 por ciento, al menos aproximadamente el 95 por ciento o al menos aproximadamente el 97,5 % teórico. En una realización específica, el metabolito beneficioso es isobutanol.

La presente invención se ilustra con más detalle con los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

Ejemplos

Métodos generales para los Ejemplos 1-26

Secuencias: Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos que se desvelan en el presente documento se muestran en la Tabla 6.

5

Tabla 6. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de las enzimas y de los genes desvelados en diferentes ejemplos.

Enz.	Origen	Gen (SEQ ID NO)	Proteína correspondiente (SEQ ID NO)
ALS	<i>B. subtilis</i>	<i>Bs_alsS1_coSc</i> (SEQ ID NO: 42)	Bs_AlsS1 (SEQ ID NO: 43)
KARI	<i>E. coli</i>	<i>Ec_ilvC_coSc</i> ^{Q110V} (SEQ ID NO: 44)	Ec_Ilvc ^{Q110V} (SEQ ID NO: 45)
	<i>E. coli</i>	<i>Ec_ilvC_coSc</i> ^{P2D1-A1} (SEQ ID NO: 46)	Ec_ilvC_coSc ^{P2D1-A1} (SEQ ID NO: 47)
KIVD	<i>L. lactis</i>	<i>LI_kivD2_coEc</i> (SEQ ID NO: 48)	LI_Kivd2 (SEQ ID NO: 49)
DHAD	<i>L. lactis</i>	<i>LI_ilvD_coSc</i> (SEQ ID NO: 50)	LI_Ilvd (SEQ ID NO: 51)
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sc_ILV3ΔN</i> (SEQ ID NO: 52)	Sc_Ilvc3ΔN (SEQ ID NO: 53)
ADH	<i>D. melanogaster</i>	<i>Dm_ADH</i> (SEQ ID NO: 54)	Dm_Adh (SEQ ID NO: 55)
	<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA</i> (SEQ ID NO: 56)	LI_AdhA (SEQ ID NO: 57)
	<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc</i> ^{his6} (SEQ ID NO: 58)	LI_AdhA ^{his6} (SEQ ID NO: 59)
	<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA</i> ^{RE1} <i>_coSc</i> ^{his6} (SEQ ID NO: 60)	LI-AdhA ^{RE1-his6} (SEQ ID NO: 61)

Medios: El medio usado fue medio de levadura convencional (véase, por ejemplo, Sambrook, J., Russel, D. W. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual". 3ª ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press and Guthrie, C. y Fink, G.R. eds. "Methods in Enzymology Part B: Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology" 350:3-623 (2002)). El medio YP contiene extracto de levadura al 1 % (p/v), peptona al 2 % (p/v). YPD es YP que contiene glucosa al 2 %, a menos que se especifique lo contrario. YPE es YP que contiene etanol a 25 ml/l. El medio SC es base de nitrógeno para levadura Difco™ Yeast Nitrogen Base a 6,7 g/l, complemento de medios sintéticos de pérdida alélica Sigma™ Synthetic Dropout Media a 14 g/l (incluye aminoácidos y nutrientes, excluyendo histidina, triptófano, uracilo y leucina), histidina a 0,076 g/l, triptófano a 0,076 g/l, leucina a 0,380 g/l y uracilo a 0,076 g/l. SCD es SC que contiene glucosa al 2 % (p/v), a menos que se indique lo contrario. Las versiones de pérdida alélica de los medios SC y SCD se crean omitiendo uno o más de entre histidina (-H), triptófano (-W), leucina (-L) o uracilo (-U). Las versiones sólidas de los medios descritos anteriormente contienen agar al 2 % (p/v).

Técnicas de clonación: En general, se usaron métodos convencionales de biología molecular para la clonación y la construcción de plásmidos, a menos que se indique lo contrario (Sambrook, J., Russel, D. W. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual". 3ª ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Las técnicas de clonación incluyeron la digestión con enzimas de restricción, PCR para generar fragmentos de ADN (polimerasa de inicio en caliente KOD, n.º de cat. 71086, Merck, Darmstadt, Alemania), ligaduras de dos fragmentos de ADN usando el kit de ligadura de ADN (Mighty Mix Cat n.º TAK 6023, Clontech Laboratories, Madison, WI), y transformaciones bacterianas en células de *E. coli* competentes (células Competentes DH5a de Eficiencia Extrema, Cat n.º ABP-CE-CC02096P, Allele Biotechnology, San Diego, CA). El ADN plasmídico se purificó a partir de células de *E. coli* con el kit Qiagen QIAprep Spin Miniprep (Cat n.º 27106, Qiagen, Valencia, CA). El ADN se purificó a partir de geles de agarosa usando el kit de recuperación de ADN de gel Zymoclean (Zymo Research, Orange, CA; Catálogo n.º D4002) según los protocolos del fabricante.

PCR de colonias: La PCR de colonias de levadura usó el sistema de PCR FailSafe™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI; Catálogo n.º FS99250) según los protocolos del fabricante. Un cóctel de PCR que contenía 15 µl de tampón de Mezcla Maestra E, 10,5 µl de agua, 2 µl de cada cebador a una concentración 10 µM, 0,5 µl de la mezcla de enzimas polimerasas del kit se añadió a un tubo de PCR de 0,2 ml para cada muestra (30 µl cada una). Para cada candidato, se añadió una pequeña cantidad de células al tubo de reacción usando una punta de pipeta estéril. Se evaluó la presencia del producto de PCR positivo usando electroforesis en gel de agarosa.

PCR de SOE: Las reacciones de PCR se incubaron en un termociclador usando las siguientes condiciones de PCR: 1 ciclo de 94 °C x 2 min, 35 ciclos de 94 °C x 30 s, 53 °C x 30 s, 72 °C x 2 min y 1 ciclo de 72 °C x 10 min. Se preparó

una mezcla maestra de manera que cada reacción contenía lo siguiente: 3 µl de MgSO₄ (25 mM), 5 µl de tampón KOD x10, 5 µl de DMSO al 50 %, 5 µl de mezcla de dNTP (2 mM de cada), 1 µl de KOD, 28 µl de dH₂O, 1,5 µl de cebador directo (10 µM), 1,5 µl de cebador inverso (10 µM), 0,5 µl de plantilla (ADN plasmídico o genómico).

- 5 **Aislamiento de ADN genómico:** Se usó el kit de ADN fúngico/bacteriano Zymo Research ZR (Zymo Research Orange, CA; catálogo n.º D6005) para el aislamiento del ADN genómico según los protocolos del fabricante con las siguientes modificaciones. Tras la resuspensión de los sedimentos, se transfirieron 200 µl a 2 tubos de lisis BashingBead™ de ZR separados (para maximizar el rendimiento). Después de la lisis por golpeo de perlas, se transfirieron 400 µl de sobrenadante de cada uno de los tubos de lisis BashingBead™ de ZR a 2 filtros de centrifugación IV de Zymo-Spin™ separados y se centrifugaron a 7.000 rpm durante 1 min. Tras la centrifugación, se añadieron 1,2 ml de tampón de unión a ADN fúngico/bacteriano a cada filtrado. En alícuotas de 800 µl, se transfirió el filtrado de ambos filtros a una sola columna IIC Zymo-Spin™ en un tubo de recolección y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 min. Para la etapa de elución, en lugar de eluir en 100 µl de EB (tampón de elución, Qiagen), se añadieron 50 µl de EB, se incubaron 1 min, luego se centrifugaron las columnas durante 1 min. Esta etapa de elución se repitió para un volumen de elución final de 100 µl.

- Transformaciones de *S. cerevisiae*:** Se cultivaron cepas de *S. cerevisiae* en YPD que contenía etanol al 1 %. Se prepararon células competentes para la transformación mediante la resuspensión de células de *S. cerevisiae* en acetato de litio 100 mM. Una vez preparadas las células, se preparó una mezcla de ADN (volumen final de 15 µl con agua estéril), 72 µl de PEG al 50 %, se prepararon 10 µl de acetato de litio 1 M y 3 µl de ADN de esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/ml) para cada transformación. En un tubo de 1,5 ml, se añadieron 15 µl de la suspensión celular a la mezcla de ADN (100 µl) y la suspensión de transformación se agitó con formación de vórtice durante 5 pulsos cortos. La transformación se incubó durante 30 min a 30 °C, seguido de incubación durante 22 min a 42 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación (18.000 x g, 10 segundos, 25 °C). Se volvieron a suspender las células en 350 µl de YPD y después de una agitación durante la noche a 30 °C y 250 rpm, las células se extendieron sobre placas YPD que contenían placas selectivas G418 a 0,2 g/l. Los transformantes se purificaron en colonias individuales en placas selectivas de G418.

- Transformaciones de *K. marxianus*:** Las cepas de *K. marxianus* se cultivaron en 3 ml de un medio de cultivo apropiado a 250 rpm y 30 °C durante la noche. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron en 50 ml del mismo medio y cultivaron hasta una DO₆₀₀ de entre 1 y 4. Se recogieron las células en un tubo cónico estéril de 50 ml mediante centrifugación (1.600 x g, 5 min a temperatura ambiente). Las células se volvieron a suspender en 10 ml de tampón de electroporación (Tris-C1 10 mM, sacarosa 270 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 7,5) y se recogieron a 1.600 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se volvieron a suspender las células en 10 ml de IB (YPE, TDT 25 mM, HEPES 20 mM, pH 8,0; recién preparado diluyendo 100 µl de DTT 2,5 M y 200 µl de HEPES 1 M, pH 8,0 en 10 ml de YPD). Las células se incubaron durante 30 min, 250 rpm, 30 °C (tubo vertical). Las células se recogieron a 1.600 x g durante 5 min a temperatura ambiente y se volvieron a suspender en 10 ml de tampón de electroporación enfriado. Se sedimentaron las células a 1.600 x g durante 5 min a 4 °C. Las células se volvieron a suspender en 1 ml de tampón de electroporación enfriado y se transfirieron a un tubo de microcentrifuga. Se recogieron las células por centrifugación a > 10.000 x g durante 20 s a 4 °C. Las células se volvieron a suspender en una cantidad apropiada de tampón de electroporación enfriado para una concentración final de biomasa de 30-38 DO₆₀₀/ml. Se añadieron 400 µl de células a una cubeta de electroporación refrigerada (espacio de 0,4 cm). Se añadieron 50 µl de producto de la PCR de SOE (o control de agua) y se mezclaron pipeteando arriba y abajo, y la cubeta se incubó en hielo durante 30 min. Se sometieron las muestras a electroporación a 1,8 kV, 1.000 Ohm, 25 µF. Las muestras se transfirieron luego a un tubo de 50 ml con 1 ml de un medio de cultivo apropiado, y las muestras se incubaron durante la noche a 250 rpm a 30 °C. Después de la incubación, se sembraron las células en placas de agar apropiadas.

- Transformaciones de *K. lactis*:** Se cultivaron cepas de *K. lactis* en 3 ml de YPD a 250 rpm y 30 °C durante la noche. Al día siguiente, los cultivos se diluyeron en 50 ml de YPD y se dejaron crecer hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,8. Se recogieron células de 50 ml de cultivos de YPD mediante centrifugación (2.700 rcf, 2 min, 25 °C). Las células se lavaron con 50 ml de agua estéril y se recogieron por centrifugación a 2700 rcf durante 2 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron de nuevo con 25 ml de agua estéril y se recogieron por centrifugación a 2700 rcf durante 2 min a temperatura ambiente. Las células se volvieron a suspender en 1 ml de acetato de litio 100 mM y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Las células se recogieron por centrifugación durante 10 s a 18.000 rcf a temperatura ambiente. Las células se volvieron a suspender en un volumen de acetato de litio 100 mM que era aproximadamente 4 veces el volumen del sedimento celular. Se combinaron un volumen de 10-15 µl de ADN, 72 µl de PEG al 50 % (3350), 10 µl de acetato de litio 1 M, 3 µl de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y agua estéril hasta un volumen final de 100 µl para cada transformación. En un tubo de 1,5 ml, se añadieron 15 µl de la suspensión celular a la mezcla de ADN y la suspensión de transformación se agitó con formación de vórtice con 5 pulsos cortos. La transformación se incubó durante 30 min a 30 °C, seguido de incubación durante 22 min a 42 °C. Las células se recogieron por centrifugación durante 10 s a 18.000 rcf a temperatura ambiente. Las células se volvieron a suspender en 400 µl de un medio apropiado y se extendieron sobre placas de agar que contenían un medio apropiado para seleccionar las células transformadas.

- 65 Química analítica:

Cromatografía de gases (método GC1). Se realizó el análisis de compuestos orgánicos volátiles, incluyendo etanol e isobutanol en un cromatógrafo de gases Agilent 5890/6890/7890 dotado de un inyector automático Agilent 7673, una columna ZB-FFAP (J&W; 30 m de longitud, 0,32 mm de DI, Espesor de película de 0,25 µm) o equivalente conectado a un detector de ionización de llama (FID). El programa de temperatura fue el siguiente: 200 °C para el inyector, 300 °C para el detector, horno a 100 °C durante 1 minuto, gradiente de 70 °C/minuto a 230 °C y luego mantenido durante 2,5 min. El análisis se realizó usando patrones auténticos (> 99 %, obtenidos de Sigma-Aldrich y una curva de calibración de 5 puntos con 1-pentanol como patrón interno.

Cromatografía líquida de alto rendimiento (método LC1): Se realizó un análisis de metabolitos de ácidos orgánicos, incluyendo 2,3-dihidroxiisovalerato (DHIV), ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (DH2MB), isobutirato y glucosa en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1200 o equivalente dotado de un cartucho Bio-Rad Microguard Cation H y dos Phenomenex Rezex RFQ-Fast Fruit H + (8 %), columnas de 100 x 7,8 mm en serie o equivalente. Se detectaron metabolitos de ácidos orgánicos usando un detector de UV Agilent 1100 o equivalente (210 nm) y un detector de índice de refracción. La temperatura de la columna fue de 60 °C. Este método fue isocrático con H₂SO₄ 0,0180 N H₂ en agua Milli-Q como fase móvil. El flujo se ajustó a 1,1 ml/min. El volumen de inyección fue de 20 µl y el tiempo de ejecución fue de 16 min. La cuantificación de los metabolitos de ácidos orgánicos se realizó usando una curva de calibración de 5 puntos con patrones auténticos (> 99 % o pureza más alta disponible), a excepción de DHIV (2,3-dihidroxi-3-metil-butanoato, CAS 1756-18-9), que se sintetizó de acuerdo con Cioffi *et al.* (Cioffi, E. *et al. Anal Biochem* 1980, 104, pág.485) y DH2MB que se cuantificaron basándose en la suposición de que DHIV y DH2MB presentan el mismo factor de respuesta. En este método, DHIV y DH2MB se eluyen conjuntamente, por lo tanto, sus concentraciones se presentan como la suma de las dos concentraciones.

Cromatografía líquida de alto rendimiento (método LC4): Se realizó un análisis de los oxoácidos, incluyendo el 2,3-dihidroxiisovalerato (DHIV, CAS 1756-18-9), ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutirato (DH2MB), lactato, acetato, acetolactato, isobutirato y piruvato en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent-1100 dotado de una columna analítica IonPac AS11-HC (Dionex: 9 µm, 4,6 x 250 mm) junto con una columna de protección IonPac AG11-HC (Dionex: 13 µm, 4,6 x 50 mm) y una columna IonPac ATC-3 Anion Trap (Dionex: 9 x 24 mm). El acetolactato se detectó usando un detector de UV a 225 nm, mientras que todos los demás analitos se detectaron usando un detector de conductividad (conductividad suprimida por DE₅₀ con ASRS 4 mm en modo de reciclaje AutoSuppression, Corriente supresora de 200 mA). La temperatura de la columna fue de 35 °C. El tamaño de inyección fue de 10 µl. Este método usó el siguiente perfil de elución: NaOH 0,25 mM durante 3 min, seguido de un gradiente lineal de 0,25 a 5 mM de NaOH en 22 min y un segundo gradiente lineal de 5 mM a 38,25 mM en 0,1 min, seguido de 38,25 mM de NaOH durante 4,9 minutos y un gradiente lineal final de 38,25 mM a 0,25 mM durante 0,1 min antes de volver a equilibrarse hasta NaOH 0,25 mM durante 7 min. El flujo se ajustó a 2 ml/min. El análisis se realizó usando una curva de calibración de 4 puntos con patrones auténticos (> 99 %, o la pureza más alta disponible), con las siguientes excepciones: el DHIV se sintetizó de acuerdo con Cioffi *et al.* (Cioffi, E. *et al. Anal Biochem* 1980, 104, pág. 485). el DH2MB se sintetizó como se describe en el Ejemplo 8 y se cuantificó basándose en la suposición de que DHIV y DH2MB presentan el mismo factor de respuesta. El acetolactato racémico se preparó mediante hidrólisis de etil-2-acetoxi-2-metilacetoacetato (EAMMA) con NaOH (Krampitz, L. O. *Methods in Enzymology* 1957, 3, 277-283). En este método, DHIV y DH2MB están separados (Figura 8).

Ensayos de enzimas

Determinación de la concentración de proteínas: La concentración de proteína (del lisado de levadura o de la proteína purificada) se determinó usando el kit de reactivos para el ensayo de proteínas BioRad Bradford (Cat n.º 500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA) y usando BSA para la curva patrón. Se realizó una curva patrón para el ensayo usando una serie de dilución de una solución madre de proteína patrón de 500 µg/ml de BSA. Se realizó una dilución apropiada del lisado celular en agua para obtener las mediciones de DO₅₉₅ de cada lisado que estaban dentro del intervalo lineal de la curva patrón de la proteína BioRad. Se añadieron diez µl de la dilución del lisado a 500 µl de colorante de ensayo de proteína BioRad diluido, las muestras se mezclaron mediante agitación con formación de vórtice y se incubaron a temperatura ambiente durante 6 min. Se transfirieron las muestras a cubetas y se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro. Se usó la regresión lineal de los patrones para calcular la concentración de proteína de cada muestra.

Ensayo de alcohol deshidrogenasa (ADH). Se descongelaron células en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5). Se añadieron 1.000 µl de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 875 µl de suspensión celular. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a una a la velocidad máxima con 1 min de incubaciones en hielo entre cada etapa de batido de las perlas. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 23.500 xg a 4 °C y se retiró el sobrenadante para su uso. Estos lisados se mantuvieron en hielo hasta que se analizaron. Las concentraciones de proteína de lisado de levadura se determinaron como se describe.

Se realizaron diluciones de las muestras de manera que se pudiera obtener una lectura de la actividad. En general, las muestras de las cepas que se espera que tengan una actividad ADH baja se diluyeron 1:5 en tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5) y las muestras de las cepas con una actividad ADH alta esperada, como las cepas en las que el gen ADH se expresa desde un plásmido de alto número de copias se diluyeron de 1:40 a 1:100. Las reacciones se

realizaron por triplicado usando 10 µl de extracto celular diluido adecuadamente con 90 µl de tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NADH 150 µM; isobutiraldehído 11 mM) en una placa de 96 pocillos en un lector de multiplacas SpectraMax® 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La reacción se siguió a 340 nm durante 5 minutos, con lecturas de absorbancia cada 10 segundos. Las reacciones se realizaron a 30 °C. Las reacciones se

Ensayo de oxidación de isobutiraldehído (ensayo ALD6): Los sedimentos celulares se descongelaron en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, ditioneitol 1 mM, glicerol al 5 % p/v). Se añadió 1 ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para cada muestra y se añadieron 850 µl de suspensión celular. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a velocidad completa con 1 min de incubación en hielo entre medias. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 21.500 xg a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Los extractos se mantuvieron en hielo hasta su ensayo. Las concentraciones de proteína de lisado de levadura se determinaron como se describe.

El método usado para medir la actividad enzimática de las enzimas que catalizan la oxidación del isobutiraldehído en isobutirato en lisados celulares se modificó de Meaden *et al.*, 1997, "Yeast" 13: 1319-1327 y Postma *et al.* 1988, *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 468-477. En resumen, para cada muestra, se añadieron 10 µl de lisado celular sin diluir a 6 pocillos de una placa de microtitulación UV. Tres pocillos recibieron 90 µl de tampón de ensayo que contenía HEPES-NaOH 50 mM a pH 7,5, NADP + 0,4 mM, MgCl₂ 3,75 mM y 0,1 mM, isobutiraldehído 1 mM o 10 mM. Los otros 3 pocillos recibieron 90 µl de tampón sin sustrato (igual que el tampón de ensayo pero sin isobutiraldehído). Los tampones se mezclaron con el lisado en los pocillos pipeteando arriba y abajo. Las reacciones se monitorizaron a 340 nm durante 5 minutos, con lecturas de absorbancia tomadas cada 10 segundos en un lector de placas SpectraMax® 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las reacciones se realizaron a 30 °C. El V_{máx} para cada muestra se determinó restando la lectura de fondo del control sin sustrato. También se realizó un control sin lisado por triplicado para cada concentración de sustrato.

Ensayo de ALS: Para los ensayos de ALS descritos en los Ejemplos 1-18, las células se descongelaron en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 6,0 y MgSO₄ 1 mM). Se añadieron 1.000 µl de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 875 µl de suspensión celular. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a una a la velocidad máxima con 1 min de incubaciones en hielo entre cada etapa de batido de las perlas. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 23.500 xg a 4 °C y se retiró el sobrenadante para su uso. Estos lisados se mantuvieron en hielo hasta que se analizaron. El contenido de proteína de los lisados se midió como se describe. Todos los ensayos de ALS se realizaron por triplicado para cada lisado, tanto con como sin sustrato. Para ensayar cada lisado, se mezclaron 15 µl de lisado con 135 µl de tampón (tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 6,0, MgSO₄ 1 mM, tiamina pirofosfato 1 mM, piruvato 110 mM) y se incubaron durante 15 minutos a 30 °C. Se prepararon tampones a temperatura ambiente. También se incluyó un control sin sustrato (tampón sin piruvato) y un control sin lisado (tampón de lisis en lugar de lisado). Después de la incubación, se añadieron 21,5 µl de H₂SO₄ al 35 % a cada reacción y se incubaron a 37 °C durante 1 h.

Para los ensayos de ALS descritos en los Ejemplos 19-25, se descongelaron las células en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (NaPO₄ 100 mM, pH 7,0, MgCl₂ 5 mM y DTT 1 mM). Se añadió un ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 800 µl de la suspensión celular al tubo que contenía perlas de vidrio. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA) y un bloque de enfriamiento mezclando seis veces durante 1 minuto cada vez a 30 ciclos/segundo con 1 minuto de formación de hielo entre las mezclas. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 21.500 xg a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Los extractos se mantuvieron en hielo hasta su ensayo. La concentración de proteína de lisado de levadura se determinó usando el kit de reactivos de ensayo de proteína BioRad Bradford (Cat n.º 500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA) y usando BSA para la curva patrón como se ha descrito. Todos los ensayos de ALS se realizaron por triplicado para cada lisado. Todos los tampones, lisados y tubos de reacción se enfriaron previamente en hielo. Para ensayar cada lisado, se mezclaron 15 µl de lisado (diluido con tampón de lisis según fue necesario) con 135 µl de tampón de ensayo (KPi 50 mM, pH 7,0, MgSO₄ 1 mM, pirofosfato de tiamina 1 mM, piruvato 110 mM, y se incubaron durante 15 minutos a 30 °C. También se incluyó un control sin sustrato (tampón sin piruvato) y un control sin lisado (tampón de lisis en lugar de lisado). Tras la incubación, se mezcló cada reacción con 21,5 µl de H₂SO₄ al 35 %, se incubó a 37 °C durante 1 h y se centrifugó durante 5 min a 5.000 x g para eliminar cualquier precipitante insoluble.

Se analizaron todas las muestras de ensayo para el sustrato de ensayo (piruvato) y el producto (acetoína) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento HP-1200 dotado de dos columnas Restek RFQ 150 x 4,6 mm en serie. Los metabolitos de ácidos orgánicos se detectaron usando un detector de UV HP-1100 (210 nm) y un índice de refracción. La temperatura de la columna fue de 60 °C. Este método fue isocrático con H₂SO₄ 0,0180 N (en agua Milli-Q) como fase móvil. El flujo se ajustó a 1,1 ml/min. El volumen de inyección fue de 20 µl y el tiempo de ejecución fue de 8 min. El análisis se realizó usando patrones auténticos (> 99 %, obtenidos de Sigma-Aldrich) y una curva de calibración de 5 puntos.

Ensayo de enzima TMA29: Los sedimentos celulares se descongelaron en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, ditiotreitolo 1 mM, glicerol al 5 % p/v). Se añadió 1 ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para cada muestra y se añadieron 850 µl de suspensión celular. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a velocidad completa con 1 min de incubación en hielo entre medias. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 21.500 xg a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Los extractos se mantuvieron en hielo hasta su ensayo. La concentración de proteína de lisado de levadura se determinó usando el kit de reactivos de ensayo de proteína BioRad Bradford (Cat n.º 500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA) y usando BSA para la curva patrón como se ha descrito.

La síntesis enzimática de (S)-2-acetolactato ((S)-AL) se realizó en un matraz anaeróbico. La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 55 ml que contenía fosfato potásico 20 mM, pH 7,0, MgCl₂ 1 mM, pirofosfato de tiamina 0,05 mM (TPP) y piruvato sódico 200 mM. La síntesis se inició mediante la adición de 65 unidades de AlsS de *B. subtilis* purificada y la reacción se incubó a 30 °C en una incubadora estática durante 7,5 h.

La síntesis química del 2-acetolactato racémico ((R/S) -2-AL) se realizó mezclando 50 µl de etil-2-acetoxi-2-metilacetato (EAMMA) con 990 µl de agua. Luego, se añadieron 260 µl de NaOH 2 N en incrementos de 10 µl con 15 segundos de agitación con formación de vórtice después de cada adición. La solución se mezcló luego en un agitador orbital durante 20 minutos.

La síntesis química de AHB racémico ((R/S)-AHB) se realizó mezclando 50 µl de etil-2-acetoxi-2-etil-3-oxobutanoato con 990 µl de agua. Luego, se añadió NaOH 2 N en incrementos de 10 µl con 15 segundos de agitación con formación de vórtice después de cada adición. El NaOH se añadió hasta que el pH de la solución fue de 12 (-180 µl de NaOH 2 N). La solución se mezcló luego en un agitador orbital durante 20 minutos.

Para la determinación de la actividad de reducción de (S)-AL, (R/S)-AL o (R/S)-AHB, se añadieron 10 µl de lisado celular sin diluir a 6 pocillos de una placa de microtitulación UV. Tres pocillos recibieron 90 µl de tampón de ensayo que contenía KPO₄ 100 mM a pH 7,0, NADPH 150 µM y (S)-AL 5 mM o (R/S)-AL 10 mM o (R/S)-AHB 10 mM como sustrato. Los otros 3 pocillos recibieron 90 µl de tampón de ensayo pero sin sustrato. Los tampones se mezclaron con el lisado en los pocillos pipeteando arriba y abajo. Las reacciones se controlaron a 340 nm, con lecturas de absorbancia tomadas cada 10 segundos en un lector de placas SpectraMax® 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las reacciones se realizaron a 30 °C. La actividad de reducción de (S)-AL, (R/S)-AL o (R/S)-AHB para cada muestra se determinó restando la lectura de fondo del control sin sustrato. También se realizó un control sin lisado por triplicado.

Ensayo de enzimas DHAD: Se descongelaron sedimentos celulares en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 8,0, MgSO₄ 5 mM, y Yeast/ Fungal Protease Arrest™ de Biosciences (St. Louis, MO, EE.UU., n.º de catálogo 788-333)). Se añadió 1 ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para cada muestra y se añadieron 850 µl de suspensión celular. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a velocidad completa con 1 min de incubación en hielo entre medias. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 21.500 xg a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Los extractos se mantuvieron en hielo hasta su ensayo. La concentración de proteína de lisado de levadura se determinó como se describe. Se diluyó la proteína de cada muestra en un tampón de ensayo de DHAD (Tris 50 mM pH 8, MgSO₄ 5 mM) hasta una concentración final de 0,5 µg/µl. Se ensayaron tres muestras de cada lisado, junto con ningún control de lisado. Se añadieron 10 µl de cada muestra (o tampón de ensayo de DHAD) a tubos de PCR de 0,2 ml. Usando una pipeta multicanal, se añadieron 90 µl del sustrato a cada tubo (la mezcla del sustrato se preparó añadiendo 4 ml de tampón de ensayo de DHAD a 0,5 ml de DHIV 100 mM). Se dispusieron las muestras en un termociclador (Eppendorf Mastercycler) a 35 °C durante 30 min, seguido de una incubación de 5 min a 95 °C. Las muestras se enfriaron hasta 4 °C en el termociclador, luego se centrifugaron a 3.000 xg durante 5 minutos. Finalmente, se transfirieron 75 µl de sobrenadante a nuevos tubos de PCR y se analizaron mediante HPLC de la siguiente manera. Se añadieron 100 µl de reactivo DNPH (2,4-Dinitrofenil-hidracina 12 mM, ácido cítrico 10 mM pH 3,0, acetonitrilo al 80 % y H₂O MilliQ al 20 %) a 100 µl de cada una muestra. Se incubaron las muestras durante 30 min a 70 °C en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler). Se realizó el análisis del cetioisovalerato y el isobutiraldehído en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento HP-1200 dotado de una columna de fase inversa Eclipse XDB C-18 (Agilent) y una protección de columna de fase inversa C-18 (Phenomenex). El cetioisovalerato y el isobutiraldehído se detectaron usando un detector de UV HP-1100 (210 nm). La temperatura de la columna fue de 50 °C. Este método fue isocrático con acetonitrilo al 70 % a agua como fase móvil con ácido fosfórico al 2,5 % diluido (4 %). El flujo se ajustó a 3 ml/min. El tamaño de inyección fue de 10 µl y el tiempo de ejecución fue de 2 min.

Ejemplo 1: Aumento de la proporción de isobutanol/isobutirato mediante el aumento de la actividad de ADH en *S. cerevisiae*

El fin de este ejemplo es demostrar que el aumento de la actividad de la alcohol deshidrogenasa produce un aumento en el rendimiento del isobutanol, una disminución del rendimiento del isobutirato y un aumento en la relación entre el rendimiento del isobutanol y el rendimiento del isobutirato.

Las cepas y los plásmidos descritos en este ejemplo se muestran en las Tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 7. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 1.

Número GEVO	Genotipo
GEVO2843	<i>S. cerevisiae</i> , MATa <i>ura3 leu2 his3 trp1</i> <i>pdh1Δ::P_{CUP1}:[Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdh5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdh6Δ::[URA3:bla:</i> <i>P_{TEF1}:LI_kivD2:P_{TDH3}:Dm_ADH]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

5

Tabla 8. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 1.

Nombre del plásmido	Genes relevantes/Uso	Genotipo
pGV2011	2 μ de plásmido que expresa KARI y DHAD	<i>P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V},</i> <i>P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc,</i> <i>ori 2 μ, bla, G418R</i>
pGV2485	2 μ de plásmido que expresa KARI, DHAD y ADH	<i>P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V},</i> <i>P_{TEF1}:LI-ilvD_coSc,</i> <i>P_{ENO2}:LI_adhA,</i> <i>ori 2 μ, bla, G418R</i>

La cepa GEVO2843 de *S. cerevisiae*, que expresa una única alcohol deshidrogenasa (ADH de *D. melanogaster*, Dm_ADH) a partir de su ADN cromosómico que se transformó con plásmidos pGV2011 de 2 μ portadores de solo la KARI y la DHAD (*Ec_ilvC_Q110V* and *LI_ilvD_coSc*, respectivamente) o pGV2485 portador de la KARI, DHAD y ADH (*Ec_ilvC_Q110V*, *LI_ilvD_coSc* y *LI_adhA*, respectivamente) como se describe.

10

Para iniciar cultivos de fermentación, se iniciaron pequeños cultivos de una noche de las cepas transformadas en medio YPD que contenía etanol al 1 % y G418 a 0,2 g/l, y se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Se ensayaron tres réplicas biológicas de cada cepa. A la mañana siguiente, se determinó la DO₆₀₀ de estos cultivos y se usó una cantidad apropiada para inocular 50 ml del mismo medio en un matraz con tabique deflector de 50 ml a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,1. Estos precultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm durante la noche. Cuando los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 5-6, se centrifugaron a 2700 rpm durante 5 minutos a 25 °C en tubos Falcon de 50 ml. Se volvieron a suspender Las células de un cultivo de 50 ml (un clon) en YPD que contenía glucosa al 8 %, G418 a 0,2 g/l, etanol al 1 % (v/v) (que contiene 3 g/l de ergosterol y 132 g/l de Tween-80), y se tamponó a pH 6,5 con MES 200 mM. A continuación, se transfirieron los cultivos a 250 ml de matraces sin tabique deflector y se incubaron a 30 °C y 75 rpm.

15

20

A las 72 h, se tomaron muestras de cada matraz de fermentación para determinar la DO₆₀₀, la actividad de ADH, y para el análisis mediante GC1 y LC1. Para preparar las muestras para los análisis de GC1 y LC1, se centrifugó un volumen apropiado de cultivo celular en una microcentrífuga durante 10 minutos a velocidad máxima y se retiró el sobrenadante para el análisis de GC1 y LC1. Los sedimentos celulares se prepararon para los ensayos de ADH mediante centrifugación de 14 ml de medio de cultivo a 3000 x g durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró y las células se lavaron en 3 ml en agua esterilizada fría. Los tubos se centrifugaron según lo anterior durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y los tubos se volvieron a pesar para determinar el peso celular total. Los tubos Falcon se almacenaron a -80 °C. Los ensayos de ADH se realizaron como se describe.

25

30

La Tabla 9 muestra la DO₆₀₀ para cada cepa en el transcurso de la fermentación. Durante las 72 h de esta fermentación, Las DO₆₀₀ de las cepas fueron similares: comenzaron con una DO₆₀₀ de aproximadamente 7 y terminaron con una DO₆₀₀ de aproximadamente 9. La actividad enzimática de ADH *in vitro* de los lisados de GEVO2843 transformados con los dos plásmidos se midió durante el punto de tiempo de 72 h. La Tabla 9 muestra la actividad de ADH en los lisados medida *in vitro*. La cepa portadora del plásmido sin ADH (pGV2011) mostró una actividad de aproximadamente 0,04 U/mg. La cepa portadora del plásmido con el gen *LI_adhA*, (pGV2485), tenía aproximadamente 7 veces más actividad de ADH.

35

Tabla 9. DO₆₀₀ y actividad de la alcohol deshidrogenasa de la cepa GEVO2843 transformada por los plásmidos pGV2011 o pGV2485 tras 72 h de fermentación.

GEVO2843 transformada con	DO ₆₀₀	Actividad de ADH [U/mg]
pGV2011	8,5	0,04
pGV2485	9,1	0,29

En la Tabla 10, se muestran los títulos de isobutanol e isobutirato tras 72 h de fermentación. El título de isobutanol en la cepa con una actividad de ADH baja de 0,04 U/mg fue significativamente menor en comparación con la cepa con una actividad de ADH alta de 0,29 U/mg. El título de isobutirato en la cepa con una actividad de ADH baja de 0,04 U/mg fue significativamente mayor en comparación con la cepa con una actividad de ADH alta de 0,29 U/mg. La Tabla 6 también muestra el rendimiento del isobutirato e isobutanol tras 72 h de fermentación. El rendimiento del isobutanol en la cepa con una actividad de ADH baja de 0,04 U/mg fue significativamente menor en comparación con la cepa con una actividad de ADH alta de 0,29 U/mg. El rendimiento del isobutirato en la cepa con una actividad de ADH baja de 0,04 U/mg fue significativamente mayor en comparación con la cepa con una actividad de ADH alta de 0,29 U/mg.

Tabla 10. Títulos y rendimientos para el isobutanol e isobutirato en la cepa GEVO2843 transformada con los plásmidos pGV2011 o pGV2485 tras 72 h de fermentación.

	Título de isobutanol [g/l]	Título de isobutirato [g/l]	Rendimiento del isobutanol [mol/mol de glucosa]	Rendimiento del isobutirato [mol/mol de glucosa]	Proporción de rendimiento (isobutanol/isobutirato)
pGV2011	3,2	3,8	0,22	0,22	1,0
pGV2485	4,7	1,9	0,33	0,11	3,0

Ejemplo 2: Proporción de isobutanol/isobutirato más aumentada mediante el uso de la variante ADH LI AdhA^{RE1} en *S. cerevisiae*

El fin de este ejemplo es demostrar que la expresión de una alcohol deshidrogenasa con k_{cat} aumentada y K_M disminuida produce un aumento adicional en el rendimiento de isobutanol, una disminución del rendimiento del isobutirato y un aumento en la relación entre el rendimiento del isobutanol y el rendimiento del isobutirato.

Tabla 11. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 2.

Número GEVO	Genotipo
GEVO2843	<i>S. cerevisiae</i> , MATa <i>ura3 leu2 his3 trp1</i> $pd c1 \Delta::P_{CUP1}:[Bs_alsS1_coSc:T_{CUP1}:P_{PGK1}:LI_kivD2:P_{ENO2}:Sp_HIS5]$ $pd cS\Delta::(LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3\Delta N:Ec_ilvC_coSc^{Q110V})$ $pd c6\Delta::[URA3:bla:P_{TEF1}:LI_kivD2:Dm_ADH]$ {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

Tabla 12. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 2.

Nombre del plásmido	Genes relevantes/Uso	Genotipo
pGV2543	2 μ de plásmido que expresa KARI, DHAD, KIVD, and ADH (LI_AdhA ^{his6})	$P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}$, $P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc$, $P_{PGK1}:LI_kivD_coEc$, $P_{ENO2}:LI_AdhA^{his6}$, ori 2 μ , <i>bla</i> , G418R
pGV2545	2 μ de plásmido que expresa KARI, DHAD, KIVD y ADH (LI_AdhA ^{RE1-his6})	$P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}$, $P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc$, $P_{PGK1}:LI_kivD_coEc$, $P_{ENO2}:LI_AdhA^{RE1-his6}$, ori 2 μ , <i>bla</i> , G418R

La cepa GEVO2843 de *S. cerevisiae*, que expresa una sola alcohol deshidrogenasa (ADH, Dm_ADH de *D. melanogaster*) a partir de su ADN cromosómico que se transformó con plásmidos pGV2543 de 2 μ m portadores de KARI, DHAD, KIVD y ADH de tipo silvestre con codones optimizados marcada con His (Ec_ilvC^{Q110V} , LI_ilvD_coSc y $LI_adhA_coSc^{his6}$, respectivamente) o pGV2545 portador de KARI, DHAD, KIVD y ADH mutante con codones

optimizados marcada con His (*Ec_ilvC^{Q110V}*, *LI_ilvD_coSc* y *LI_adhA^{RE1}_coSc^{his6}*, respectivamente). Estas cepas se cultivaron y se evaluaron para determinar la actividad de la enzima ADH y la producción de metabolitos extracelulares mediante GC1 y LC1 como se describe.

- 5 Los parámetros cinéticos de los productos genéticos de *LI_adhA_coSc^{his6}* *LI_adhA^{RE1}_coSc^{his6}* (*LI_adhA^{his6}* y *LI_adhA^{RE1-his6}*, respectivamente) se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Comparación de los parámetros cinéticos de *LI_adhA^{his6}* de tipo silvestre con *LI_adhA^{RE1}* modificado medido para el isobutiraldehído con NADH como cofactor.

Variante	K_M [Isobutiraldehído mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
<i>LI_adhA^{his6}</i>	11,7	51	4400
<i>LI_adhA^{RE1-his6}</i>	1,6	84	49700

10 La Tabla 14 muestra la DO_{600} para cada cepa en el transcurso de la fermentación. Durante las 72 h de esta fermentación, Las DO_{600} de las cepas fueron similares: comenzaron con una DO_{600} de aproximadamente 6 y terminaron con una DO_{600} de aproximadamente 9. La actividad enzimática de ADH *in vitro* de los lisados de GEVO2843 transformados con los dos plásmidos se midió durante el punto de tiempo de 72 h. La Tabla 14 muestra la actividad de ADH en los lisados medida *in vitro* como se ha descrito anteriormente. La cepa portadora del plásmido con *LI_adhA_coSc^{his6}* (pGV2543) mostró una actividad de aproximadamente 0,38 U/mg. La cepa portadora del plásmido con el gen *LI_adhA^{RE1}_coSc^{his6}*, (pGV2545), tenía aproximadamente 7 veces más actividad de ADH.

Tabla 14. DO_{600} y actividad de la alcohol deshidrogenasa de la cepa GEVO2843 transformada por los plásmidos pGV2543 o pGV2545 tras 72 h de fermentación.

GEVO2843 transformada con	DO_{600}	Actividad de ADH [U/mg]
pGV2543	8,5	0,38
pGV2545	8,8	2,46

25 En la Tabla 15, se muestran los títulos de isobutanol e isobutirato y el rendimiento tras 72 h de fermentación. El título de isobutanol y el rendimiento en la cepa portadora de pGV2543 fue menor en comparación con la cepa portadora de pGV2545. El título de isobutirato y el rendimiento en la cepa portadora de pGV2543 fue significativamente mayor en comparación con la cepa portadora de pGV2545.

Tabla 15. Títulos y rendimientos para el isobutanol e isobutirato en la cepa GEVO2843 transformada con los plásmidos pGV2543 o pGV2545 tras 72 h de fermentación.

GEVO2843 transformada con	Isobutanol [g/l]	Isobutirato [g/l]	Rendimiento del isobutanol [mol/mol de glucosa]	Rendimiento del isobutirato [mol/mol de glucosa]	Proporción de rendimiento (isobutanol/isobutirato)
pGV2543	4,6	1,3	0,28	0,06	4
pGV2545	4,9	0,3	0,29	0,01	20

30 Ejemplo 3: Aumento adicional de la proporción de isobutanol/isobutirato en *S. cerevisiae* mediante la expresión de RE1

El fin de este ejemplo es demostrar que la expresión de una alcohol deshidrogenasa con k_{cat} aumentada y K_M disminuida produce un aumento en el rendimiento del isobutanol y una disminución en el rendimiento del isobutirato en fermentaciones realizadas en recipientes fermentadores.

35 Se realizó una fermentación para comparar el rendimiento de las cepas GEVO3519 y GEVO3523 de *S. cerevisiae*. Los títulos y rendimientos del isobutanol y del isobutirato se midieron durante la fermentación. GEVO3519 porta un plásmido pGV2524 de 2 μ que contiene genes que codifican las siguientes enzimas: KARI, DHAD, KIVD y ADH de *Lactococcus lactis* de tipo silvestre con optimización de codones marcada con His. GEVO3523 porta un plásmido pGV2524 de 2 μ que contiene genes que codifican las siguientes enzimas: KARI, DHAD, KIVD y una variante mejorada de la ADH de *Lactococcus lactis* con optimización de codones marcada con His que tiene K_M disminuida y k_{cat} aumentada. Estas cepas se evaluaron para determinar el consumo de isobutanol, isobutiraldehído, y glucosa mediante LC1 y GC1, así como la DO_{600} durante una fermentación en recipientes fermentadores DasGip.

Tabla 16. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 3.

Número GEVO	Genotipo
GEVO3128	<i>S.cerevisiae</i> , MATa <i>ura3 leu2 his3 trp1</i> <i>gpd2Δ::[TKL_URA3_corto:P_{FBA1}:KI-URA3:TKL_URA3]</i> <i>gpd1Δ::P_{ccW12}:hph</i> <i>pdcc1Δ::[P_{CUP1}:Bs-alsS1-CoSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:U-kivDkivD2:P_{ENO2}:Sp-HIS5]</i> <i>pdcc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1};IL V3Δ N:P_{TDH3}:Ec_ilvC-coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcc6Δ::[P_{TEF1}:UJlvD:P_{TDH3}:EcIlvC-coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc-TRP1]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3519	GEVO3128 transformada con el plásmido pGV2524
GEVO3523	GEVO3128 transformada con el plásmido pGV2546

Tabla 17. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 3.

Nombre del plásmido	Genes relevantes/Uso	Genotipo
pGV2524	2 μ de plásmido	<i>P_{TDH3}:Ec-ilvC-coSc^{P2D1-A1}, P_{TEF1}:LI_ilvD-coSc,</i> <i>P_{PGK1}:LI-kivD2-coEc P_{ENO2}:LI-adhA-coSc^{his6}, 2 μ ori,</i> <i>bla, G418R</i>
pGV2546	2 μ de plásmido	<i>P_{TDH3}:Ec-ilvC-coSc^{P2D1-A1}, P_{TEF1}:LI_ilvD-coSc,</i> <i>P_{PGK1}:LI-kivD2-coEc P_{ENO2}:LI-adhA-coSc^{RE1-his6}, 2 μ</i> <i>ori, bla, G418R</i>

5

La cepa GEVO3128 de *S. cerevisiae* se transformó bien con el plásmido pGV2524 o pGV2546 de 2 μ, para generar las cepas GEVO3519 y GEVO3523, respectivamente como se describe. Se iniciaron cultivos de inóculo de GEVO3519 y GEVO3523 inoculando 500 ml de matraces con tabique deflector que contenían 80 ml de medio YPD, 0,2 g/l de antibiótico G418, etanol al 1 % v/v y triptófano a 0,019 g/l. Los cultivos se incubaron durante aproximadamente 34 h. El agitador orbital se fijó a 250 rpm y 30 °C en ambos experimentos. Se logró una masa celular similar para las cepas GEVO3519 y GEVO3523. La densidad celular lograda después de la incubación fue de DO₆₀₀ 8,0. Se realizaron fermentaciones por lotes en medio YPD que contenía glucosa a 80 g/l, G418 a 0,2 g/l, etanol al 1 % v/v y triptófano a 0,019 g/l usando 2 recipientes de DasGip con motor de impulsión superior con un volumen de trabajo de 0,9 l por recipiente. Los recipientes se esterilizaron, junto con el oxígeno disuelto apropiado y las sondas de pH, durante 60 minutos a 121 °C. Las sondas de oxígeno disuelto se calibraron después de la esterilización para permitir la polarización, sin embargo, las sondas de pH se calibraron antes de la esterilización. El pH se controló a pH 6,0 usando KOH 6 N y H₂SO₄ 2 N. Durante la fase de crecimiento del cultivo, la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) fue de 10 mM/h y, durante la fase de producción del cultivo, la OTR fue de 0,2 mM/h.

10

15

20

25

La Tabla 18 muestra el título de isobutanol y el rendimiento (como % teórico) calculados para la fase de producción del cultivo. Tanto el título de isobutanol como el rendimiento se aumentan en la cepa GEVO3523 portadora de la alcohol deshidrogenasa con K_M reducida y k_{cat} aumentada. La Tabla 18 también muestra el título de isobutirato, presentado como el título máximo alcanzado y el rendimiento como el rendimiento de carbono en %. Tanto el título de isobutirato como el rendimiento fueron menores en la cepa GEVO3523 portadora de la alcohol deshidrogenasa con K_M reducida y k_{cat} aumentada.

Tabla 18. Títulos y rendimientos de isobutanol e isobutirato.

Cepa	Título de isobutanol [g/l]	Rendimiento de isobutanol [% teórico]	Título de isobutirato [g/l]	Rendimiento de isobutirato [% teórico]
GEVO3519	3,9 ± 0,4	50,5 ± 2,1	0,82 ± 0,04	4,0 ± 0,0
GEVO3523	5,0 ± 0,3	59,5 ± 2,1	0,40 ± 0,01	2,0 ± 0,0

Ejemplo 4: Disminución de la producción de isobutirato y acetato en las fermentaciones con delección del gen *ALD6* en *S. cerevisiae*

30

El siguiente ejemplo ilustra que la delección del gen *ALD6* conduce a una disminución en la producción de isobutirato y acetato en las fermentaciones.

Construcción de cepas de delección de *ALD6*: Se usó la PCR para generar un fragmento de ADN que contuviera un alelo de delección de *ALD6* para la delección de *ALD6* de *S. cerevisiae*. Una reacción de PCR amplificó un fragmento de ADN (A) que comprende la región flanqueante dirección 5' de *ALD6* y una región de solapamiento en el extremo 3' del fragmento de ADN con el extremo 5' de la región promotora P_{Sc_CCW12} de pGV1954, usando los cebadores oGV2834 y oGV2835. Otra reacción de PCR amplificó un fragmento de ADN (D) que comprendía la región flanqueante dirección 3' de *ALD6* y una región de solapamiento en el extremo 5' del fragmento de ADN con el extremo 3' del ORF de resistencia a la higromicina *hph* de pGV2074, usando cebadores oGV2836 y oGV2837. Otra reacción de PCR amplificó un fragmento de ADN (B) que comprendía la región promotora P_{Sc_CCW12} de pGV1954 con una región de solapamiento en el extremo 5' del fragmento de ADN con el extremo 3' de la región flanqueante dirección 5' de *ALD6* (fragmento A) y una región en el extremo 3' del fragmento de ADN con el extremo 5' del ORF de resistencia a la higromicina *hph* de pGV2074, usando los cebadores oGV2631 y oGV2632. Otra reacción de PCR amplificó un fragmento de ADN (C) que comprendía el ORF de resistencia a la higromicina *hph* de pGV2074 con una región de solapamiento en el extremo 5' del fragmento de ADN con el extremo 3' de la región promotora P_{Sc_CCW12} de pGV1954 (fragmento B) y una región de superposición en el extremo 3' del fragmento de ADN con el extremo 5' de la región flanqueante en dirección 3' de *ALD6* (fragmento D), usando los cebadores oGV2633 y oGV2634. Se combinaron los fragmentos de ADN A y B mediante PCR usando los cebadores oGV2834 y oGV2632 para generar el fragmento de ADN AB, y los fragmentos de ADN C y D se combinaron mediante PCR usando los cebadores oGV2633 y oGV2837 para generar el fragmento de ADN CD. Los fragmentos de ADN AB y CD se combinaron mediante PCR usando los cebadores oGV2834 y oGV2837 para generar el fragmento final de ADN ABCD que contenía el alelo de delección de *ALD6*.

Tabla 19. Secuencias de cebadores desveladas en el Ejemplo 4.

oGV n.º	Secuencia
oGV968	ACTCGCCGATAGTGGAACCGACG (SEQ ID NO: 62)
oGV1965	CAAACGTGTGATGGACGACACC (SEQ ID NO: 63)
oGV2631	CAATACGTTATGCCGTAATGAAG (SEQ ID NO: 64)
oGV2632	GCTTTTTACCCATTATTGATATAGTGTTTAAGCGAATG (SEQ ID NO: 65)
oGV2633	CACTATATCAATAATGGGTAAAAAGCCTGAACCTCAC (SEQ ID NO: 66)
oGV2634	TTATTCCTTTGCCCTCGGACG (SEQ ID NO: 67)
oGV2680	TGCACTGCTGTCTTCACTTC (SEQ ID NO: 68)
oGV2796	TGTCAGCGCTTCAGACTC (SEQ ID NO: 69)
oGV2797	AAGTATTTTAAAGGATTCGCTC (SEQ ID NO: 70)
oGV2798	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAAGTATTTTAAAGGATTCGCTC (SEQ ID NO: 71)
oGV2800	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAAGATAGTTATCATTATGTAAGTGCG (SEQ ID NO: 72)
oGV2801	GGGAGTTTAGCAATCAGC (SEQ ID NO: 73)
oGV2802	TGGTTGACCCGCAAACCTTC (SEQ ID NO: 74)
oGV2803	ACAATCTCCCTGTCTCCTCCC (SEQ ID NO: 75)
oGV2804	AAGGTGATTTGGCACAATTTC (SEQ ID NO: 76)
oGV2805	GGTACAATTCTGTCCTGAATTGTAG (SEQ ID NO: 77)
oGV2806	AGGTCCTAGAAATCCCTTAAG (SEQ ID NO: 78)
oGV2808	CTTCATTACGGCATAACGTATTGCGATATCAGTATACAAGGTAGGC (SEQ ID NO: 79)
oGV2810	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAAGGATTTAAGATGAGTGGTATTGG (SEQ ID NO: 80)
oGV2811	TGTTTCGTAACCTTTGTCTATCAC (SEQ ID NO: 81)
oGV2812	TCAGCATGCGGAACAATTG (SEQ ID NO: 82)
oGV2813	TCCACACGGTATCATACGATC (SEQ ID NO: 83)
oGV2814	GCGGTCGACAAGTTCAATATG (SEQ ID NO: 84)
oGV2815	TACTGAGCCGCCAACCTTAGTA (SEQ ID NO: 85)

(continuación)

oGV n.º	Secuencia
oGV2816	CATAACTATACCCGTACGCAG (SEQ ID NO: 86)
oGV2818	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAGCGTAGATCTACTGAACATGC (SEQ ID NO: 87)
oGV2820	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACATGAGATTGTCAAAGAGG (SEQ ID NO: 88)
oGV2821	CACCAGGCTTATTGATGACC (SEQ ID NO: 89)
oGV2822	CATTACCGGCAGTTGCTC (SEQ ID NO: 90)
oGV2824	TATGACAGTGCCTATCAAGC (SEQ ID NO: 91)
oGV2825	AATGGGTTCTACCAGTATC (SEQ ID NO: 92)
oGV2826	AAGCCGGGAACGTGCGTAAC (SEQ ID NO: 93)
oGV2827	CTTCATTACGGCATAACGTATTGGGAACGCGTAATGGTGCTTG (SEQ ID NO: 94)
oGV2828	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACCCGAGTTGACTGCTCATTG (SEQ ID NO: 95)
oGV2829	AATACTCGCCGAGGCGTAGG (SEQ ID NO: 96)
oGV2830	TTGGAGCTGGGAGGTAAATC (SEQ ID NO: 97)
oGV2831	TGCGGCTAACCCATATTGAG (SEQ ID NO: 98)
oGV2832	TACGCTGAGCGTAGTACAAC (SEQ ID NO: 99)
oGV2833	TAAAGCGCTGGGTGGACAACCG (SEQ ID NO: 100)
oGV2834	GCACCGAGACGTCATTGTTG (SEQ ID NO: 101)
oGV2835	CTTCATTACGGCATAACGTATTGTAAACACGCCAGGCTTGACC (SEQ ID NO: 102)
oGV2836	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAATCCATTCGGTGGTGTTAAGC (SEQ ID NO: 103)
oGV2837	ATGGCGAAATGGCAGTACTC (SEQ ID NO: 104)
oGV2838	ACCAACGACCCAAGAATC (SEQ ID NO: 105)
oGV2839	CTTTGCGACAGTGACAAC (SEQ ID NO: 106)
oGV2840	CCTCACGTAAGGGCATGATAG (SEQ ID NO: 107)
oGV2841	GCATTGCAGCGGTATTGTCAGG (SEQ ID NO: 108)
oGV2842	CAGCAGCCACATAGTATACC (SEQ ID NO: 109)
oGV2843	CTTCATTACGGCATAACGTATTGAGCCGTCGTTTGACATGTTG (SEQ ID NO: 110)
oGV2844	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAACGCTCCATTTGGAGGGATCG (SEQ ID NO: 111)
oGV2845	GAATGCGCTTGCTGCTAGGG (SEQ ID NO: 112)
oGV2846	CAGCTCTTGCTGCAGGTAACAC (SEQ ID NO: 113)
oGV2847	GGCACAATCTTGAGCCGTTAG (SEQ ID NO: 114)
oGV2848	ACCAAGCCATCAAGGTTGTC (SEQ ID NO: 115)
oGV2849	TGGGTGATGGTTTGGCGAATGC (SEQ ID NO: 116)
oGV2896	GAAATGATGACATGTGGAAATATAACAG (SEQ ID NO: 117)

Las cepas para demostrar la disminución de la producción de isobutirato y acetato mediante la delección de *ALD6* se construyeron mediante la transformación de GEVO3198 con el fragmento de ADN ABCD que contenía el alelo de delección de *ALD6*. Se seleccionaron transformantes para la resistencia a higromicina a 0,1 g/l y se rastrearon colonias de transformantes mediante PCR de colonias para la correcta integración del fragmento de ADN ABCD usando pares de cebadores oGV2840/oGV2680, oGV968/oGV2841 y oGV2838/oGV2839. Las cepas GEVO3711, GEVO3712 y GEVO3713 se identificaron mediante esta PCR de colonias como aquellas que tenían *ALD6* eliminado por la integración correcta del fragmento de ADN ABCD.

Se construyeron cepas que contenían una vía de producción de isobutanol para demostrar una producción reducida de isobutirato y acetato mediante la delección de *ALD6* mediante la transformación de GEVO3711, GEVO3712 y GEVO3713 con un plásmido de origen de replicación de 2 μ , pGV2247, genes portadores que expresaban KARI, DHAD, KIVD y ADH (*Ec_ilvC^{P2D1-A1}*, *LI_ilvD_coSc*, *LI_kivD2_coEc* y *LI_adhA*, respectivamente). Se seleccionaron transformantes por su resistencia a G418 a 0,2 g/l e higromicina a 0,1 g/l, y se purificaron volviendo a sembrar en estrías en medios que contenían higromicina a 0,1 g/l y G418 a 0,2 g/l, generando cepas GEVO3714, GEVO3715 y GEVO3716. Se generó una cepa de control de *ALD6* que contenía una vía de producción de isobutanol, GEVO3466, Mediante la transformación de GEVO3198 con el plásmido pGV2247. Se seleccionaron transformantes para la resistencia a G418 a 0,2 g/l y se purificaron volviendo a sembrar en estrías en medios que contenían G418 a 0,2 g/l.

Construcción de las cepas de delección de *ald2 Δ* , *ald3 Δ* , *ald4 Δ* , *ald5 Δ* y *hfd1 Δ* : Se usó la PCR para generar fragmentos de ADN separados que contenían alelos de delección individuales de *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5* y *HFD1* para la delección de *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5* y *HFD1* individualmente de *S. cerevisiae* en cepas separadas. Además, se usó la PCR para generar un fragmento de ADN que contuviera un alelo de delección que cubriera tanto *ALD2* como *ALD3*, que son genes adyacentes en el genoma de *S. cerevisiae*, para la delección de *ALD2* y *ALD3* juntos (*ald2 Δ ald3 Δ*) de *S. cerevisiae* en una cepa individual. Se generaron fragmentos de cuatro componentes que contenían la región flanqueante dirección 5', la región promotora de *P_{sc_CCW12}* de pGV1954, el ORF de resistencia a la higromicina *hph* de pGV2074 y la región flanqueante dirección 3' para cada gen individual mediante PCR para la generación del fragmento ABCD para la delección de *ALD6*, a excepción del uso de los pares de cebadores enumerados en la Tabla 20. El fragmento de cuatro componentes para la delección de *ALD2* y *ALD3* juntos contenía la región flanqueante dirección 5' de *ALD2* y la región flanqueante dirección 3' de *ALD3* y se construyó de manera similar mediante PCR usando los pares de cebadores enumerados en la Tabla 20. La región promotora de *P_{sc_CCW12}* de pGV1954 siempre se amplificó con el par de cebadores oGV2631/oGV2632, y el ORF de resistencia a la higromicina *hph* de pGV2074 siempre se amplificó con el par de cebadores oGV2633/oGV2634.

Tabla 20. Cebadores usados para amplificar las regiones dirección 5' y dirección 3' para la delección de genes.

Delección de genes	Pares de cebadores para la región dirección 5'	Pares de cebadores para la región dirección 3'
<i>ald2Δ</i>	oGV2796/oGV2797, oGV2796/oGV2798	oGV2800/oGV2801
<i>ald3Δ</i>	oGV2806/oGV2808	oGV2810/oGV2811
<i>ald2Δ ald3Δ</i>	oGV2796/oGV2798	oGV2810/oGV2811
<i>ald4Δ</i>	oGV2816/oGV2818	oGV2820/oGV2821
<i>ald5Δ</i>	oGV2826/oGV2827	oGV2828/oGV2829
<i>ald6Δ</i>	oGV2834/oGV2835	oGV2836/oGV2837
<i>hfd1Δ</i>	oGV2842/oGV2843	oGV2844/oGV2845

Se construyeron cepas con delección de *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5* y *HFD1* individualmente y con la delección de *ALD2* y *ALD3* juntos mediante la transformación de GEVO3198 o GEVO3466 con el fragmento de ADN de cuatro componentes individual que contenía el alelo de delección individual de *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5* o *HFD1*, o con el fragmento de ADN de cuatro componentes que contenía el alelo de delección de *ALD2* y *ALD3* juntos. Se seleccionaron transformantes para la resistencia a la higromicina a 0,1 g/l y se rastrearon colonias de transformantes mediante PCR de colonias para la correcta integración del fragmento de ADN de cuatro componentes usando los pares de cebadores enumerados en la Tabla 21. La cepa GEVO3567 se identificó mediante esta PCR de colonias como cepa con *ALD2* eliminado correctamente; la cepa GEVO3568 se identificó mediante esta PCR de colonias como cepa con *ALD3* eliminado correctamente; la cepa GEVO3569 se identificó mediante esta PCR de colonias como cepa con *ALD2* y *ALD3* eliminados conjuntamente correctamente; la cepa GEVO3579 se identificó mediante esta PCR de colonias como cepa con *ALD4* eliminado correctamente; las cepas GEVO3705, GEVO3706 y GEVO3707 se identificaron mediante esta PCR de colonias como cepa con *ALD5* eliminado correctamente; y las cepas GEVO3720, GEVO3721 y GEVO3722 se identificaron mediante esta PCR de colonias como cepas con *HFD1* eliminado correctamente.

Se construyeron cepas que contenían una vía de producción de isobutanol y con delección de *ALD2*, *ALD3* y *ALD5* individualmente o con delección de *ALD2* y *ALD3* juntos mediante la transformación de las cepas GEVO3567, GEVO3568, GEVO3569, GEVO3705, GEVO3706 y GEVO3707 con plásmido pGV2247. Se seleccionaron transformantes por su resistencia a G418 a 0,2 g/l e higromicina a 0,1 g/l, y se purificaron volviendo a sembrar en estrías en medios que contenían higromicina a 0,1 g/l y G418 a 0,2 g/l, generando las cepas GEVO3586, GEVO3587, GEVO3588, GEVO3590, GEVO3591, GEVO3592, GEVO3593, GEVO3594, GEVO3595, GEVO3708, GEVO3709 y GEVO3710. Se generaron las cepas GEVO3579, GEVO3720, GEVO3721 y GEVO3722 a partir de GEVO3466 y, por lo tanto, contenían el plásmido pGV2247.

Tabla 21. Cebadores usados para detectar colonias para la verificación de eliminaciones de genes.

Deleción de genes	Pares de cebadores
<i>ald2Δ</i>	oGV2802/oGV2632, oGV968/oGV2803, oGV2804/oGV2805
<i>ald3Δ</i>	oGV2812/oGV2632, oGV968/oGV2813, oGV2814/oGV2815
<i>ald2Δ ald3Δ</i>	oGV2802/oGV2632, oGV968/oGV2813, oGV2804/oGV2805, oGV2814/oGV2815
<i>ald4Δ</i>	oGV2822/oGV2632, oGV968/oGV2896, oGV2824/oGV2825
<i>ald5Δ</i>	oGV2832/oGV2680, oGV1965/oGV2833, oGV2830/oGV2831
<i>ald6Δ</i>	oGV2840/oGV2680, oGV968/oGV2841, oGV2838/oGV2839
<i>hfd1Δ</i>	oGV2848/oGV2680, oGV968/oGV2849, oGV2846/oGV2847

Tabla 22. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 4.

GEVO n.º	Genotipo
GEVO3198	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1</i> <i>gpdΔ1::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3}_corto:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdclΔ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcl5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcl6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI-adhA:P_{FBA1}:Sc-TRP1]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido)
GEVO3466	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1</i> <i>gpdΔ1::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3}_corto:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdclΔ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcl5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcl6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc-TRP1]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido): transformado con pGV2247
GEVO3567	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3}_corto:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdclΔ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcl5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcl6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc-TRP1]</i> <i>ald2Δ::P_{Sc} CCW12:hph</i>{evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3568	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3}_corto:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdclΔ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcl5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcl6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc-TRP1]</i> <i>ald3Δ::P_{Sc} CCW12:hph</i>{evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

(continuación)

GEVO n.º	Genotipo
GEVO3569	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pd1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pd5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pd6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> ald2Δ :ald3Δ::P_{Sc} CCW12:hph {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3579	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pd1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pd5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pd6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> ald4Δ::P_{Sc} CCW12:hph{evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}; transformado con pGV2247
GEVO3586, GEVO3587 y GEVO3588	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pd1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pd5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pd6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> ald2Δ: ald3Δ::P_{Sc} CCW12:hph {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}; transformado con pGV2247
GEVO3590, GEVO3591 y GEVO3592	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1::T_{KI_URA3} gpd2::T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3-T_{KI_URA3}</i> <i>pd1::P_{CUP1}-Bs_alsS_coSc-T_{CYC1}-P_{PGK1}-LI_kivD2_coEc-P_{ENO2}-Sp_HIS5 pdc5::LEU2-bla-</i> <i>P_{TEF1}-Sc_ILV3ΔN-P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V} pdc6::P_{TEF1}-LI_ilvD_coSc-P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}-P_{ENO2}-LI_adhA-P_{FBA1}.Sc_TRP1 ald3Δ::P_{Sc} CCW12-hph</i> ald2Δ::P_{Sc} CCW12:hph{evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}; transformado con pGV2247
GEVO3593, GEVO3594 y GEVO3595	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1::T_{KI_URA3} gpd2::T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3-T_{KI_URA3}</i> <i>pd1::P_{CUP1}-Bs_alsS_coSc-T_{CYC1}-P_{PGK1}-LI_kivD2_coEc-P_{ENO2}-Sp_HIS5 pdc5::LEU2-bla-</i> <i>P_{TEF1}-Sc_ILV3ΔN-P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V} pdc6::P_{TEF1}-LI_ilvD_coSc-P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}-P_{ENO2}-LI_adhA-P_{FBA1}.Sc_TRP1 ald3Δ::P_{Sc} CCW12-hph</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}; transformado con pGV2247
GEVO3705, GEVO3706 y GEVO3707	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pd1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2-coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pd5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pd6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> ald5Δ::P_{Sc} CCW12-hph {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

(continuación)

GEVO n.º	Genotipo
GEVO3708, GEVO3709 y GEVO3710	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI-URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdc6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI-adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> ald5Δ::P_{Sc} CCW12:hph{evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}; transformado con pGV2247
GEVO3711, GEVO3712 y GEVO3713	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI-URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdc6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI-adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> ald6Δ::P_{Sc} CCW12:hph{evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3714, GEVO3715 y GEVO3716	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI-URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdc6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI-adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> ald6Δ::P_{Sc} CCW12:hph{evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}; transformado con pGV2247
GEVO3720, GEVO3721 y GEVO3722	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[T_{KI_URA3}] gpd2 Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI-URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_ILV3ΔN:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdc6Δ::[P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc:P_{TDH3}-Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI-adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> hfd1Δ::P_{Sc} CCW12:hph{evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}; transformado con pGV2247

Tabla 23. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 4.

Nombre del plásmido	Genotipo
pGV2247	<i>P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1} P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc P_{ENO2}: LI_adhA 2 μ-ori, pUC-ori, bla, G418R.</i>

Fermentaciones en matraz de agitación: Se realizaron fermentaciones para comparar el rendimiento de GEVO3466 con cepas que contenían las mutaciones de delección *ald2Δ*, *ald3Δ*, *ald2Δ ald3Δ*, *ald4Δ*, *ald5Δ*, *hfd1Δ* y *ald6Δ*. Se inocularon cepas de levadura de parches celulares o de colonias individuales purificadas de placas de agar YPD que contenían G418 a 0,2 g/l en 3 ml de YPD que contenía G418 a 0,2 g/l y medio de etanol al 1 % v/v en tubos de cierre a presión con fondo redondo de 14 ml. Los cultivos se incubaron durante la noche hasta 24 h con agitación en un ángulo a 250 rpm a 30 °C. Por separado para cada cepa, se usaron estos cultivos de una noche para inocular 50 ml de YPD que contenía G418 a 0,2 g/l y medio de etanol al 1 % v/v en un matraz con tabique deflector de 250 ml con un cierre de manguito hasta una DO₆₀₀ de 0,1. Se incubaron estos cultivos en matraz durante una noche hasta 24 h con agitación a 250 rpm a 30 °C. Las células de estos cultivos en matraz se recogieron por separado para cada cepa mediante centrifugación a 3.000 xg durante 5 minutos, y se volvió a suspender cada sedimento celular por separado en 5 ml de YPD que contenía glucosa a 80 g/l, solución madre al 1 % v/v de ergosterol a 3 g/l y Tween 80 a 132 g/l disuelto en etanol, tampón MES 200 mM, pH 6,5 y medio G418 a 0,2 g/l. Se usó cada suspensión celular para inocular 50 ml de YPD que contenía glucosa a 80 g/l, solución madre al 1 % v/v de ergosterol a 3 g/l y Tween 80 a 132 g/l

disuelto en etanol, tampón MES 200 mM, pH 6,5 y medio de G418 a 0,2 g/l en un matraz de 250 ml sin tabique deflector con un tapón de rosca ventilado a una DO_{600} de aproximadamente 5. Estas fermentaciones se incubaron agitando a 250 rpm a 30 °C. Periódicamente, se retiraron muestras de cada fermentación en matraz de agitación para medir la DO_{600} y para preparar el análisis de cromatografía de gases (GC1), para el isobutanol y otros metabolitos, y para el análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (LC1) para los ácidos orgánicos y la glucosa. Se retiraron muestras de 2 ml en un tubo de microcentrífuga y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 min a las rpm máximas. Un ml del sobrenadante fue el análisis de metabolitos extracelulares mediante GC1 y LC1 como se describe.

La delección de ALD6 disminuyó la producción de isobutirato y acetato en las fermentaciones en matraz de agitación: En la Tabla 24, se resumen los resultados de la fermentación en matraz de agitación durante 52 h para GEVO3466, y las cepas con *ald6Δ* GEVO3714, GEVO3715 y GEVO3716. Las cepas con *ald6Δ* GEVO3714, GEVO3715 y GEVO3716 produjeron un 71 % menos de isobutirato que la cepa con *ALD6* GEVO3466. Las cepas con *ald6Δ* GEVO3714, GEVO3715 y GEVO3716 también produjeron un 86 % menos de acetato que la cepa con *ALD6* GEVO3466. El rendimiento del isobutanol en las cepas con *ald6Δ* GEVO3714, GEVO3715 y GEVO3716 no fue apreciablemente diferente del de la cepa con *ALD6* GEVO3466. El título del isobutanol en las cepas con *ald6Δ* GEVO3714, GEVO3715 y GEVO3716 fue un 23 % más alto que el de la cepa con *ALD6* GEVO3466.

Tabla 24. Resultados de la fermentación en el matraz de agitación que demuestran la disminución de la producción de isobutirato y acetato por la delección de *ALD6*

Cepa	Título del isobutanol [g/l]	Rendimiento del isobutanol [% teórico]	Isobutirato producido [g/l]	Acetato producido [g/l]
GEVO3466 (<i>ALD6</i>)	2,6 ± 0,1	44 ± 2	0,48 ± 0,06	0,59 ± 0,04
GEVO3714, GEVO3715 y GEVO3716 (<i>ald6Δ</i>)	3,2 ± 0,2	42 ± 2	0,14 ± 0,06	0,08 ± 0,01

Los resultados de la fermentación en matraz de agitación durante 72 h para GEVO3466 y las cepas con *ald2Δ*, *ald3Δ*, *ald2Δ*, *ald3Δ*, *ald4Δ*, *ald5Δ* y *hfd1Δ* se resumen en la Tabla 25 y la Tabla 26. Las cepas con eliminaciones en *ALD3*, *ALD2* y *ALD3* juntos o *ALD4* no tuvieron una disminución de la producción de isobutirato en comparación con la cepa de *ALDH* de tipo silvestre GEVO3466. Las cepas con eliminaciones en *ALD2*, *ALD5* o *HFD1* no tuvieron una disminución apreciable en la producción de isobutirato en comparación con la cepa de *ALDH* de tipo silvestre GEVO3466. Las cepas con eliminaciones tanto de *ALD2* como de *ALD3* juntos produjeron un 19 % menos de acetato que la cepa de *ALDH* de tipo silvestre GEVO3466, pero las cepas con eliminaciones individuales de *ALD2*, *ALD3*, *ALD4*, *ALD5* o *HFD1* no tuvieron una disminución apreciable en la producción de acetato en comparación con la cepa de *ALD* de tipo silvestre GEVO3466.

Tabla 25. Resultados de la fermentación en matraz de agitación que demuestran la no disminución de la producción de isobutirato y acetato por la delección de *ALD2*, *ALD3*, *ALD4* o *ALD2* y *ALD3* juntos.

Cepa	Título del isobutanol [g/l]	Rendimiento del isobutanol [% teórico]	Isobutirato producido [g/l]	Acetato producido [g/l]
GEVO3466 (tipo silvestre)	5,1 ± 0,1	42 ± 2	1,24 ± 0,15	0,95 ± 0,07
GEVO3590, GEVO3591 y GEVO3592 (<i>ald2Δ</i>)	5,2 ± 0,2	45 ± 2	1,21 ± 0,06	0,85 ± 0,07
GEVO3593, GEVO3594 y GEVO3595 (<i>ald3Δ</i>)	5,5 ± 0,6	45 ± 6	1,34 ± 0,16	0,91 ± 0,07
GEVO3596, GEVO3597 y GEVO3598 (<i>ald2Δ ald3Δ</i>)	6,8 ± 0,1	51 ± 1	1,41 ± 0,09	0,77 ± 0,08
GEVO3579 (<i>ald4Δ</i>)	5,6 ± 0,7	46 ± 6	1,34 ± 0,13	0,89 ± 0,15

Tabla 26. Resultados de la fermentación en matraz de agitación que demuestran la no disminución de la producción de isobutirato y acetato por la delección de *ALD5* o *HFD1*.

Cepa	Título del isobutanol [g/l]	Rendimiento del isobutanol [% teórico]	Isobutirato producido [g/l]	Acetato producido [g/l]
GEVO3466 (tipo silvestre)	4,0 ± 0,4	44 ± 7	0,47 ± 0,04	0,75 ± 0,05
GEVO3708, GEVO3709 y GEVO3710 (<i>ald5Δ</i>)	3,8 ± 0,8	46 ± 15	0,41 ± 0,04	0,64 ± 0,08
GEVO3720 GEVO3721 y GEVO3722 (<i>hfd1Δ</i>)	4,4 ± 1,0	54 ± 14	0,40 ± 0,07	0,56 ± 0,18

Fermentaciones en fermentadores de sobremesa: Se realizaron fermentaciones en fermentadores de sobremesa para comparar el rendimiento de GEVO3466 (*ALD6*) con GEVO3714 y GEVO3715 (*ald6Δ*). Se midieron el consumo de glucosa, la producción de isobutanol, la producción de isobutirato y la DO₆₀₀ durante la fermentación. Para estas fermentaciones, se transfirieron las cepas purificadas de las placas sembradas en estrías a matraces con tabique deflector de 500 ml que contenían 80 ml de medio YPD que contenía etanol al 1 % v/v, CuSO₄·5H₂O 100 μM y G418 a 0,2 g/l, y se incubaron durante 32 h a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm. Se transfirieron los cultivos en matraz a recipientes individuales de fermentador con motor de accionamiento superior de 2 l con un volumen de trabajo de 0,9 l de medio YPD que contenía glucosa a 80 g/l, etanol al 1 % v/v, CuSO₄·5H₂O 100 μM y G418 a 0,2 g/l por recipiente para una DO₆₀₀ inicial de 0,5. Los fermentadores se operaron a 30 °C y pH 6,0 controlado con KOH 6 N y H₂SO₄ 2 N en una condición aeróbica de 2 fases basada en la tasa de transferencia de oxígeno (OTR). Inicialmente, los fermentadores se operaron a una OTR de fase de crecimiento de 10 mM/h con una agitación fija de 700 rpm y una capa de aire de 5 sl/h. Los cultivos se cultivaron durante 24 h a aproximadamente 9-10 de DO₆₀₀, luego se cambiaron inmediatamente a una OTR de aireación de producción = 2,0 mM/h al reducir la agitación de 700 rpm a 450 rpm durante un período de 24 h a 86,5 h. Periódicamente, se retiraron muestras de cada fermentador para medir la DO₆₀₀ y para preparar el análisis de cromatografía de gases (GC1), para el isobutanol y otros metabolitos, y para el análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (LC1) para los ácidos orgánicos y la glucosa. Se retiraron muestras de 2 ml en un tubo de microcentrífuga y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 min a las rpm máximas. Se sometió un ml del sobrenadante a análisis de GC1 y LC1 como se describe.

La delección de *ALD6* disminuyó la producción de isobutirato y acetato, y aumentó el rendimiento de isobutanol en fermentaciones de fermentador de sobremesa: Los resultados de la fermentación del fermentador de sobremesa de 86,5 h se resumen en la Tabla 27. Las cepas de *ald6Δ* GEVO3714 y GEVO3715 produjeron un 38 % menos de isobutirato que la cepa de *ALD6* GEVO3466. Las cepas de *ald6Δ* GEVO3714 y GEVO3715 también produjeron un 61 % menos de acetato que la cepa de *ALD6* GEVO3466. El rendimiento de isobutanol en las cepas de *ald6Δ* GEVO3714 y GEVO3715 fue un 25 % más alto que la cepa de *ALD6* GEVO3466. El título de isobutanol en las cepas de *ald6Δ* GEVO3714 y GEVO3715 también fue un 35 % más alto que la cepa de *ALD6* GEVO3466.

Tabla 27. Resultados de la fermentación en fermentador de sobremesa que demuestran una disminución de la producción de isobutirato y acetato y un aumento del rendimiento de isobutanol por la delección de *ALD6*.

Cepa	Título del isobutanol [g/l]	Rendimiento del isobutanol [% teórico]	Isobutirato producido [g/l]	Acetato producido [g/l]
GEVO3466 (<i>ALD6</i>)	8,2 ± 0,1	32 ± 1	2,1 ± 0,1	2,3 ± 0,3
GEVO3714 y GEVO3715 (<i>ald6Δ</i>)	11,1 ± 0,1	40 ± 0	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Ejemplo 5: Determinación de la actividad de *ALD6* en *S. cerevisiae*

El siguiente ejemplo ilustra que la actividad de oxidación del isobutiraldehído disminuye significativamente en una cepa de *ald6Δ*.

Tabla 28. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 5.

GEVO n.º	Genotipo	Origen
GEVO3527	<i>MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i>	ATCC n.º 201389 (BY4742)
GEVO3940	<i>MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ ald6Δ::kan^R</i>	OpenBiosystems cat n.º YSC1054 (colección de Yeast MATα)

Se cultivaron cepas de levadura GEVO3940 de las que se eliminó el gen *ALD6* (YPL061W) y su GEVO3527 parental cada una por triplicado inoculando 3 ml de medio YPD en un tubo de cultivo de 14 ml por triplicado para cada cepa. Los cultivos se iniciaron a partir de parches en placa de agar YPD para GEVO3527 y en placas de agar YPD que contenían placas de G418 de 0,2 g/l para GEVO3940. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Al día siguiente, se midió la DO₆₀₀ de los cultivos durante la noche y se calculó el volumen de cada cultivo para inocular un cultivo de 50 ml a una DO₆₀₀ de 0,1. Se usó el volumen calculado de cada cultivo para inocular 50 ml de YPD en un matraz con tabique deflector de 250 ml, y los cultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm. Se recogieron las células durante la fase logarítmica media a DO de 1,6-2,1 tras 7 h de crecimiento. Se transfirieron los cultivos a tubos Falcon de 50 ml previamente pesados y se recogieron las células mediante centrifugación durante 5 minutos a 3000 x g. Tras la eliminación del medio, las células se lavaron con 10 ml de H₂O MilliQ. Tras la eliminación del agua, se centrifugaron las células de nuevo a 3.000 x g durante 5 minutos y se retiró el agua restante cuidadosamente usando una punta de pipeta de 1 ml. Se pesaron los sedimentos celulares y luego se almacenaron a -80 °C hasta que se lisaron y se analizaron para determinar la actividad de oxidación del isobutiraldehído como se describe.

Como se muestra en la Tabla 29, la actividad específica de ALD6 de *S. cerevisiae* en lisados de GEVO3527 para la oxidación de isobutiraldehído 10 mM fue de 13,9 mU/mg. La misma cepa con una delección de *ALD6* tuvo una actividad específica de 0,6 mU/mg, que es 22 veces menor. La actividad específica de ALD6 de *S. cerevisiae* en lisados de GEVO3527 para la oxidación de isobutiraldehído 1,0 mM fue de 17,6 mU/mg. La misma cepa con una delección de *ALD6* tuvo una actividad específica de 2,1 mU/mg, que es 8 veces menor. La actividad específica de ALD6 de *S. cerevisiae* en lisados de GEVO3527 para la oxidación de isobutiraldehído 0,1 mM fue de 6,7 mU/mg. La misma cepa con una delección de *ALD6* tuvo una actividad específica de 1,3 mU/mg, que es 5 veces menor. Estos datos demuestran que la enzima ALD6 endógena es responsable del subproducto de isobutirato de la vía del isobutanol en *S. cerevisiae*.

Tabla 29. Actividades específicas de oxidación del isobutiraldehído de las cepas GEVO3527 y GEVO3940 usando diferentes concentraciones de isobutiraldehído. Las actividades específicas se midieron en lisados de 3 cultivos en paralelo de GEVO3527 y GEVO3940. Se muestran las medias y las desviaciones típicas de las actividades medidas en los cultivos de replicación biológica.

Cepa	Actividad [mU/mg de proteína total] medida con isobutiraldehído		
	Isobutiraldehído 0,1 mM	Isobutiraldehído 1,0 mM	Isobutiraldehído 10 mM
GEVO3527	6,7 ± 0,4	17,6 ± 1,2	13,9 ± 0,4
GEVO3940	1,3 ± 0,2	2,1 ± 0,2	0,6 ± 0,1

Ejemplo 6: Disminución adicional de la producción de isobutirato con la delección del gen *ALD6* y sobreexpresión de una alcohol deshidrogenasa mejorada en *S. cerevisiae*

El siguiente ejemplo ilustra que la combinación de una delección de *ALD6* y la sobreexpresión de una ADH con propiedades cinéticas mejoradas conduce a una disminución adicional en la producción de isobutirato y a un aumento adicional en la producción de isobutanol.

El isobutirato es un subproducto del metabolismo del isobutiraldehído en la levadura y puede comprender una fracción significativa del rendimiento de carbono. Se construyeron las siguientes cepas de levadura: Se construyó GEVO3466 transformando la cepa GEVO3198 con un plásmido de 2 µm, pGV2247, portador de genes codificantes de las siguientes enzimas: KARI, DHAD, KIVD y ADH de tipo silvestre (*Ec_ilvC_coSc*^{P2D1-A1}, *LI_ilvD_coSc*, *LI_kivD2_coEc* y *LI_adhA*, respectivamente). GEVO3198 expresa una copia única de alcohol deshidrogenasa (ADH de *L. lactis*, *LI_adhA*) de su ADN cromosómico. La segunda cepa, cuyas réplicas biológicas se denominan GEVO3714 y GEVO3715, se construyó mediante la transformación de dos cepas independientes, GEVO3711 y GEVO3712, con un plásmido pGV2247 de 2 µm que contenía genes codificantes de las siguientes enzimas: KARI, DHAD, KIVD y ADH de tipo silvestre (*Ec_ilvC_coSc*^{P2D1-A1}, *LI_ilvD_coSc*, *LI_kivD2_coEc* y *LI_adhA*, respectivamente). GEVO3711 y 3712 expresan una única alcohol deshidrogenasa (ADH de *L. lactis*, *LI_adhA*) y tienen el gen *ALD6* eliminado del ADN cromosómico. Una tercera cepa, cuyas réplicas biológicas se denominan GEVO3855 y GEVO3856, se construyó mediante la transformación de una cepa, GEVO3711, con un plásmido pGV2602 de 2 µm que contenía genes codificantes de las siguientes enzimas: KARI, DHAD, KIVD y una ADH mutante (*Ec_ilvC_coSc*^{P2D1-A1-his6}, *LI_ilvD_coSc*, *LI_kivD2_coEc* y *LI_adhA*^{RE1}, respectivamente).

Tabla 30. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 6.

GEVO No.	Genotipo
GEVO3198	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1</i> <i>gpd1Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>gpd2Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdcc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivDkivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcc6Δ::[P_{TEF}:LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3466	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>gpd2Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdcc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivDkivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcc6Δ::[P_{TEF}:LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> Transformado con pGV2247 {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEV03711, GEVO3712	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>gpd2Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdcc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcc6Δ::[P_{TEF}:LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3714, GEVO3715	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>gpd2Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdcc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcc6Δ::[P_{TEF}:LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> <i>ald6Δ::P_{CCW12}:hph</i> Transformado con pGV2247 {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3855, GEVO3856	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>gpd2Δ::[T_{KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> <i>pdcc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD:P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdcc5Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:ILV3ΔN:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdcc6Δ::[P_{TEF}:LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> <i>ald6Δ::P_{CCW12}:hph</i> Transformado con pGV2602 {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

Tabla 31. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 6.

Nombre del plásmido	Genotipo
pGV2247	<i>P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc, P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}, P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc, P_{ENO2}:LI_adhA</i> . 2 μ -ori, pUC-ori, bla, G418R.
pGV2602	<i>P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc, P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1_his6}, P_{PGK1}:LI_kivD2_coEc, P_{ENO2}:LI_adhA^{RE1}</i> . 2 μ -ori, pUC-ori, bla, G418R.

5

Se realizaron dos series diferentes de fermentaciones. La serie de fermentaciones A se realizó para comparar el rendimiento de GEVO3466 (LI_adhA) con GEVO3714-GEVO3715 (LI-adhA, ald6Δ). La serie de fermentaciones B se realizó para comparar el rendimiento de GEVO3714 (LI_adhA, ald6Δ) con GEVO3855-GEVO3856 (LI_adhA^{RE1}, ald6Δ) respectivamente. Se midieron el consumo de glucosa, la producción de isobutanol, la producción de isobutirato y la DO₆₀₀ durante la fermentación. Para estas fermentaciones, se transfirieron colonias de células aisladas individuales

10

cultivadas en placas de agar YPD a matraces con tabique deflector de 500 ml que contenían 80 ml de medio YPD que contenía etanol al 1 % v/v, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 μM y G418 a 0,2 g/l, y se incubaron durante 32 h a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm. Se transfirieron los cultivos en matraz a recipientes individuales de fermentador con motor de accionamiento superior de 2 l con un volumen de trabajo de 0,9 l de medio YPD que contenía glucosa a 80 g/l, etanol al 1 % v/v, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 μM y G418 a 0,2 g/l por recipiente para una DO_{600} inicial de 0,5. Los fermentadores se operaron a 30 °C y pH 6,0 controlado con KOH 6 N en una condición aeróbica de 2 fases basada en la tasa de transferencia de oxígeno (OTR). Inicialmente, los fermentadores se operaron a una OTR de fase de crecimiento de 10 mM/h con una agitación fija de 700 rpm y una capa de aire de 5 sl/h en ambos experimentos. Los cultivos se cultivaron durante 24 h a aproximadamente 9-10 de DO_{600} , luego se cambiaron inmediatamente a las condiciones de aireación de producción durante 48,5 h. En el primer experimento, se mantuvo una OTR de 2,5-3,0 mM/h al reducir la agitación de 700 rpm a 425 rpm, mientras que en el segundo experimento, se mantuvo una OTR de 2,0-2,5 mM/h al reducir la agitación de 700 rpm a 400 rpm. Periódicamente, se retiraron muestras de cada fermentador para medir la DO_{600} y para preparar los análisis de cromatografía de gases (GC1) y cromatografía de líquidos (LC1). Para GC1 y LC1, se retiraron muestras de 2 ml en un tubo Eppendorf y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 min al máximo. Un ml del sobrenadante se analizó mediante GC1 (isobutanol, otros metabolitos) y un ml se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (LC1) para ácidos orgánicos y glucosa.

Los datos de 72,5 h de dos series de fermentaciones separadas A y B se resumen en las Tablas 32 y 33. La serie de fermentaciones A comparaba GEVO3466 (ADH WT) con GEVO3714 y 3715 (ADH WT, *ald6Δ*) mientras que la serie de fermentaciones B comparaba GEVO3714 (ADH WT, *ald6Δ*) con GEVO3855 y 3856 (*LI_adhA^{RE1}*, *ald6Δ*).

Los datos que se refieren a que la serie de fermentaciones A (Tabla 32) muestra que el título de isobutanol y el rendimiento teórico en la cepa portadora de *LI_adhA* con la delección del gen *ALD6* fue 1,4 y 1,3 veces superior, respectivamente, en comparación con la cepa portadora de *LI_adhA* sin la delección del gen *ALD6*. La cepa portadora de *LI_adhA* sin la delección del gen *ALD6* (GEVO3466) tuvo un rendimiento de isobutirato (gramo de isobutirato producido/gramo de glucosa consumido) de 0,040 g/g, mientras que las cepas portadoras de *LI_adhA* con la delección del gen *ALD6* (GEVO3714, GEVO3715) tuvieron un rendimiento de isobutirato inferior, de 0,017 g/g. La cepa portadora de *adhA* de *L. lactis* sin la delección del gen *ALD6* produjo 2,3 g/l de acetato, mientras que la cepa portadora de la *adhA* de *L. lactis* con la delección del gen *ALD6* produjo 0,6 g/l de acetato.

Tabla 32. Datos de la serie de fermentaciones A.

Cepa	DO_{600}	Isobutanol producido [g/l]	Isobutirato producido [g/l]	Rendimiento del isobutanol [% teórico]	Rendimiento del isobutirato [g/g]	Acetato producido [g/l]
GEVO3466 (ADH WT)	9,7 ± 0,1	7,4 ± 0,6	1,7 ± 0,0	48,1 ± 2,6	0,040 ± 0,004	2,3 ± 0,1
GEVO3714, GEVO3715 (ADH WT, <i>ALD6Δ</i>)	10,0 ± 0,7	10,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	55,3 ± 0,6	0,017 ± 0,003	0,6 ± 0,1

Los datos que se refieren al serie de fermentaciones B (Tabla 33) muestran que el título de isobutanol y el rendimiento teórico en la cepa portadora de *adhA^{RE1}* de *L. lactis* con la delección del gen *ALD6* fue 1,2 y 1,1 veces superior, respectivamente, en comparación con la cepa portadora de *adhA* de *L. lactis* con la delección del gen *ALD6*. Las cepas portadoras de *adhA^{RE1}* de *L. lactis* con la delección del gen *ALD6* (GEVO3855, GEVO3856) tuvieron el rendimiento de isobutirato más bajo (gramo de isobutirato producido/gramo de glucosa consumido), 0,005 g/g, y produjeron 0,0 g/l de acetato en comparación con la cepa portadora de *adhA* de *L. lactis* con delección del gen *ALD6* (GEVO3714), que tuvo un mayor rendimiento de isobutirato, de 0,014 g/g, y un título de acetato similar de 0,0 g/l (Tabla 33).

Tabla 33. Datos de la serie de fermentaciones B.

Cepa	DO_{600}	Isobutanol producido [g/l]	Isobutirato producido [g/l]	Rendimiento del isobutanol [% teórico]	Rendimiento del isobutirato [g/g]	Acetato producido [g/l]
GEVO3714, (ADH WT, <i>ALD6Δ</i>)	9,7 ± 0,2	10,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	46,5 ± 1,6	0,014 ± 0,000	0,0 ± 0,0
GEVO3855, GEVO3856 (<i>LI_adhA^{RE1}</i> , <i>ALD6Δ</i>)	9,9 ± 0,3	12,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	51,5 ± 0,8	0,005 ± 0,000	0,0 ± 0,0

Ejemplo 7: Identificación de DH2MB como un subproducto de la fermentación con isobutanol

Durante la fermentación de cepas de levadura productoras de isobutanol, se encontró que un máximo desconocido, que se eluyó conjuntamente con 2,3-dihidroxi isovalerato (DHIV) en el método LC1, y cuantificado basándose en ello, estaba actuando como un sumidero para una porción sustancial del carbono que se estaba usando.

5 Inicialmente, se creía que este máximo era únicamente 2,3-dihidroxiisovalerato (DHIV), pero estudios posteriores indicaron que se habría producido la inhibición del producto KARI a estos niveles de DHIV, haciendo dichas concentraciones imposibles. Experimentos adicionales mostraron que este máximo recuperado no fue reactivo con DHAD en ensayos enzimáticos, eliminando así la posibilidad de que hubiera cantidades significativas de DHIV presentes.

10 Cromatografía líquida de alto rendimiento LC1: El análisis de los metabolitos de ácidos orgánicos se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent-1200 dotado de dos columnas Rezex RFQ-Fast Fruit H + (8 %) 150 x 4,6 mM (Phenomenex) en serie. Los metabolitos de ácidos orgánicos se detectaron usando un detector de UV Agilent-1100 (210 nm) y un detector de índice de refracción (RI). La temperatura de la columna fue de 60 °C. Este método fue isocrático con H₂SO₄ 0,0128 N (H₂SO₄ 0,0512 N al 25 % en agua Milli-Q) como fase móvil. El flujo se ajustó a 1,1 ml/min. El volumen de inyección fue de 20 µl y el tiempo de ejecución fue de 16 min.

20 Cromatografía líquida de alto rendimiento LC3: Para muestras que contenían un máximo de 10 mM de aldehídos, cetonas y compuestos intermedios de cetoácido (combinados), se añadió reactivo DNPH a cada muestra en una proporción de 1:1. Se añadieron 100 µl de reactivo DNPH (2,4-Dinitrofenil hidrazina 12 mM, ácido cítrico 20 mM a pH 3,0 acetonitrilo al 80 %, H₂O MilliQ al 20 %) a 100 µl de cada muestra. Se incubaron las muestras durante 30 min a 70 °C en un termociclador (Eppendorf, Mastercycler). Se realizó el análisis de la acetoina, diacetilo, cetoisovalerato e isobutiraldehído en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent-1200 dotado de Eclipse XDB C-18 150 x 4 mm; columna de fase inversa de tamaño de partícula de 5 µm (Agilent) y una columna de protección de fase inversa C-18 (Phenomenex). Todos los analitos se detectaron usando un detector de UV Agilent-1100 (360 nm). La temperatura de la columna fue de 50 °C. Este método fue isocrático con acetonitrilo al 60 % y ácido fosfórico al 2,5 % (0,4 %), agua al 37,5 % como fase móvil. El flujo se ajustó a 2 ml/min. El tamaño de inyección fue de 10 µl y el tiempo de ejecución fue de 10 min.

30 Cromatografía líquida de alto rendimiento LC4: El análisis de los oxoácidos se realizó en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent-1100 dotado de un analizador IonPac AS11-HC, precolumna de protección IonPac AG11-HC (3-4 mM para la columna IonPac ATC, Dionex) o equivalente y una columna de trampa de aniones IonPac ATC-1 o equivalente. Los oxoácidos se detectaron usando un detector de conductividad (conductividad suprimida por la DE₅₀, Tipo de supresor: ASRS 4 mM en modo de reciclaje AutoSuppression, Supresor de corriente: 300 mA). La temperatura de la columna fue de 35 °C. Este método usó el siguiente perfil de elución: Mantenimiento a 0,25 mM durante 3 min; gradiente lineal a 5 mM a 25 min; gradiente lineal a 38,5 mM a 25,1 min, mantenimiento a 38,5 mM durante 4,9 min; gradiente lineal a 0,25 mM a 30,1 min; mantenimiento durante 7 minutos para equilibrar. El flujo se ajustó a 2 ml/min. El tamaño de inyección es de 5 µl y el tiempo de ejecución es de 37,1 min.

40 GC-MS: Sistema de GC Varian 3800CP dotado de un solo quad 320MS; Columna DB-5ms; puerto de inyección 1079 a 250 °C; flujo constante de 1,0 ml/min a relación de división de 100; perfil del horno: temperatura inicial, 40 °C, mantenimiento durante 5 min, rampa de 20 °C/min hasta 235 °C y mantenimiento durante 2 minutos; automuestreador combiPAL que suministra 0,5 µl de muestra; masas recogidas de 35 a 100. Derivación BSTFA: (1) Se evapora la muestra a sequedad bajo nitrógeno en un vial de GC; (2) se añaden 0,5 ml de acetonitrilo y 0,5 ml de reactivo BSTFA; (3) se incuba a 50 °C durante 30 minutos; (4) se inyecta en GC-MS.

50 LC-MS: Para el análisis de LC-MS de la fracción máxima de LC1, se inyectó la muestra en un sistema de cromatografía líquida (HPLC) de alto rendimiento de la Serie 1100 de Agilent que estaba dotado de un detector de longitud de onda múltiple y un espectrómetro de masas LC/MSD Trap (trampa de iones). Las separaciones se controlaron mediante espectrometría de masas para proporcionar la identificación del componente en la muestra. El espectrómetro de masas funcionó en el modo de ionización química a presión atmosférica (APCI) para la inyección de muestras. Los análisis se realizaron usando los modos APCI positivo y negativo. La detección del "desconocido" solo se observó en el modo de ionización negativa. El análisis se realizó usando MSn para obtener datos de fragmentación en el analito de la muestra. Las separaciones se realizaron usando una columna Agilent Zorbax SB C-18 de 4,6 x 150 mM con partículas de 5 µm. La muestra se realizó usando un método isocrático que usó un eluyente de agua de HPLC al 90 % y metanol al 10 %. Se usó una inyección de 10 µl para el análisis de la solución de muestra. La muestra también se analizó sin pasar por la columna cromatográfica.

60 DHIV y su isómero, DH2MB, se eluyen en el mismo tiempo de retención en la LC1. El máximo relacionado con estos compuestos se separa de otros compuestos en las muestras de fermentación. El máximo se recogió de la HPLC y se usó para un análisis adicional.

65 La relación de señal entre la señal del detector de RI y la señal del detector de UV observada en LC1 para DHIV (y DH2MB) es característica de los ácidos orgánicos comunes (por ejemplo, lactato, acetato, etc.); los ácidos conjugados (por ejemplo, piruvato) tienen relaciones de señal RI/UV muy diferentes. El "máximo de DHIV" recuperado tenía las características de un ácido no conjugado:

Relación (RI/UV): Máximo recuperado de DHIV/DH2MB (130); DHIV Std (150); Piruvato (14).

La falta de una fracción de carbonilo en el "máximo misterioso" se confirmó por la falta completa de reacción entre la fracción de máximo recuperada de LC1 y DNPH: no se observaron máximos de aductos en el sistema cromatográfico LC3.

La fracción de máximo recuperada de LC1 se analizó luego mediante el método LC4, que se ejecuta en condiciones alcalinas, y es capaz de separar DHIV y acetolactato. Ese resultado se muestra en la Figura 9, junto con una superposición de mezclas patrón. Esto muestra claramente la separación entre DH2MB (como se identificó posteriormente) y DHIV. También se trajo algo de piruvato en la recogida del máximo de DH2MB.

Análisis de RMN: El máximo de muestra recuperado del método LC1 se neutralizó y se liofilizó, y se envió para el análisis de RMN. El análisis de conectividad 2-D mediante RMN de ¹H-COSY (Figura 10) y el espectro de RMN de protones (Figura 11) dieron buenos resultados.

Análisis 2-D del "máximo misterioso" eluyendo con DHIV (Figura 10): Un grupo metilo, desplazado campo abajo, no está dividido por ningún protón adyacente, donde el grupo metilo a 0,95 ppm es dividido en un doblete por un protón adyacente a un hidroxilo. Ese protón, a su vez, es dividido en un cuarteto por el grupo metilo adyacente. Los patrones complejos entre 3,1 y 3,7 ppm indican los diferentes anómeros de glucosa transportados durante la recogida de máximos de "DHIV".

Las asignaciones de los máximos de RMN se muestran en el espectro a continuación (Figura 11), lo que indica claramente que la identidad del "máximo misterioso" es 2,3-dihidroxi-2-butarato (DH2MB).

Los espectros de RMN de ¹H y COSY apoyan la presencia de ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico, un isómero estructural del ácido dihidroxiisovalérico. Otras señales en estos espectros apoyan la presencia de proteínas anoméricas y, por lo tanto, un componente de azúcar. Además, los grupos complejos de señales entre 3,1-3,8 ppm se observan a menudo con oligosacáridos. El espectro de RMN de ¹³C es muy débil y parece ser un experimento de prueba de protones (APT) adjunto basado en la señal a 45 ppm que se encuentra por debajo de la línea basal.

La LC-MS también se llevó a cabo en la fracción de máximo de LC1. La LC-MS fue suficiente para demostrar que el compuesto tenía una masa de 134 (DHIV y DH2MB) (Figura 12).

Este análisis identificó de manera concluyente el producto secundario desconocido como el ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (CAS n.º 14868-24-7). Este compuesto existe en 4 formas estereoisoméricas diferentes. El ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico existe como un conjunto de diastereoisómeros *cis* y *trans*, cada uno de los cuales existe como un conjunto de enantiómeros. Los cuatro compuestos se muestran en la Figura 13.

Como se describe en el presente documento, DH2MB se deriva de (2S)-2-hidroxi-2-metil-3-oxobutarato (acetolactato). El producto de esta reacción sería ácido (2S,3R)-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico, ácido (2S,3S)-2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico o una mezcla de los dos diastereómeros según la estereoselectividad de la/s enzima/s endógena/s que cataliza/n esta conversión.

Ejemplo 8: Producción y purificación de DH2MB

El fin de este ejemplo es ilustrar cómo DH2MB se produjo y se purificó.

Se usó una cepa CEN.PK2 de *S. cerevisiae* modificada por ingeniería genética que comprendía actividad de ALS (GEVO3160, CEN.PK2 de *S. cerevisiae*: *MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::P_{CCW12}: HPh gpd2Δ::TKL_URA3_corto: P_{Fba1}: KI_URA3: TKL_ura3 pdc1APcupp Bs_alsS_coSc: TCYC1: PGK1: LI_kivD: P_{ENO2 Sp} HIS5 pdc5Δ::LEU2: bla: P_{TEF1}: ILV3AN: P_{Tdh3}: ilvC_coSc_Q110V pdc6Δ::P_{TEF1}: LL_ilvD_P_{TDH3}: Ec_ilvC_coSc_P2D1-A1: P_{ENO2}: LI_adhA: P_{FBA1}: Sc_TRP1* {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido} que expresaba el plásmido pGV2247 (2 micrómetros, plásmido resistente a G418 para la expresión de Ec_ilvC_P2D1-A1, *LI_ilvD*, *LI_kivD2* y *LI_adhA*) para producir DH2MB a aproximadamente 10 g/l en una fermentación por lotes usando recipientes DasGip con motor de accionamiento superior de 2 l llenos de medio de cultivo de 1 l (extracto de levadura a 10 g/l, peptona a 20 g/l, glucosa a 80 g/l, etanol al 1 % v/v, CuSO₄·5H₂O 100 μM, G418 a 0,2 g/l) a 30 °C, pH 6,0 y una OTR de aproximadamente 10 mmol/h.

El caldo de fermentación libre de células se acidificó a pH 2 usando H₂SO₄ concentrado. El caldo acidificado se concentró a 350 ml a presión reducida (0-10 kPa [0-100 mbar]) usando Rotovapor R-215 de Buchi. El matraz que contenía caldo se calentó en el baño de agua a 20-30 °C durante la evaporación. Se añadió un volumen de 70 ml de MeOH al caldo concentrado y la mezcla se transfirió a un extractor líquido-líquido de 500 ml (Sigma-Aldrich, cat. n.º Z562432), que se configuró de acuerdo con las especificaciones del fabricante para la extracción continua con acetato de etilo (EtOAc). La extracción continua se llevó a cabo durante 3 días reemplazando el extracto de EtOAc diariamente con EtOAc nuevo.

Tras la extracción, se combinaron los dos primeros lotes de extracto de DH2MB en EtOAc y se secaron con MgSO₄ anhidro seguido de filtración. El extracto seco se concentró al vacío hasta 500 ml y se trató con 3 g de carbón activado (Fluka cat n.º 05105) durante 30 minutos agitando a temperatura ambiente. La solución decolorada se filtró y se concentró hasta aproximadamente 50 ml al vacío (0-10 kPa [0-100 mbar] usando el Rotovapor R-215 de Büchi). La solución se incubó a 4 °C durante dos días. Los cristales obtenidos se filtraron y se lavaron con dietiléter y acetona enfriados con hielo. Los cristales se secaron usando un liofilizador a presión reducida (0,005 kPa [0,05 mbar]) durante un día.

El DH2MB aislado se analizó mediante RMN de ¹H (Figura 14) y de ¹³C (Figura 15). RMN de ¹H (TSP) 1,1 (d, 6,5 Hz, 3H), 1,3 (s, 3H), 3,9 (c, 6,5 Hz, 3H). Un espectro de ¹³C indicó cinco átomos de carbono diferentes presentes en la muestra. La resonancia a 181 ppm indicó el átomo de carbono de ácido carboxílico presente en la muestra. En conclusión, basándose en los espectros de RMN se podría estimar una pureza del 99 % del DH2MB aislado.

Ejemplo 9: Impacto de la producción de DH2MB en el rendimiento del isobutanol en la fermentación

El fin de este ejemplo es demostrar que DH2MB se acumula a niveles sustanciales en cepas de levadura que comprenden actividad de ALS y TMA29.

Las cepas y los plásmidos desvelados en este ejemplo se muestran en las Tablas 34 y 35, respectivamente.

Tabla 34. Genotipo de la cepa GEVO3160 de *S. cerevisiae*.

Cepa	Genotipo
GEVO3160	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ :: [P_{CCW12}: hph] gpd2Δ :: [T_{KI_URA3_corto}: P_{FBA1}: KI_URA3: T_{KI_URA3}] pdc1Δ :: [P_{CUP1}: Bs_alsS_coSc: T_{CYC1}: P_{PGK1}: LI_kivD: P_{ENO2}: Sp_HIS5] pdc5Δ :: [LEU2: bla: P_{TEF}: -ILV3Δ N: P_{TDH3}: Ec_ilvC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ :: [P_{TEF1}: LI_ilvD_P_{TDH3}: Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}: P_{ENO2}: LI_adhA: P_{FBA1}: Sc_TRP1] {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido} pGV2247</i>

Tabla 35. Genotipo del plásmido pGV2247.

Plásmido	Genotipo
pGV2247	<i>P_{Sc_TEF1}: LI_ilvD_coSc, P_{Sc_TDH3}: Ec_ilvC_coSc^{P2D-A1}, P_{Sc_TPI1}: G418R, P_{Sc_PGK1}: LI_kivD_coEc, P_{Sc_ENO2}: LI_adhA, 2m, APr, PMB1</i>

La cepa GEVO3160 de *S. cerevisiae* se transformó con pGV2247 como se describe. Se realizó una fermentación para caracterizar la cepa transformada. Se transfirieron 5 ml de medio YPD que contenía glucosa a 80 g/l a una colonia de células aisladas individuales desarrollada en una placa de agar YPD que contenía G418 a 0,2 g/l, etanol al 1 % v/v, CuSO₄·5H₂O 100 μM y G418 de 0,2 g/l, y se incubaron durante 24 h a 30 °C, 250 rpm. A continuación, se transfirió este cultivo a 500 ml de matraces con tabique deflector que contenían 80 ml del mismo medio, y se incubó durante 24 h a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm. Se transfirió el cultivo en matraz a un recipiente de fermentador con motor de accionamiento superior de 2 l con un volumen de trabajo de 0,9 l del mismo medio para una DO₆₀₀ de partida de 0,5. El fermentador se operó a 30 °C y pH 6,0 controlado con KOH 6 N en una condición aeróbica de 2 fases basada en la tasa de transferencia de oxígeno (OTR). Inicialmente, el fermentador se operó a una OTR de fase de crecimiento de 10 mM/h con una agitación fija de 700 rpm y una capa de aire de 5 sl/h en ambos experimentos. Los cultivos se cultivaron durante aproximadamente 20 h a una DO₆₀₀ de aproximadamente 8, y luego se cambiaron inmediatamente a la aireación de la producción. Se mantuvo una OTR de 1 mM/h al reducir la agitación de 700 rpm a 350 rpm. Tras 93 h tras la inoculación, un recipiente replicado de cada cepa se redujo aún más a una OTR = 0,3 mM/h al disminuir la agitación de 350 rpm a 180 rpm. Periódicamente, se retiraron muestras de cada fermentador para medir la DO₆₀₀ y para preparar los análisis de cromatografía de gases (GC1) y cromatografía de líquidos (LC1). Para las GC1 y LC1, se retiraron muestras de 2 ml en un tubo Eppendorf y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 min al máximo. Un ml del sobrenadante se analizó mediante GC1 (isobutanol, otros metabolitos) y un ml se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (LC1) para ácidos orgánicos y glucosa.

La Figura 16 muestra los perfiles de productos y subproductos de GEVO3160 de *S. cerevisiae* transformada con pGV2247. Estos perfiles son representativos de las cepas de levadura Pdc⁻ y Gpd⁻ productoras de isobutanol. Las cepas de producción de levadura Pdc⁻/Gpd⁻ se describen en las publicaciones del mismo solicitante en trámite junto con la presente US 2009/0226991 y US 2011/0020889, ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines. La Figura 16 muestra que el isobutanol (13,9 g/l) y el compuesto desconocido cuantificado como "DHIV" y ahora identificado como DH2MB (8,4 g/l) son los productos primarios producidos durante la OTR de producción microaeróbica. Suponiendo que la cuantificación usando el factor de respuesta de DHIV conduce a una cuantificación precisa de DH2MB, aproximadamente el 12-13 % del carbono consumido se desvía a la producción de DH2MB. Si el acetolactato que se convierte en DH2MB se convirtiera, en

cambio, en isobutanol, el rendimiento del isobutanol durante todo el tiempo de la fermentación que se muestra en la Figura 16 sería significativamente superior.

Ejemplo 10: La expresión de ALS es necesaria para la producción de DH2MB

El fin de este ejemplo es demostrar que la actividad de ALS expresada exógenamente es necesaria para la acumulación de DH2MB en *S. cerevisiae*.

Este experimento se realizó para determinar si se requiere ALS para la producción de DH2MB. Las cepas usadas en este experimento fueron GEVO1187 (CEN.PK2 de *S. cerevisiae*; MATa *ura3-52 leu2-3_112 his3Δ1 trp1-289 ADE2*) y GEVO2280 (CEN.PK2 de *S. cerevisiae*; MATa *ura3 leu2 his3 trp1 ADE2 pdc1Δ::P_{CUP1_1}:Bs_alsS2:TRP1*). Antes de las fermentaciones, ambas cepas se transformaron con el plásmido pGV2082 de 2 micrómetros (*P_{TDH3}:Ec_ilvC^{Q110V}*, *P_{TEF1}:LI_ilvD_coSc*, *P_{PGK1}:LI_kivD_coEc* y *P_{ENO2}:Dm_ADH*, 2 μ ori, bla, G418R) como se describe.

Para medir la actividad de ALS, se prepararon extractos de células de levadura de GEVO1187 y GEVO2280. Las células se cultivaron hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 1, se indujeron con CuSO₄ 1 mM durante 2 horas y luego recogieron. Para preparar las células para los ensayos, se recogieron 50 ml de células mediante centrifugación a 2.700 x g. Tras la retirada de los medios, se volvieron a suspender las células en dH₂O estéril, se centrifugaron a 2.700 xg y el medio restante se retiró cuidadosamente con una punta de pipeta de 1 ml. Se pesaron los sedimentos celulares (los tubos vacíos se pesaron previamente) y luego se congelaron a -80 °C hasta su uso. Los lisados celulares se prepararon usando el siguiente SOP como se describe a continuación. Se descongelaron células en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (KPO₄ 250 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM), de modo que el resultado fue una suspensión celular al 20 % en masa. Se añadió un volumen de 1.000 μ l de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 875 μ l de suspensión celular. Se lisaron células de levadura usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA) mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a velocidad completa con etapas de formación de hielo de 1 min entre ellas. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 23.500 xg a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Los extractos se mantuvieron en hielo hasta su ensayo. La concentración de proteína de lisado se determinó usando el kit de reactivos de ensayo de proteína BioRad Bradford (Cat n.º 500-0006, BioRad Laboratories, Hercules, CA) y usando BSA para la curva patrón como se ha descrito. En resumen, todos los ensayos de ALS se realizaron por triplicado para cada lisado, tanto con como sin sustrato. Para ensayar cada lisado, se mezclaron 100 μ l de lisado diluidos 1:2 con tampón de lisis con 900 μ l de tampón (tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 6,0, MgSO₄ 1 mM, tiamina pirofosfato 1 mM, piruvato 110 mM) y se incubaron durante 15 minutos a 30 °C. Se prepararon tampones a temperatura ambiente. También se incluyó un control sin sustrato (tampón sin piruvato) y un control sin lisado (tampón de lisis en lugar de lisado). Tras la incubación, se mezclaron 175 μ l de cada reacción con 25 μ l de H₂SO₄ al 35 % y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Las muestras se enviaron a análisis para su análisis por LC1. Usando este método, se determinó que la cepa GEVO1187 de tipo silvestre no tenía actividad de ALS detectable mientras que la cepa GEVO2280 que expresaba ALS tenía 0,65 unidades/mg de actividad de ALS lisada.

Se comparó el rendimiento de las dos cepas (con o sin la construcción de expresión integrado heteróloga de ALS) usando las siguientes condiciones de fermentación en matraz de agitación. Las cepas se parchearon en placas de YPD que contenían G418 a 0,2 mg/ml. Después del crecimiento durante la noche, se retiraron las células de la placa con un palillo estéril y se volvieron a suspender en 4 ml de YPD con G418 a 0,2 g/l. Se determinó la DO₆₀₀ para cada cultivo. Las células se añadieron a 50 ml de YP con dextrosa a 50 g/l y G418 a 0,2 mg/ml, de modo que se obtuvo una DO₆₀₀ final de 0,1. Para inducir el promotor CUP1 que conduce a la expresión de ALS, se añadió sulfato de cobre 1 mM en el punto de tiempo de 24 horas. Los medios no usados se almacenaron a 4 °C para actuar como medio en blanco para la GC y LC, y para actuar como la muestra t = 0 para la fermentación. A t = 24, 48 y 72 horas, las muestras se prepararon para el análisis mediante GC1, y a las 72 horas, las muestras se analizaron además mediante LC1. A las 24 y 48 horas, se analizó una dilución de 1:10 del sobrenadante de cada cultivo mediante YSI. Cuando fue necesario, se añadió glucosa al 50 % que contenía G418 a 0,2 g/l a una concentración final de 100 g/l de glucosa. Las fermentaciones se realizaron a 30 °C con agitación a 250 rpm.

El título de DH2MB alcanzado a las 72 horas de una fermentación en matraz de agitación se determinó usando el método LC1 tanto para la cepa WT (BUD1187) sin ALS como para la cepa que expresaba *P_{CUP1}:Bs_alsS2* en *PDC1* (BUD2280). Cada cepa se transformó con el plásmido pGV2082 de 4 componentes. La fermentación se realizó como se describe. Sin expresión exógena de ALS, la cepa no produjo DH2MB, mientras que la cepa con la expresión de ALS produjo DH2MB a hasta 1,4 g/l más DHIV.

Ejemplo 11: Solo es necesaria la expresión de ALS para la producción de DH2MB

El fin de este ejemplo es demostrar que la actividad de ALS sola es responsable de la acumulación de DH2MB en *S. cerevisiae*.

Este experimento se realizó para determinar si la ALS sola o en combinación con un plásmido que expresa KARI, DHAD, KIVD, ADH es responsable de la producción de DH2MB. La cepa usada en este experimento fue GEVO2618

(MATa *ura3leu2his3 trp1 pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsSI_coSc: TRP1]*). Los plásmidos analizados en este experimento fueron pGV2227, que contenía los cuatro genes restantes de la vía (-P_{TEF1}:U_ilmD_coSc: P_{TDH3}:Ec_ilmC_coSc^{Q110V}:P_{Sc TPI1}: G418: P_{PGK1}: LI_kivD2_coEc:PDC1 -región 3': P_{ENO2}: LI_adhA bla de 2 μm, pUC-ori) y pGV2020, el control del vector vacío (P_{Sc_TEF1}, P_{Sc_TPI1}, G418R, AP_r, 2 μm).

Se iniciaron cultivos en matraz de agitación de GEVO2618 transformada con pGV2020 y GEVO2618 transformada con pGV2227 en YPD (glucosa al 15 %) que contenía MES 200 mM a pH 6,5 y G418 a 0,4 g/l a una DO₆₀₀ ~0,1, y se realizaron a 30 °C y 75 rpm en una incubadora de agitación. Se tomaron muestras a las 24 h y 48 h, y las muestras se analizaron para determinar los niveles de metabolitos mediante HPLC (LC1) y GC (GC1). Tras 48 horas, ambas cepas consumieron toda la glucosa del medio. La cepa que contenía el vector vacío (GEVO2618 + pGV2020) produjo 4,6 g/l de DHIV + DH2MB, que representa un rendimiento de 3,8 %. La cepa que contenía el vector que expresa cuatro genes adicionales de la vía (GEVO2618 + pGV2227), produjo un título similar de 5,6 g/l de DHIV + DH2MB, que representa un rendimiento del 3,1 %.

15 Ejemplo 12: Efecto del aumento de la actividad KARI en la producción de DH2MB

El fin de este ejemplo es demostrar que el aumento de la actividad KARI produce una disminución de la producción de DH2MB en levaduras que comprenden actividad de ALS.

20 Las cepas y los plásmidos desvelados en este ejemplo se muestran en las Tablas 36 y 37, respectivamente.

Tabla 36. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 12.

Cepa	Genotipo
GEVO2843	<i>S. cerevisiae</i> , MATa <i>ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsSI_coSc:T_{CYC1}: P_{PGK1}: LI_kivD2: P_{ENO2}: Sp_HIS5] pdc5Δ::[LEU2: bla: P_{TEF1}: ILV3ΔN: P_{TDH3}: Ec_ilmC_coSc^{Q110V}] pdc6Δ::[URA3: bla: P_{TEF1}: LI_kivD2: P_{TDH3}: Dm_ADH]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

Tabla 37. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 12.

Plásmido	Genotipo
pGV2196	CEN, ARS, <i>hph</i> , <i>bla</i> , pUC-ori.
pGV2377	P _{TEF1} : LI_ilmD_coSc, P _{ScPGK1} : LI_kivD_coEc, P _{ScENO2} : LI_adhA, 2 μ ori, pUC ori, <i>bla</i> , G418R
pGV2466	P _{TEF1} : LI_ilmD_coSc, P _{ScTDH3} : Ec_ilmC_coSc ^{his6} , P _{ScPGK1} : LI_kivD_coEc, P _{ScENO2} : LI_adhA, 2 μ ori, pUC ori, <i>bla</i> , G418R
pGV2398	P _{TEF1} LI_ilmD_coSc, P _{scTDH3} -Ec_ilmC_coSc ^{Q110V-his6} Psopgkv LI_kivD_coEc, P _{ScENO2} : LI_adhA, 2 μ ori, pUC ori, <i>bla</i> , G418R
pGV2400	P _{TEF1} LI_ilmD_coSc, P _{scTDH3} -Ec_ilmC_coSc ^{P2D1-A1-his6} , Psopgkv LI_kivD_coEc, P _{ScENO2} : LI_adhA, 2 μ ori, pUC ori, <i>bla</i> , G418R
pGV2406	P _{Sc TEF1} : Ec_ilmC_coSc ^{Q110V-his6} , CEN, ARS, <i>hph</i> , <i>bla</i> , pUC ori.

25 La cepa GEVO2843 de *S. cerevisiae* se transformó con plásmidos de 2 μm pGV2377, pGV2466, pGV2398, y pGV2400 como se describe para determinar si la expresión de KARI de tipo silvestre o modificada por ingeniería genética condujo a una mayor acumulación de DH2MB.

30 Se iniciaron precultivos de GEVO2843 transformados con los plásmidos de 2 μm (pGV2377, 2466, 2398, 2400) en YPD que contenía etanol al 1 % y G418 a 0,2 g/l, y se incubaron durante una noche a 30 °C y 250 rpm. Estos precultivos se usaron para inocular 50 ml del mismo medio en un matraz con tabique deflector, y se incubaron a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de ~5. Se sedimentaron en tubos Falcon de 50 ml a 2700 rcf durante 5 minutos a 25 °C. A continuación, las células de cada cultivo de 50 ml se volvieron a suspender en 50 ml de YPD que contenía glucosa al 8 %, etanol al 1 % (v/v), ergosterol, Tween-80, G418 a 0,2 g/l y MES 200 mM, pH 6,5. Se añadieron los cultivos a matraces sin tabique reflector de 250 ml y se colocaron en una incubadora a 30 °C y 75 rpm. Se tomaron muestras tras 72 h para determinar la DO₆₀₀ y analizar el caldo de fermentación para determinar los metabolitos extracelulares mediante análisis GC1 y LC1.

40 La Tabla 38 muestra que la cepa transformada con pGV2377 (sin la sobreexpresión de ningún gen de KARI del plásmido) produjo el rendimiento de carbono más alto, del 15 % para DH2MB + DHIV combinados, mientras que las cepas con pGV2466 (que contenía Ec_ilmC_COsc^{his6}), pGV2398 (que contenía Ec_ilmC_coSc^{Q110V-his6}) y pGV2400 (que contenía Ec_ilmC_coSc^{P2D1-A1-his6}) tuvieron rendimientos de carbono de DH2MB + DHIV combinados similares,

del 8-10 %. Análogamente, la cepa transformada con pGV2377 produjo isobutanol con el rendimiento de carbono más bajo, del 6 %. Las cepas restantes que comprenden genes KARI en un plásmido produjeron isobutanol con mayores rendimientos de carbono. La observación de que la menor producción de DH2MB se correlaciona con una mayor producción de isobutanol coincide con el hallazgo de que DH2MB se produce a partir de acetolactato a través de una reacción que no implica a KARI.

Tabla 38. Rendimientos de carbono del isobutanol y de DH2MB + DHIV combinados

Cepa	Plásmido	KARI	Rendimiento de carbono del isobutanol [%]	Rendimiento de carbono de DH2MB+DHIV [%]
GEVO2843	pGV2377	n/a	6	15
GEVO2843	pGV2466	Ec_ilvC_coSc ^{his6}	18	8
GEVO2843	pGV2398	Ec_ilvC_coSc ^{Q11^V-his6}	15	8
GEVO2843	pGV2400	Ec_ilvC_coSc ^{P2D1-A1-his6}	18	10

Se realizó un segundo experimento en el que las cepas expresaron bien nada de KARI a partir de un plásmido, un nivel bajo de KARI o un nivel alto de KARI. En este experimento, se midió la actividad de KARI de los lisados celulares.

La cepa GEVO2843 de *S. cerevisiae* se transformó como se describe con combinaciones de plásmidos según lo descrito en la Tabla 37; la cepa sin KARI contenía pGV2377 + pGV2196 y no tenía KARI transmitido por plásmidos, la cepa de bajo nivel de KARI contenía pGV2377 + pGV2406 y expresaba KARI a partir de un plásmido de baja copia, y la cepa de alto nivel de KARI contenía pGV2398 + pGV2196 y expresaba KARI a partir de un plásmido de alta copia. Las fermentaciones y el muestreo se realizaron según lo descrito. Los métodos de GC1 y LC1 se realizaron como se describe. Las células para los ensayos de KARI se lisaron como se describe, excepto que el tampón de lisis era KPO₄ 250 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM y DTT 1 mM. La concentración de proteína de los lisados se determinó como se describe.

Para medir la actividad de KARI *in vitro*, se preparó sustrato de acetolactato mezclando 50 µl de etil-2-acetoxi-2-metil-acetoacetato con 990 µl de agua. A continuación, se añadieron secuencialmente 10 µl de NaOH 2 N, mezclando con formación de vórtice entre las adiciones durante 15 s, hasta que se añadieron 260 µl de NaOH. El acetolactato se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos y se mantuvo en hielo. Se preparó NADPH en NaOH 0,01 N hasta una concentración de 50 mM. La concentración se determinó leyendo la DO de una muestra diluida a 340 nm en un espectrofotómetro y usando el coeficiente de extinción molar de 6,22 M⁻¹ cm⁻¹ para calcular la concentración exacta. Se prepararon tres tampones y se mantuvieron en hielo. El tampón de reacción contenía KPO₄ 250 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, acetolactato 10 mM y NADPH 0,2 mM. A ningún tampón de sustrato, le faltó el acetolactato. A ningún tampón de NADPH, le faltó la NADPH. Las reacciones se realizaron por triplicado utilizando 10 µl de extracto celular con 90 µl de tampón de reacción en una placa de 96 pocillos en un lector multiplaca SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La reacción se siguió a 340 nm midiendo una curva cinética durante 5 minutos, con lecturas de DO cada 10 segundos a 30 °C. Se determinó la V_{máx} para cada extracto después de restar la lectura de fondo del control sin sustrato de la lectura en un tampón completo.

La Tabla 39 muestra los datos de la actividad de KARI, así como el rendimiento de carbono en % para el isobutanol y DH2MB + DHIV combinados. A medida que aumentaba la actividad de KARI, aumentaba el rendimiento de carbono del isobutanol y disminuía el rendimiento de carbono de DH2MB + DHIV combinados.

Tabla 39. Actividad de KARI, Rendimientos de carbono del isobutanol y de DH2MB + DHIV combinados.

Cepa	Plásmido	Actividad de KARI µmol/min/mg	Rendimiento de carbono del isobutanol [%]	Rendimiento de carbono de DH2MB+DHIV [%]
GEVO2843	pGV2377 + pGV2196	0,011 ± 0,002	5	19
GEVO2843	pGV2377 + pGV2406	0,030*	11*	16*
GEVO2843	pGV2398 + pGV2196	0,151 ± 0,005	19	11
*Estos datos comprenden solo una muestra				

Ejemplo 13: Efecto del aumento de la actividad de DHAD

El fin de este ejemplo es demostrar que el aumento de la actividad de DHAD produce una disminución de la producción de DH2MB en levaduras que comprenden actividad de ALS.

Las cepas y los plásmidos desvelados en este ejemplo se muestran en las Tablas un 40 y 41, respectivamente.

Se transformó GEVO2843 con diferentes pares de plásmidos. La cepa A contiene pGV2227 más pGV2196. La cepa B contiene pGV2284 más pGV2336. Los transformantes individuales de BUD2843 con una de las tres combinaciones de 2 plásmidos se purificaron en colonias individuales en placas de YPD que contenían higromicina, y se usaron las células parcheadas para inocular 3 ml de YPD que contenía etanol al 1 % (v/v), G418 a 0,2 g/l e higromicina a 0,1 g/l. Los cultivos se incubaron a 30 °C, 250 rpm durante una noche antes de su uso para inocular 3 ml de YPD que contenía etanol (v/v) al 1 %, G418 a 0,2 g/l e higromicina a 0,1 g/l. Estos cultivos se incubaron a 30 °C, 250 rpm durante la noche. Al día siguiente, los cultivos se usaron para inocular 50 ml de YPD que contenía glucosa al 8 %, MES 200 mM a pH 6,5, Ergosterol y Tween80 a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,1. Estos cultivos se incubaron a 30 °C, 250 rpm durante la noche. Al día siguiente, se diluyeron los cultivos en 50 ml del mismo medio a una DO₆₀₀ de ~0,1. Los cultivos se incubaron a 30 °C, 250 rpm y se retiraron muestras de 1,5 ml tras 0, 24, 47, 70 y 92 horas de incubación. Las muestras se prepararon para el análisis de GC y LC como se describe. Tras 92 horas, se centrifugó el resto de todas las muestras, y los sedimentos se pesaron y almacenaron a -80 °C. Los ensayos de DHAD se realizaron con lisados preparados a partir de los sedimentos congelados como se describe. El análisis de LC1 y GC1 se realizó como se describe.

Tabla 40. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 13.

Cepa	Genotipo
GEVO2843	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1</i> <i>pdcl1Δ::[P_{CUP1}l.Bs alsS_{coSc}. T_{CYC1}.P_{PGK1}.LI kivD.P_{ENO2}.Sp HIS5] pdc5</i> <i>Δ::[LEU2:bla:P_{TEF1}:Sc_{ILV3ΔN}:P_{TDH3}:Ec_{ilvC_{coSc}^{Q110V}]}</i> <i>pdcl6Δ::[URA3:bla:P_{TEF1}:LI kivD:P_{TDH3}:DmADH]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

Tabla 41. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 13.

Plásmidos	Genotipo
pGV2227	<i>P_{Sc_{TEF1}}: LI_{ilvD_{coSc}}, P_{Sc_{TDH3}}: Ec_{ilvC_{coSc}^{Q110V}}, P_{Sc_{TPI1}}: G418, P_{Sc_{PGK1}}: LI_{kivD_{coEc}}, P_{Sc_{ENO2}}: LI_{adhA}, 2μ, AP^r, PMB1</i>
pGV2284	<i>P_{Sc_{TEF1}}, P_{Sc_{TDH3}}: Ec_{ilvC_{coSc}^{P2D1-A1}}, P_{Sc_{TPI1}}: G418, P_{Sc_{PGK1}}: LI_{kivD_{coEc}}, P_{Sc_{ENO2}}: LI_{adhA}, 2μ, AP^r, PMB1</i>
pGV2196	<i>P_{Sc_{PGK1}} P_{Sc_{TEF1}}, P_{Sc_{TPI1}}: hph, CEN, AP^r, pUC ORI</i>
pGV2336	<i>P_{Sc_{ENO}}, T_{Sc_{PDC6}} P_{Sc_{PGK1}}, P_{Sc_{TEF1}}: LI_{ilvD_{coSc}} P_{Sc_{TDH3}}, P_{Sc_{TPI1}}: hph, CEN, AP^r, pUC ORI</i>

La Tabla 42 muestra la actividad de la DHAD, el rendimiento de isobutanol y el rendimiento de DHIV + DH2MB combinados. La cepa transformada con pGV2284 + pGV2196 (sin DHAD expresada a partir de un plásmido) produjo el rendimiento de carbono más alto, del 19 % para DH2MB + DHIV combinados, y el rendimiento de isobutanol más bajo, del 9 %. La cepa transformada con pGV2227 + pGV2196 (la mayor expresión de DHAD a partir de un plásmido) tuvo el rendimiento de carbono más bajo, del 9 % para DH2MB + DHIV combinados, y el rendimiento de carbono más alto para el isobutanol al 18 %. La cepa transformada con pGV2284 + pGV2336 (expresión de DHAD de baja copia de un plásmido) tuvo un rendimiento de carbono intermedio, del 16 % para DH2MB + DHIV combinados y del 12 % para el isobutanol.

Tabla 42. Actividades de la DHAD, Rendimientos de carbono del isobutanol y de DH2MB + DHIV combinados a las 92 h de fermentación.

Cepa	Plásmidos	Actividad de DHAD	Rendimiento de carbono del isobutanol [%]	Rendimiento de carbono de DH2MB+DHIV [%]
A	pGV2227 + pGV2196	0,29 ± 0,05	18	9
B	pGV2284 + pGV2196	0,05 ± 0,00	9	19

(continuación)

Cepa	Plásmidos	Actividad de DHAD	Rendimiento de carbono del isobutanol [%]	Rendimiento de carbono de DH2MB+DHIV [%]
C	pGV2284 + pGV2336	0,08 ± 0,01	12	16

En un segundo experimento, se transformó GEVO2843 con diferentes pares de plásmidos (Tabla 43) y se evaluó en un matraz de fermentación como se ha indicado anteriormente. La cepa D contiene pGV2196 más pGV2589. La cepa E contiene pGV2529 más pGV2589. La cepa F contiene pGV2196 más pGV2485. La cepa transformada con pGV2196 + pGV2589 (sin DHAD transmitida por plásmidos) produjo isobutanol a 1,25 g/l y DH2MB + DHIV a 5,67 g/l. La cepa con DHAD expresada a partir de un plásmido de alta copia (pGV2196 + pGV2485) produjo isobutanol a 2,74 g/l y DH2MB + DHIV a 3,71 g/l, lo que indica que un aumento en la expresión de DHAD condujo a una disminución en la acumulación de DH2MB + DHIV. La cepa con DHAD expresada a partir de un plásmido de baja copia (pGV2529 + pGV2485) produjo un nivel intermedio de ambos metabolitos, coincidiendo con un nivel intermedio de actividad de DHAD.

Tabla 43. Plásmidos adicionales desvelados en el Ejemplo 13.

Plásmido	Genotipo
2196	<i>P_{Sc_PGK1}, P_{Sc_TEF1}, P_{Sc_TPI1}hph, CEN, AP^r, pUC ORI</i>
2529	<i>P_{Sc_PGK1}, P_{Sc_TEF1}LI_{ilvD_coSc4}, P_{Sc_TPI1}^{hph}, CEN, AP^r, pUC ORI</i>
2589	<i>P_{Sc_TDH3Ec_ilvC_coSc_Q110V}, P_{Sc_TPI1}G418R, P_{Sc_ENO2LI}adhA, 2m, AP^r, PMB1</i>

Tabla 44. Actividades de DHAD, título y rendimiento de isobutanol, y títulos de DH2MB + DHIV combinados a las 72 h de fermentación.

Cepa	Plásmido/s	DHAD transmitida por plásmidos	Título del isobutanol (g/l)	Rendimiento del isobutanol (%)	DH2MB+DHIV (g/l)
D	pGV2196 + pGV2589	Ninguna	1,25 ± 0,27	16,1	5,67 ± 0,29
E	pGV2529 + pGV2589	Baja copia	2,15 ± 0,05	24,8	5,00 ± 0,20
F	pGV2196 + pGV2485	Alta copia	2,74 ± 0,22	31,0	3,71 ± 0,11

Ejemplo 14: Delección de TMA29 en *S. cerevisiae* mediante delección dirigida

El siguiente ejemplo ilustra que la delección del gen *TMA29* del genoma de *S. cerevisiae* elimina la producción de DH2MB cuando se sobreexpresa acetolactato sintasa.

Se identificaron varias enzimas reductasa candidatas que podían catalizar la producción de DH2MB en el genoma de *S. cerevisiae*, incluyendo el producto del gen *TMA29*. Se deleccionaron los genes codificantes de estas reductasas en la cepa GEVO2618 de *S. cerevisiae*, una cepa conocida por producir cantidades en g/l de DH2MB, usando la integración de un marcador URA3. Se realizaron fermentaciones con estas cepas para determinar si la delección de alguno de los genes candidatos, incluyendo *TMA29*, reducía o eliminaba la producción de DH2MB.

Las cepas, los plásmidos y las secuencias de cebadores se enumeran en las Tablas 45, 46 y 47, respectivamente.

Tabla 45. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 14.

GEVO n.º	Genotipo
GEVO1187	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2 MATa <i>ura3-52 leu2-3_112 his3Δ1 trp1-289 ADE2</i>
GEVO2618	<i>S.cerevisiae</i> , MATa <i>ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::[P_{CUP1-1}: Bs_alsS1_coSc: TRP1]</i> .
GEVO3638	<i>S.cerevisiae</i> , MATa <i>ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ::[P_{CUP1-1}: Bs_alsS1_coSc: TRP1]</i> <i>tma29Δ::[T_{KI_URA3_corto}: P_{FBA1}: KI_URA3: T_{KI_URA3}]</i>

(continuación)

GEVO n.º	Genotipo
GEVO3639	<i>S.cerevisiae</i> , MATa <i>ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ</i> ::[<i>P_{CUP1-1}</i> : <i>Bs_alsS1_coSc</i> : <i>TRP1</i>] <i>tma29Δ</i> ::[<i>T_{KI_URA3_corto}</i> : <i>P_{FBA1}</i> : <i>KI_URA3</i> : <i>T_{KI_URA3}</i>]
GEVO3640	<i>S.cerevisiae</i> , MATa <i>ura3 leu2 his3 trp1 pdc1Δ</i> ::[<i>P_{CUP1-1}</i> : <i>Bs_alsS1_coSc</i> : <i>TRP1</i>] <i>tma29Δ</i> ::[<i>T_{KI_URA3_corto}</i> : <i>P_{FBA1}</i> : <i>KI_URA3</i> : <i>T_{KI_URA3}</i>]

Tabla 46. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 14.

Nombre del plásmido	Genotipo
pGV1299	<i>KI-URA3</i> , <i>bla</i> , <i>pUC-ori</i> .
pGV2129	<i>KI_URA3-5'</i> , <i>bla</i> .

Tabla 47. Secuencias oligonucleotídicas desveladas en el Ejemplo 14.

oGV n.º	Secuencia
893	GGATGTGAAGTCGTTGACACAG (SEQ ID NO: 118)
2231	TTGAAACGTTGGGTCCATAC (SEQ ID NO: 119)
2232	TTCACCGTGTGCTAGAGAAC (SEQ ID NO: 120)
2862	TTATACAGGAACTTAATAGAACAAATC (SEQ ID NO: 121)
2867	TGAAACAGCATGGCGCATAG (SEQ ID NO: 122)
2869	CTGTGTCAACGACTTCACATCCGAGGTAACGAGGAACAAGCC (SEQ ID NO: 123)
2870	TTTCGCCGGTATATTCCGTAG (SEQ ID NO: 124)
2891	GTTCTATTAAGTTTCCTGTATAACGGCATTGTTCCACCAGAATGTC (SEQ ID NO: 125)
2902	TCCCGACGGCTGCTAGAATG (SEQ ID NO: 126)
2904	CGCTCCCCATTAATTATACA (SEQ ID NO: 127)
2913	GAAAGGCTCTTGGCAGTGAC (SEQ ID NO: 128)
2914	GCCCTGGTGCAATTAGAATG (SEQ ID NO: 129)
2915	TGCAGAGGGTGATGAGTAAG (SEQ ID NO: 130)
2916	GGCCAAAGGTAAGGAGAACG (SEQ ID NO: 131)

5

Construcción de cepas: Se construyeron las cepas de *S. cerevisiae* GEVO3638, GEVO3639 y GEVO3640 transformando GEVO2618 con productos de PCR de SOE de integración bipartita para reemplazar *TMA29* con un marcador URA3. Los cebadores para amplificar las secuencias de dirección 5' y 3' para los genes de la reductasa se diseñaron con una secuencia de 20 pb homóloga a un fragmento de URA3. Esto se hizo para que la PCR de SOE se pudiera usar para crear fragmentos que contenían el marcador URA3 y las regiones homólogas que flanquean el gen de la reductasa de interés. La PCR se realizó en un Eppendorf Mastercycler® (Cat n.º 71086, Novagen, Madison WI). Se siguió el siguiente programa de PCR para los conjuntos de cebadores usados para generar fragmentos de PCR de SOE: 94 °C durante 2 min, luego 30 ciclos de (94 °C 30 s, 53 °C 30 s, 72 °C 1,5 min) luego 72 °C durante 10 min. Se usaron los siguientes pares de cebadores y la plantilla para la primera etapa de las reacciones de SOE.

15

Para generar el fragmento de URA3 de 5', se usaron oGV2232 y oGV2862 para amplificar el fragmento de URA3 de 5' usando pGV2129 como plantilla. El fragmento de 1.364 pb se purificó por electroforesis en gel. Para generar el fragmento de URA3 de 3', se usaron oGV2231 y oGV893 para amplificar el fragmento de URA3 de 3' usando pGV1299 como plantilla. El fragmento de 1.115 pb se purificó por electroforesis en gel.

20

Para generar el fragmento de *TMA29* de 5', se usaron oGV2867 y oGV2891 para amplificar el fragmento de *TMA29* de 5' usando el ADN genómico de S288c de *S. cerevisiae* como plantilla. La cepa S288c de *S. cerevisiae* se adquirió de la ATCC (ATCC n.º 204508). El fragmento de 412 pb se purificó por electroforesis en gel. Para generar el fragmento de *TMA29* de 3', se usaron oGV2869 y oGV2870 para amplificar el fragmento de *TMA29* de 3' usando el ADN genómico de S288c de *S. cerevisiae* como plantilla. El fragmento de 305 pb se purificó por electroforesis en gel.

25

Para generar los productos de la PCR de SOE, se usaron los siguientes pares de cebadores y plantillas. Para generar el producto de la PCR de SOE *TMA29* de 5', se usaron oGV2232 y oGV2867. Se usaron el fragmento de *URA3* de 5' y el fragmento de *TMA29* de 5' como plantilla. Para generar el producto de la PCR de SOE *TMA29* de 3', se usaron oGV2231 y oGV2870. Se usaron el fragmento de *URA3* de 3' y el fragmento de *TMA29* de 3' como plantilla.

La transformación de la cepa GEVO2618 de *S. cerevisiae* con los productos de PCR de SOE de integración bipartita se realizó como se describe. Tras la transformación, se recogieron las células por centrifugación (18.000 x g, 10 segundos, 25 °C) y se volvieron a suspender en 400 µl de medios SCD-HLWU. Se seleccionaron transformantes integrativos sembrando las células transformadas en medio de agar SCD-Ura. Una vez que los transformantes se purificaron en una sola colonia, se mantuvieron en placas de SCD-Ura.

Se usó la PCR de colonias para verificar la correcta integración. Para seleccionar el extremo 5' correcto, se usaron los cebadores de unión *URA3:TMA29* 5' oGV2915 y oGV2902 para obtener una banda esperada de 991 pb. Para seleccionar el extremo 3' correcto, se usaron los cebadores de unión *URA3:TMA29* 3' oGV2904 y oGV2916 para obtener una banda esperada de 933 pb. Para seleccionar la delección del gen *TMA29*, se usaron los cebadores oGV2913 y oGV2914, esperando una falta de 288 pb si se eliminaba el CDS.

Fermentaciones: Se realizaron fermentaciones con las cepas de *tma29Δ* GEVO3638, GEVO3639 y GEVO3640, y la cepa de *TMA29* parental GEVO2618. Los cultivos se iniciaron en YPD con agitación a 30 °C y 250 rpm. Tras cuatro duplicaciones, se determinó la DO_{600} para cada cultivo. Se añadieron células a 50 ml de YPD con glucosa al 15 % de manera que se obtuvo una DO_{600} final de 0,05. A $t = 24$ h, se retiraron 2 ml de medio y se usaron 25 µl a una dilución de 1:40 para determinar la DO_{600} . El cultivo restante se centrifugó en una microcentrífuga a la velocidad máxima durante 10 min, y se retiró 1 ml de sobrenadante y se envió para análisis de LC1 y LC4. A $t = 48$ h, se retiraron 2 ml de medio y se usaron 25 µl a una dilución de 1:40 para determinar la DO_{600} . Se envió 1 ml de sobrenadante para el análisis de LC1. Además, se recogieron 14 ml mediante centrifugación a 2.700 x g. Tras la retirada de los medios, se volvieron a suspender las células en dH_2O estéril, se centrifugaron a 2.700 xg y el medio restante se retiró cuidadosamente con una punta de pipeta de 1 ml. Se pesaron los sedimentos celulares (se pesaron previamente en tubos vacíos) y luego se congelaron a -80 °C hasta que se descongelaron para los ensayos de ALS como se describe.

La producción de DH2MB depende de la expresión de ALS heteróloga, por ejemplo, el gen *Bs_alsI_coSc*. La actividad de ALS de los lisados celulares se midió como se describe para demostrar que la delección de *TMA29* no tuvo impacto en la expresión y/o actividad de ALS. La actividad de ALS de los extractos de las cepas portadoras de la delección de *TMA29* no es menor, y es ligeramente mayor que la actividad de los extractos de la cepa parental. Los resultados a las 24 h (48 h para la actividad de ALS) se resumen en la Tabla 48, y demuestran claramente la falta de producción de DH2MB en la cepa con la delección de *TMA29*. El análisis de LC4 confirmó que GEVO3527 no produjo DHIV.

Tabla 48. Producción de DH2MB en cepa con delección de *TMA29*.

Cepa	DO_{600}	Glucosa consumida según la LC1 [g/l]	DH2MB según la LC1 [g/l]	Actividad de ALS [U/mg]
GEVO2618	9,2 ± 0,9	61,56 ± 12,0	1,51 ± 0,1	0,44 ± 0,06
GEVO3638, GEVO3639, GEVO3640 (<i>tma29Δ</i>)	12,5 ± 5,0	68,44 ± 12,5	0,00 ± 0,0	0,57 ± 0,04

Ejemplo 15: Delección de *TMA29* en *S. cerevisiae* mediante librería de eliminaciones

El siguiente ejemplo ilustra que la delección del gen *TMA29* del genoma de *S. cerevisiae* elimina la producción de DH2MB cuando se sobreexpresa acetolactato sintasa.

Las cepas, las eliminaciones de ORF y los plásmidos se enumeran en las Tablas 49, 50 y 51.

Tabla 49. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 15.

GEVO n.º	Genotipo/Fuente
GEVO3527	BY4742 de <i>S. cerevisiae</i> : <i>MATa his3Δ 1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> /ATCC n.º 201389, adquirido en ATCC 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110-2209

Tabla 50. Delección de ORF desvelada en el Ejemplo 15.

Delección del ORF	Nombre del gen	Origen
YMR226C	<i>TMA29</i>	La biblioteca de eliminaciones se obtuvo de Open Biosystems, cat n.º YSC 1054

Tabla 51. Plásmido desvelado en el Ejemplo 15.

Plásmido	Genes relevantes
pGV2435	<i>P_{ScCUP1}: Bs_alsS1_coSc:P_{ScTP1}:hph:T_{ScCYC1}, CEN/ARS, bla, pUC-ori</i>

- 5 Se usó una biblioteca comercial de cepas de *S. cerevisiae* que tenía un gen/ORF eliminado por cepa para seleccionar una delección que pudiera catalizar la producción de DH2MB. Se seleccionó la cepa candidata que contenía la delección del ORF de *TMA29* (es decir, YMR226C). Dado que la expresión de ALS exógena es necesaria para la producción de DH2MB, se transformó un plásmido CEN (pGV2435) que contiene el Gen *Bs_alsS1_coSc* impulsado por el promotor *CUP1* en las cepas como se describe. Se recuperaron transformaciones durante la noche a 30 °C, 250 rpm antes de sembrar en placas de YPD que contenían higromicina a 0,2 g/l. Los transformantes se parchearon luego en placas de YPD que contenían higromicina a 0,2 g/l y se incubaron a 30 °C.

- 15 Se realizaron fermentaciones con estas cepas para determinar si la delección de *TMA29* (YMR226C) reducía o eliminaba la producción de DH2MB. Se usaron tres transformantes independientes de cada cepa para inocular precultivos de fermentación que se cultivaron durante la noche hasta la saturación en YPD que contenían higromicina a 0,2 g/l a 30 °C y 250 rpm. Al día siguiente, se midió la DO₆₀₀ de los precultivos y se calculó el volumen de cultivo durante la noche necesario para inocular un cultivo de 50 ml a una DO₆₀₀ de 0,1 para cada cultivo. Se inocularon 50 ml de YPD que contenía glucosa a 150 g/l, MES 200 mM, pH 6,5 e higromicina a 0,2 g/l en un matraz sin tabique deflector de 250 ml con la cantidad calculada de cultivo durante la noche. Se incubaron células a 30 °C y 75 rpm en un agitador orbital. A las 24 h, se suministraron a todos los cultivos 75 g/l adicionales de glucosa mediante la adición de 8,8 ml de una solución de glucosa al 50 % en cada matraz y luego se devolvieron a la incubación a 30 °C y 75 rpm. A las 72 h, se tomaron muestras de 1,5 ml de cada matraz (750 µl divididos entre dos tubos Eppendorf). La DO₆₀₀ se midió para cada cultivo (dilución 1:40 en H₂O). Las células se retiraron de las muestras mediante centrifugación a > 14.000 x g durante 10 minutos en una microcentrífuga. Se recogieron los sobrenadantes de las muestras y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis mediante LC1, y los sedimentos celulares se almacenaron a -80 °C hasta que se descongelaron para los ensayos de ALS como se describe.

- 30 Hubo alguna variación en el crecimiento entre las dos cepas, con valores de DO₆₀₀ de 13,7 para GEVO3527 y de 15,7 para la cepa de eliminación de *TMA29* a las 72 h (Tabla 52). Las cepas consumieron la misma cantidad de glucosa de aproximadamente 223 g/l en 72 h (Tabla 52). GEVO3527 produjo 2,8 g/l de DH2MB a las 72 h. La cepa de eliminación YMR226C (*tma29Δ*) no produjo niveles detectables de DH2MB. El título específico de DH2MB para GEVO3527 fue de 0,2 g/l/DO; la cepa de eliminación YMR226C (*tma29Δ*) no produjo niveles detectables de DH2MB. El análisis de LC4 confirmó que GEVO3527 no produjo DHIV.

- 35 **Tabla 52.** Crecimiento celular, consumo de glucosa y producción de DH2MB a las 72 h.

Cepa	DO ₆₀₀	Glucosa consumida según la LC1 [g/l]	Título de DH2MB según la LC1 [g/l]	Título de DH2MB específico [g/l/DO]
GEVO3527	13,7 ± 0,3	223,3 ± 0,6	2,8 ± 0,1	0,2 ± 0,01
<i>TMA29Δ</i>	15,7 ± 5,5	223,9 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Ejemplo 16: Mejora de la tasa de isobutanol, rendimiento y título con la delección del gen *TMA29* en *S. cerevisiae*

- 40 El siguiente ejemplo ilustra que la delección del gen *TMA29* del genoma de *S. cerevisiae* conduce a un aumento de la productividad, del rendimiento y del título del producto deseado, isobutanol. Además, conduce a una disminución de la productividad, del rendimiento y del título de DH2MB.

- 45 DH2MB es un subproducto del metabolismo del acetolactato en la levadura. En las fermentaciones de isobutanol, DH2MB puede comprender el 10 % o más del rendimiento de carbono. Las cepas con *TMA29* de tipo silvestre producen DH2MB en presencia de acetolactato sintasa expresada (ALS), codificada por *Bs_alsS1_coSc* (SEQ ID NO: 23). Las cepas de *TMA29* eliminado no producen DH2MB en presencia de *Bs_alsS1_coSc* expresado. Una cepa de levadura eliminada para todos los genes *PDC* y *GPD* que expresa ALS (*Bs_alsS1_coSc*) del cromosoma se sometió a delección de *TMA29* y se transformó con un plásmido de vía de isobutanol de cuatro componentes de alta copia, pGV2550 con genes para DHAD (*LI_ilvD_coSc*), KARI (*Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1-hiS6}*), KIVD (*LI_kivD2_coEc*) y ADH

(*LI_adhA_CoSc^{RE1-his6}*). Se compararon el título, el rendimiento y la productividad del isobutanol de esta cepa con los de la cepa parental sin delección del gen TMA29, tanto en una fermentación en matraz de agitación como en fermentadores. Las cepas y los plásmidos se enumeran en las Tablas 53 y 54, respectivamente.

5 **Tabla 53.** Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 16.

GEVO No.	Genotipo
GEVO1187	<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2 MATa ura3 leu2 his3 trp1 ADE2
GEVO3351	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[TKL_URA3] gpd2 Δ::TKL_URA3</i> <i>pdc1 Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdc5 Δ::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3ΔN;P_{TDH3}:ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdc6 Δ::[P_{TEF}-LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3663	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::TKL_URA3 gpd2 Δ::TKL_URA3</i> <i>pdc1 Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdc5 Δ::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3ΔN;P_{TDH3}:ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdc6 Δ[P_{TEF}-LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC-coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> <i>tma29Δ::[TKL_URA3_corto::P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3690, GEVO3691, GEVO 3692	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[TKL_URA3] gpd2 Δ::TKL_URA3</i> <i>pdc1 Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdc5 Δ::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3ΔN;P_{TDH3}:ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdc6 Δ::[P_{TEF}-LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> Transformado con pGV2550 {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3696 GEVO3697	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 gpd1Δ::[TKL_URA3] gpd2 Δ::TKL_URA3</i> <i>pdc1 Δ::[P_{CUP1}:Bs_alsS1_coSc:T_{CYC1}:P_{PGK1}:LI_kivD-P_{ENO2}:Sp_HIS5]</i> <i>pdc5 Δ::[LEU2;bla;P_{TEF1}:ILV3ΔN;P_{TDH3}:ilvC_coSc^{Q110V}]</i> <i>pdc6 Δ::[P_{TEF}-LI_ilvD:P_{TDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1}:P_{ENO2}:LI_adhA:P_{FBA1}:Sc_TRP1]</i> <i>tma29Δ::[TKL_URA3_corto::P_{FBA1}:KI_URA3:T_{KI_URA3}]</i> Transformado con pGV2550 {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

Tabla 54. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 16.

Nombre del plásmido	Genotipo
pGV1299	<i>KI_URA3, bla, pUC-ori.</i>
pGV2129	<i>KI_URA3-5', bla, pUC ori</i>
pGV2550	<i>P_{ScTEF1}:LI_ilvD_coS, P_{ScTDH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1-his6}:P_{ScPGK1}:LI_kivD2_coEc:</i> <i>P_{ScENO2}:LI_adhA_coSc^{RE1-his6}, 2m-ori, pUC-ori, bla, G418R.</i>

10 Construcción de cepas de levadura: GEVO3663 se construyó transformando GEVO3351 con los productos de la PCR de SOE de integración bipartita descritos en el Ejemplo 14 para reemplazar *TMA29* con un marcador *URA3* como se describe, excepto tras la transformación, las células se volvieron a suspender en 350 µl de medio SCD-Ura antes de propagarse a placas SCD-Ura.

15 Las cepas GEVO3690, GEVO3691 y GEVO3692 de *S. cerevisiae* se construyeron transformando GEVO3351 con el plásmido pGV2550. Las cepas GEVO3694, GEVO3695 y GEVO3697 de *S. cerevisiae* se construyeron transformando GEVO3663 con el plásmido pGV2550. En resumen, se prepararon células competentes retirando las células de una placa nueva en 100 µl de acetato de litio 100 mM. La suspensión celular se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. El plásmido de ADN se transformó como se describe. Tras la transformación, las células se volvieron a suspender en 400 µl de YPD que contenía etanol al 1 % y se incubaron a 30 °C durante 6 h con agitación a 250 rpm.

20 Se propagaron las células luego sobre placas de YPD que contenían G418 a 0,2 g/l. Se purificaron los transformantes

en una sola colonia en placas de YPD que contenía placas de G418 a 0,2 g/l. Una vez que los transformantes se purificaron en colonias individuales, se mantuvieron en placas de YPD que contenían G418 a 0,2 g/l.

Fermentaciones: Se realizó una fermentación en matraz de agitación comparando el rendimiento de GEVO3690-GEVO3692 (*TMA29*) con GEVO3694-GEVO3695 y GEVO3697 (*tma29Δ*). Se iniciaron cultivos (3 ml) en YPD que contenía etanol al 1 % y G418 a 0,2 g/l, y se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. La DO_{600} de estos cultivos se midió después de aproximadamente 20 h. Se usó una cantidad apropiada de cada cultivo para inocular 50 ml de YPD que contenía etanol al 1 % y G418 a 0,2 g/l en un matraz con tabique deflector de 250 ml hasta una DO_{600} de aproximadamente 0,1. Estos precultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm durante la noche. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600} de aproximadamente 5, se centrifugaron a 2700 rcf durante 5 minutos a 25 °C en tubos Falcon de 50 ml. Se volvieron a suspender las células de cada cultivo de 50 ml en 50 ml de medio de fermentación como se describe. Los cultivos se transfirieron luego a matraces de 250 ml sin tabique deflector con tapón de rosca con pequeños orificios de ventilación, y se incubaron a 30 °C y 75 rpm. A las 24 y 48 h, se retiraron muestras de cada matraz para medir la DO_{600} y para preparar el análisis de GC1. Para la GC1, se retiraron muestras de 2 ml en un tubo Eppendorf y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 min al máximo. Se analizó un ml del sobrenadante mediante GC1. A las 72 h, se usaron los mismos procedimientos para recoger células para el análisis de la DO_{600} y GC y, además, las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (LC1) para determinar los ácidos orgánicos, incluyendo DH2MB y DHIV, y glucosa.

Los resultados a las 72 h se resumen en la Tabla 55. El título, el rendimiento y la tasa de isobutanol aumentan con la delección del gen *TMA29*, mientras que la producción de DH2MB disminuye.

Tabla 55. El título, el rendimiento y la tasa de isobutanol aumentan a las 72 h.

Cepa	DO_{600}	Glucosa consumida [g/l]	Isobutanol producido [g/l]	Rendimiento del isobutanol [% teórico]	Tasa de isobutanol [g/l/h]	DH2MB producido [g/l]
GEVO3690, GEVO3691, GEVO3692	$8,3 \pm 0,3$	$29,8 \pm 1,3$	$5,5 \pm 0,4$	$45,1 \pm 4$	0,08	3,1
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3697 (<i>TMA29Δ</i>)	$8,3 \pm 0,7$	$33,4 \pm 1,0$	$7,6 \pm 0,2$	$55,1 \pm 2$	0,11	0,03

Además, también se comparó el rendimiento de GEVO3690-GEVO3691 (*TMA29*) con el de GEVO3694-GEVO3696 (*tma29Δ*) en fermentaciones realizadas en recipientes de fermentadores. Los cultivos en placa se transfirieron a matraces con tabique deflector de 500 ml que contenían 80 ml de medio YP con glucosa a 20 g/l, etanol al 1 % v/v, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100 μ M y G418 a 0,2 g/l, y se incubaron durante 34,5 h a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm. Se transfirieron los cultivos en matraz a recipientes individuales de fermentador con motor de accionamiento superior de 2 l con un volumen de trabajo de 1,2 l de 80 ml de medio YP que contenía glucosa 20 g/l, etanol al 1 % v/v, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 100 μ M y G418 a 0,2 g/l para una DO_{600} inicial de 0,2. Los fermentadores fueron operados a 30 °C y pH 6, controlados con KOH 6 N en una fermentación aerobia bifásica. Inicialmente, los fermentadores se operaron a una tasa de transferencia de oxígeno (OTR) de fase de crecimiento de 10 mM/h con una agitación fija de 850 rpm y una capa de aire de 5 sl/h. Los cultivos se cultivaron durante 31 horas a DO_{600} de aproximadamente 6-7, luego se cambiaron inmediatamente a una OTR de aireación de producción de 0,5 mM/h mediante la reducción de la agitación de 850 rpm a 300 rpm durante el resto de la fermentación de 111 h. Periódicamente, se retiraron muestras de cada fermentador para medir la DO_{600} y para preparar el análisis de cromatografía de gases (GC1). Para la GC, se retiraron muestras de 2 ml en un tubo Eppendorf y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 min al máximo. Se analizó un ml del sobrenadante mediante GC1 (isobutanol, otros metabolitos). A las 72 h, se usaron los mismos procedimientos para recoger células para el análisis de la DO_{600} y GC y, además, las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (LC1) para determinar los ácidos orgánicos y la glucosa.

Los resultados a las 111 h se resumen en la Tabla 56. El título, el rendimiento y la tasa de isobutanol aumentaron con la delección del gen *TMA29*. La producción de DH2MB disminuyó hasta niveles indetectables.

Tabla 56. El título, el rendimiento y la tasa de isobutanol aumentan a las 111 h.

Cepa	DO ₆₀₀	Glucosa consumida ^a [g/l]	Isobutanol producido ^a [g/l]	DH2MB producido ^a [g/l]	Rendimiento de isobutanol ^b [% teórico]	Tasa de isobutanol ^b [g/l/h]
GEVO3690, GEVO3691 (TMA29+)	7,2 ± 0,7	29,7 ± 1,1	8,6 ± 0,1	2,9	62,4 ± 3	0,09
GEVO3694, GEVO3695, GEVO3696 (TMA29Δ)	7,4 ± 1,3	35,7 ± 3,9	12,3 ± 1,2	0	75,0 ± 0,01	0,14

^aLos títulos de glucosa, isobutanol y DH2MB son los títulos finales, es decir, a las 111 h de fermentación.
^bEl rendimiento y la tasa de isobutanol se calculan basándose solo en la fase de producción, es decir, de 31 a 111 h de fermentación.

Ejemplo 17: Determinación de la actividad de TMA29 en *S. cerevisiae*

- 5 El siguiente ejemplo ilustra que la actividad de reducción de (S)-2-acetolactato disminuye significativamente en una cepa *tma29Δ*.

Tabla 57. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 17.

GEVO n.º	Genotipo	Origen
GEVO3527	<i>MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i>	ATCC n.º 201389 (BY4742)
GEVO3939	<i>MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ tma29::kan^R</i>	OpenBiosystems cat n.º YSC1054 (colección de Yeast MATα)

- 10 Se cultivaron cepas de levadura GEVO3939 de las que se eliminó el gen *TMA29* (YMR226C) y su GEVO3527 parental cada una por triplicado inoculando 3 ml de YPD en un tubo de cultivo de 14 ml por triplicado para cada cepa. Los cultivos se iniciaron a partir de parches en placa de agar YPD para GEVO3527 y en placas de YPD que contenían G418 a 0,2 g/l para GEVO3939 y GEVO3940. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Al día siguiente, se midió la DO₆₀₀ de los cultivos durante la noche y se calculó el volumen de cada cultivo para inocular un
- 15 cultivo de 50 ml a una DO₆₀₀ de 0,1. Se usó el volumen calculado de cada cultivo para inocular 50 ml de YPD en un matraz con tabique deflector de 250 ml, y los cultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm.

- Se recogieron las células durante la fase logarítmica media a DO de 1,6-2,1 tras 7 h de crecimiento. Se transfirieron los cultivos a tubos Falcon de 50 ml previamente pesados y se recogieron las células mediante centrifugación durante
- 20 5 minutos a 3000 x g. Tras la eliminación del medio, las células se lavaron con 10 ml de H₂O MilliQ. Tras la eliminación del agua, se centrifugaron las células de nuevo a 3.000 x g durante 5 minutos y se retiró el agua restante cuidadosamente usando una punta de pipeta de 1 ml. Los sedimentos celulares se pesaron y luego se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

- 25 Los sedimentos celulares se descongelaron en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, ditiotritol 1 mM, glicerol al 5 % p/v), de modo que el resultado fue una suspensión celular del 20 % en masa. Se añadió 1 ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para cada muestra y se añadieron 850 µl de suspensión celular. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a velocidad completa con 1 min de
- 30 incubación en hielo entre medias. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 21.500 xg a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Los extractos se mantuvieron en hielo hasta que se analizaron utilizando el ensayo de TMA29 como se describe.

- La actividad específica de TMA29 de *S. cerevisiae* en lisados GEVO3527, una cepa de tipo silvestre MATα de *S. cerevisiae*, para la reducción de (S)-2-acetolactato fue de 6,9 ± 0,2 mU/mg. La cepa de *tma29Δ* GEVO3939 tenía una
- 35 actividad específica de 0,7 ± 0,3 mU/mg. La cepa GEVO3527 de tipo silvestre tenía una actividad de TMA29 específica aproximadamente 10 veces más alta que la cepa de eliminación.

Ejemplo 18. Determinación de la actividad de TMA29 en *Kluyveromyces lactis*

- 40 El siguiente ejemplo ilustra que la actividad de reducción de (S)-2-acetolactato disminuye significativamente en una cepa *tma29Δ*.

Tabla 58. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 18.

GEVO n.º	Genotipo
GEVO1287	<i>Kluyveromyces lactis</i> , MAT α <i>uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8</i> [pKD1]
GEVO1742	<i>Kluyveromyces lactis</i> , MAT α <i>uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8</i> [pKD1] <i>pdv1Δ::kan</i>
GEVO4458	<i>Kluyveromyces lactis</i> , MAT α <i>uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8</i> [pKD1] <i>pdv1Δ::kan tma29Δ::hph</i>

Tabla 59. Secuencias oligonucleotídicas desveladas en el Ejemplo 18.

oGV n.º	Secuencia
821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG (SEQ ID NO: 132)
2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG (SEQ ID NO: 133)
3065	AAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCGTTGATAAGGGCAACAACGTTA GTATC (SEQ ID NO: 134)
3066	ATACTAACGTTGTTGCCCTTATCAACGCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTT TTTTAC (SEQ ID NO: 135)
3067	TCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGTTACCCAAGCTGTTTTGCCTATTTTCAA AGC (SEQ ID NO: 136)
3068	GCTTTGAAAATAGGCAAAACAGCTTGGGTAAGTGTACAGAAAAAAGAAAAA TTTG (SEQ ID NO: 137)
3069	AGTTCAAATCAGTTCGAGGATAATTTAAG (SEQ ID NO: 138)
3070	TTAATAAATGCTCAAAAGAAAAAGGCTGGCG (SEQ ID NO: 139)
3103	ACCGGTGCTTCTGCAGGTATTG (SEQ ID NO: 140)
3106	ATGCTTGGTTGAAGCAAATAC (SEQ ID NO: 141)

- 5 La cepa GEVO4458 de *K. lactis* se construyó a partir de GEVO1742 de la siguiente manera. Se prepararon construcciones de ADN para eliminar el locus *TMA29* de *K. lactis* usando PCR de SOE. La secuencia de dirección 5' se amplificó mediante PCR usando el ADN genómico de GEVO1287 como plantilla con los cebadores oGV3103 y oGV3065. El fragmento de 376 pb se purificó por electroforesis en gel. La secuencia de dirección 3' se amplificó por PCR usando el ADN genómico de GEVO1287 como plantilla con los cebadores oGV3106 y oGV3067. El fragmento de 405 pb se purificó en gel. El marcador Hph se amplificó por PCR usando pGV2701 (P_{TEF}-Hph, *CEN/ARS*, *pUC-ori*, *bla*) como plantilla con los cebadores oGV3066 y oGV3068. El fragmento de 1.165 pb se purificó en gel. A continuación, se unieron la secuencia de dirección de 5' y el marcador hph usando productos de PCR descritos como plantilla. La reacción se amplificó usando los cebadores oGV3068 y oGV3103. El fragmento de 1.984 pb se purificó en gel. A continuación, se unió la secuencia de dirección 5' más el fragmento de PCR del marcador Hph con la secuencia de dirección 3' usando la PCR con los cebadores oGV3103 y oGV3106. Los 2.331 pb se purificaron en gel y se usaron para la transformación. El ADN de levadura se aisló usando el kit de ADN fúngico/bacteriano Zymo Research ZR (Zymo Research Orange, CA; Catálogo n.º D6005). Se cultivó GEVO1287 hasta la saturación en 12,5 ml de YPD en matraces con tabique deflector de 125 ml. Se recogió el cultivo entero en tubos Falcon de 15 ml y las células se recogieron a 2700 rcf durante 5 min. El ADN genómico se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración de ADN y todas las preparaciones de ADN genómico se diluyeron hasta una concentración final de 25 ng/µl.

- GEVO1742 se transformó de la siguiente manera. Se inocularon 50 ml de medio YPD en 250 ml de matraces con tabique deflector con células GEVO1742 de una placa nueva. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. A la mañana siguiente, el cultivo se diluyó 1:50 en medio YPD y se dejó crecer durante 6 h. Se recogieron las células mediante centrifugación a 2.700 rcf durante 2 minutos a 30 °C. Se lavaron las células volviendo a suspender por completo las células con 50 ml de agua MilliQ estéril. Se recogieron las células mediante centrifugación a 2700 rcf durante 2 minutos a 30 °C. Se lavaron las células volviendo a suspenderlas con 25 ml de agua MilliQ estéril. Se recogieron las células mediante centrifugación a 2700 rcf durante 2 minutos a 30 °C. Las células se volvieron a suspender en 1 ml de acetato de litio 100 mM, se transfirieron a un tubo Eppendorf y se recogieron mediante centrifugación a 14.000 rcf durante 10 segundos. Se retiró el sobrenadante y las células se volvieron a suspender con 4 veces el volumen del sedimento en LiOAc 100 mM. Se preparó una mezcla de ADN (15 µl de producto de PCR), 72 µl de PEG al 50 %, 10 µl de acetato de litio 1 M y 3 µl de ADN de esperma de salmón desnaturalizado (10 mg/ml)

para cada transformación. En un tubo de 1,5 ml, se añadieron 15 µl de la suspensión celular a la mezcla de ADN (170 µl) y la suspensión de transformación se agitó con formación de vórtice durante 5 pulsos cortos. La transformación se incubó durante 30 min a 30 °C, seguido de incubación durante 22 min a 42 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación (18.000 x g, 10 s, 25 °C). Las células se volvieron a suspender en 400 µl de medio YPD y se dejaron recuperar durante la noche a 30 °C y 250 rpm. A la mañana siguiente, se extendieron las células en placas de YPE (extracto de levadura al 1 % (p/v), peptona al 2 % (p/v), etanol a 25 ml/l) complementadas con higromicina a 0,1 g/l. Se purificaron transformantes en colonias individuales en placas de YPE complementadas con higromicina a 0,1 g/l.

Los aislados de colonias individuales se parchearon en YPE complementado con placas de higromicina a 0,1 g/l y se exploraron los parches para determinar la integración correcta mediante PCR de colonias. La presencia del producto de PCR correcto se confirmó usando electroforesis en gel de agarosa. Para detectar la región de codificación de *TMA29* interna, se usaron los cebadores oGV3103 y oGV3106. Para explorar la unión de integración de 5', se usaron los cebadores oGV3069 y oGV821. Para explorar la unión de integración de 3', se usaron los cebadores oGV2320 y oGV3070.

Se cultivaron células de levadura inoculando 3 ml de medio YPD (extracto de levadura al 1 % (p/v), peptona al 2 % (p/v), glucosa a 2 % (p/v)) en un tubo de cultivo de 14 ml por triplicado para cada cepa. Se iniciaron cultivos a partir de parches en una placa YPD (extracto de levadura al 1 % (p/v), peptona al 2 % (p/v), glucosa al 2 % (p/v), agar al 2 %). Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Al día siguiente, se midió la DO_{600} de los cultivos durante la noche y se calculó el volumen de cada cultivo para inocular un cultivo de 50 ml a una DO_{600} de 0,1. Se usó el volumen calculado de cada cultivo para inocular 50 ml de YPD en un matraz con tabique deflector de 250 ml, y los cultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm durante una noche. Se recogieron las células durante la fase logarítmica media a DO de 1,8 a 2,2. Se transfirieron los cultivos a tubos Falcon de 50 ml previamente pesados y se recogieron las células mediante centrifugación durante 5 min a 3000 x g. Tras la eliminación del medio, las células se lavaron con 10 ml de H_2O MilliQ. Tras la eliminación del agua, se centrifugaron las células de nuevo a 3.000 x g durante 5 min y se retiró el agua restante cuidadosamente con una punta de pipeta de 1 ml. Los sedimentos celulares se pesaron y luego se almacenaron a -80 °C.

Los sedimentos celulares se descongelaron en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, ditiotretol 1 mM, glicerol al 5 % p/v), de modo que el resultado fue una suspensión celular del 20 % en masa. Se añadió 1 ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para cada muestra y se añadieron 850 µl de suspensión celular. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a velocidad completa con 1 min de incubación en hielo entre medias. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 21.500 xg a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Los extractos se mantuvieron en hielo hasta que se analizaron utilizando el ensayo de *TMA29* como se describe.

La actividad específica de Gevo1742 con el gen *TMA29* para la reducción de (S)-2-acetolactato fue de $0,0043 \pm 0,0005$ µmol/min/mg de lisado. La actividad específica de Gevo4459 con el gen *TMA29* eliminado fue de $0,0019 \pm 0,0003$ µmol/min/mg de lisado.

Ejemplo 19: Aumento del rendimiento de isobutanol en cepas que comprenden una delección de *ALD6*, una delección de *TMA29* y una alcohol deshidrogenasa con aumento de k_{cat} y disminución de K_M en *S. cerevisiae*

El siguiente ejemplo ilustra que la combinación de una delección de *ALD6*, delección de *TMA29* y sobreexpresión de un gen codificante de una ADH con propiedades cinéticas mejoradas conduce a un aumento de la producción y del rendimiento teórico de isobutanol.

Se construyó una cepa CEN.PK2 de *S. cerevisiae*, GEVO3991, transformando una cepa CEN.PK2 de *S. cerevisiae*, GEVO3956, que expresa una alcohol deshidrogenasa mejorada (ADH de *L. lactis**, *LI_ADH**) y una descarboxilasa (KIVD de *L. lactis* *LI_kivD2*) de su ADN cromosómico con un plásmido de 2 µm, pGV2603 (*P_{1-DH3}:Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1-his6}* *P_{1-EF1}:LI_ilvD_coSc*, *P_{ENO2}:LI_adhA^{RE1}*, 2 µ-ori, pUC-ori, *bla*, *G418R*), que expresa genes codificantes de enzimas: KARI, DHAD y la ADH mejorada (*Ec_ilvC_coSc^{P2D1-A1-his6}*, *LI_ilvD_coSc* y *LI_adhA^{RE1}*, respectivamente).

Tabla 60. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 19.

GEVO No.	Genotipo
GEVO3991	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1</i> <i>ald6Δ::[P_{ENO2}:LI_{-adhARE1}:P_{FBA1}:Sc_{-TRP1}</i> <i>gpd1Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>gpd2Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>tma29Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>pdcc1Δ::[P_{PDC1}:LI_{-kivD2-coSc5}:P_{FBA1}:LEU2:T_{LEU2}:P_{ADH1}:Bs_{-alsS1-coSc}:T_{CYC1}: P_{PGK1}:LI_{-kivD2-coEc}:P_{ENO2}:Sp_{-HIS5}]</i> <i>pdcc5A::T_{KI_URA3}</i> <i>pdcc6Δ::P_{TDH3}:Sc_{-AFT1}:P_{ENO2}:LI_{-adhARE1}:T_{-KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_{-URA3}:T_{KI_URA3}</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido), [pGV2603]
GEVO3956	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ald6Δ::[P_{ENO2}:LI_{-adhARE1}:P_{FBA1}:Sc_{-TRP1}</i> <i>gpd1Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>gpd2Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>tma29Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>pdcc1Δ::[P_{PDC1}:LI_{-kivD2-coSc5}:P_{FBA1}:LEU2:T_{LEU2}:P_{ADH1}:Bs_{-alsS1-coSc}:T_{CYC1}: P_{PGK1}:LI_{-kivD2-coEc}:P_{ENO2}:Sp_{-HIS5}]</i> <i>pdcc5Δ::T_{KI_URA3}</i> <i>pdcc6Δ::P_{TDH3}:Sc_{-AFT1}:P_{ENO2}:LI_{-adhARE1}:T_{-KI_URA3_corto}:P_{FBA1}:KI_{-URA3}:T_{KI_URA3}</i> {evolucionado para la independencia del complemento C2, tolerancia a la glucosa y crecimiento más rápido}

Se realizó una fermentación para determinar el rendimiento de GEVO3991 (*LI_{-adhARE1}*, *ALD6Δ*, *TMA29Δ*) en cuatro réplicas de fermentador. Se midieron el consumo de glucosa, la producción de isobutanol, la producción de isobutirato, la producción de acetato y la DO₆₀₀ durante la fermentación. Para estas fermentaciones, se transfirieron colonias de células aisladas individuales cultivadas en placas de agar YPD a matraces con tabique deflector de 500 ml que contenían 80 ml de YPD que contenía glucosa a 80 g/l, etanol a 5 g/l, MgSO₄ a 0,5 g/l y G418 a 0,2 g/l, y se incubaron durante 30 h a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm. Se transfirieron los cultivos en matraz a cuatro recipientes individuales de fermentador con motor de impulsión superior de 2 l con un volumen de trabajo de 0,9 l de YPD que contenía glucosa a 80 g/l, etanol a 5 g/l, MgSO₄ a 0,5 g/l y G418 a 0,2 g/l por recipiente para una DO₆₀₀ inicial de 0,3. Los fermentadores se operaron a 30 °C y pH 6,0 controlado con KOH 6 N en una condición aeróbica de 2 fases basada en la tasa de transferencia de oxígeno (OTR). Inicialmente, los fermentadores se operaron a una OTR de fase de crecimiento de 10 mM/h con una agitación fija de 700 rpm y una capa de aire de 5 sl/h. Los cultivos se cultivaron durante 22,5 h hasta aproximadamente 10-11 de DO₆₀₀, luego se cambiaron inmediatamente a las condiciones de aireación de producción durante 40,7 h. La densidad celular durante la fase de producción se acercó a 13 - 14 de DO₆₀₀. La fase de producción se realizó a una OTR de 0,5 mM/h mediante agitación fija de 300 rpm. Periódicamente, se retiraron muestras de cada fermentador para medir la DO₆₀₀ y para preparar los análisis de cromatografía de gases (GC) y cromatografía de líquidos (LC). Para la GC y la LC, se retiraron muestras de 2 ml en un tubo Eppendorf y se centrifugaron en una microcentrífuga durante 10 min al máximo. Un ml del sobrenadante se analizó mediante GC1 (isobutanol, otros metabolitos) y un ml se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (LC1) para ácidos orgánicos y glucosa como se ha descrito.

GEVO3991 alcanzó una densidad celular de 13,8 durante la fase de crecimiento de 22,5 h. El isobutanol producido durante toda la duración del experimento (63,2 h) fue de 18,6 ± 0,9 g/l con 0,84 ± 0,10 g/l de isobutirato y 0,15 ± 0,02 g/l de acetato producidos. El rendimiento teórico de isobutanol alcanzado durante la fase de producción del experimento (22,5-63,5 h) fue de 80,3 ± 1,1 %, mientras que el rendimiento de isobutirato fue solo de 0,013 ± 0,001 g/g de glucosa. No se detectó la producción de DH2MB.

Además, también se caracterizaron tres transformantes independientes de GEVO3991 en matraces de agitación. La cepa se cultivó durante la noche en 3 ml de YPD que contenía etanol al 1 % y G418 a 0,2 g/l a 30 °C a 250 rpm. Estos cultivos se diluyeron a una DO₆₀₀ de 0,1 en 50 ml del mismo medio en un matraz de 250 ml con tabique deflector y se cultivaron durante la noche. Se midió el DO₆₀₀ y se recogió un volumen de células aproximadamente igual a 250 de DO₆₀₀ para cada cultivo mediante centrifugación a 2700 rcf durante 2 minutos y se volvieron a suspender las células en 50 ml de medio de fermentación (YPD que contenía glucosa a 80 g/l, ergosterol a 0,03 g/l, Tween80 a 1,32 g/l, etanol al 1 % v/v, MES 200 mM, pH 6,5), y se transfirieron a un matraz de 250 ml con tapón de rosca ventilado y sin tabique deflector. Se comprobó la DO₆₀₀ y los cultivos se colocaron a 30 °C a 75 rpm para iniciar la fermentación

microaeróbica. Se tomaron muestras para cromatografía líquida (LC), análisis de cromatografía de gases (GC) y DO₆₀₀ a intervalos de aproximadamente 24 h. Se centrifugaron las muestras (2 ml) a 18.000 x g durante 10 min y se usaron 1,5 ml del sobrenadante clarificado para el análisis de GC1 y LC1.

- 5 Las fermentaciones comenzaron a una DO₆₀₀ de aproximadamente 4. Las células crecieron a una DO₆₀₀ de aproximadamente 8 en 72 h de fermentación microaeróbica. Tras 72 h, el título de isobutanol era de 12,3 g/l y el rendimiento de isobutanol era del 67,2 % del teórico. El título y el rendimiento de isobutirato eran bajos: se produjo isobutirato a 0,6 g/l con un rendimiento de 0,013 g/g de glucosa. No se detectó la producción de DH2MB.

10 Ejemplo 20: Efecto de la delección de *TMA29* en *K. marxianus*

El fin de este ejemplo es demostrar que la delección de *TMA29* en una cepa de *Kluyveromyces marxianus* que comprende la actividad de ALS da lugar a una producción reducida de DH2MB.

- 15 Las cepas, los plásmidos y las secuencias oligonucleotídicas que se desvelan en este ejemplo se enumeran en las Tablas 61, 62 y 63, respectivamente.

Tabla 61. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 20.

GEVO n.º	Genotipo
1947	<i>ura3-delta2</i> , derivado de la cepa NRRL-Y-7571 <i>Kluyveromyces marxianus</i> (E.C. Hansen) van der Walt (1971)
2348	<i>ura3-delta2 pdc1Δ::G418R, P_{Sc PDC1}:31COX4 MTS:Bs_alsS:P_{Sc FBA1}:URA3 ura3-delta2</i>
6403, 6404	<i>ura3-delta2 pdc1Δ::G418R, P_{Sc PDC1}:31COX4 MTS:alsS: P_{Sc FBA1}:URA3 ura3-delta2 tma29Δ::PSc_{TEF1}-hph</i>

20

Tabla 62. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 20.

Nombre del plásmido	Genes relevantes/Uso	Genotipo
pGV2701	Para que la PCR de SOE dé el fragmento de <i>hph</i>	<i>P_{TEF1}:hph, CEN, pUC ori, bla</i>

Tabla 63. Secuencias oligonucleotídicas desveladas en el Ejemplo 20.

Cebador	Secuencia
3498	ATGTCTCAAGGTAGAAGAGCTG (SEQ ID NO: 142)
3137	GGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGTATATCTTCTGAATCAATTGCACCGAC (SEQ ID NO: 143)
3140	CAAATTTTCTTTTTTCTGTACAGAGAGGTATGATTAATACCAATGTCTTGGG (SEQ ID NO: 144)
3499	TCATTACCCACGGTAAATGTGG (SEQ ID NO: 145)
3138	GTCGGTGCAATTGATTCAGAAGATATACATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCC (SEQ ID NO: 146)
3139	GTATTAATCATACCTCTCTGTACAGAAAAAAGAAAAATTTGAAATATAAATAACG (SEQ ID NO: 147)
3501	GAAGGAAATTCCAGTCTCCTAGTTCCTTTGAACAC (SEQ ID NO: 148)
2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG (SEQ ID NO: 149)
3500	CAGAACAATCAATCAACGAACGAACGACCCACCC (SEQ ID NO: 150)
821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG (SEQ ID NO: 151)
3141	AAGGAGATGCTTGTTTGTAGCAAACACC (SEQ ID NO: 152)

- 25 **Construcción de cepas:** Se eliminó el homólogo del gen *TMA29* de *K. marxianus* codificante de la proteína TMA29 de *K. marxianus* (SEQ ID NO: 23) de la cepa parental de *K. marxianus* GEVO2348 de la manera siguiente, dando lugar a las cepas GEVO6403 y GEVO6404.

- 30 El ADN genómico se aisló de GEVO1947 como se describe. Se realizaron construcciones para integrar el casete de *hph* de *E. coli* (resistencia a la higromicina) en el locus *TMA29* de GEVO2348 mediante PCR de SOE como se describe. La etapa n.º 1 de la PCR consistió en tres reacciones que dieron lugar a la secuencia de dirección a *TMA29* de 5', la secuencia de dirección a *TMA29* de 3' y el marcador *hph*. La secuencia de dirección 5' se amplificó a partir del ADN

genómico de GEVO1947 preparado con los cebadores oGV3498 y oGV3137. El fragmento de 385 pb se purificó por electroforesis en gel. La secuencia de dirección 3' se amplificó a partir del ADN genómico de GEVO1947 preparado con los cebadores oGV3140 y oGV3499. El fragmento de 473 pb se purificó en gel. El casete de *P_{TEF1}:hph:T_{CYC1}(partia)* se amplificó a partir de pGV2701 con los cebadores oGV3138 y oGV3139. El fragmento de 1.651 pb se purificó en gel. La etapa final de la PCR de SOE unió los 3 productos de la etapa n.º 1 (secuencia de dirección 5'/marcador de hph/secuencia de dirección 3'). La reacción se amplificó usando los cebadores oGV3498 y oGV3499. El fragmento de 2.414 pb se purificó en gel como se describe y se usó para la transformación de GEVO2348 como se describe. El medio usado para cultivar las células para la transformación fue YPE. Tras la transformación, Se dispersaron 150 µl del cultivo de transformación sobre placas de YPE que contenían higromicina a 0,1 g/l. Las placas se incubaron a 30 °C y las colonias transformadas se aislaron en colonias individuales y luego se parchearon para la PCR de colonias en placas de YPE que contenían higromicina a 0,1 g/l.

Se usó la PCR de colonias de levadura para detectar la unión de integración adecuada de 3', la unión de integración de 5', así como la falta de la región de codificación de *TMA29* como se describe. La unión de integración de 3' correcta se confirmó usando los cebadores oGV3501 y 2320. La unión de integración de 5' correcta se confirmó usando los cebadores oGV3500 y oGV0821. Finalmente, para detectar la delección de la región de codificación interna de *TMA29*, se usaron los cebadores oGV3500 y oGV3141.

Fermentación: Se realizaron fermentaciones en matraz de agitación por triplicado para cada una de las cepas GEVO2348 (*TMA29*), GEVO6403 (*tma29Δ*) y GEVO6404 (*tma29Δ*) como se describe para determinar si la delección de *TMA29* en cepas que expresan *Bs_alsS* daría lugar a una producción disminuida de DH2MB. Los transformantes aislados de una sola colonia de las cepas de *tma29Δ* se parchearon en placas de YPE que contenían higromicina a 0,1 g/l, mientras que las cepas parentales se parchearon a placas de YPE. Se usaron células de los parches para inocular cultivos de 3 ml de YPE. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Tras la incubación nocturna, se determinó la DO₆₀₀ de estos cultivos diluyendo 1:40 en agua. Se añadió la cantidad apropiada de cultivo a 50 ml de YPE para obtener una DO₆₀₀ de 0,1 en matraces de 250 ml con tabique deflector, y se incubó a 30 °C y 250 rpm. Tras una incubación de 24 h, se determinó la DO₆₀₀ de estos cultivos diluyendo 1:40 en agua. Se añadió la cantidad apropiada de cultivo a 50 ml de YPD que contenía glucosa al 8 % y MES 200 mM, pH 6,5 para obtener una DO₆₀₀ de 5. Los cultivos de fermentación se incubaron a 30 °C y 75 rpm en matraces de 250 ml sin tabique deflector. También se recogió una parte alícuota de 15 ml de medio para su uso como blanco para el análisis de LC4 y se mantuvo a 4 °C hasta la presentación de la muestra. Tras 72 h, se retiraron 1,5 ml de cultivo y se prepararon muestras como se ha explicado anteriormente para el análisis de DO₆₀₀ y LC4. Además, se recogieron muestras para los ensayos enzimáticos a las 72 h mediante la transferencia de DO de 80 de la muestra apropiada a dos tubos Falcon de 15 ml centrifugados a 3000 x g durante 5 min a 4 °C. Se volvieron a suspender los sedimentos en 3 ml de agua estéril, fría, y se centrifugaron a 5000 x g durante 2 minutos a 4 °C en un rotor de cubeta giratoria en la centrífuga de sobremesa. Se retiró el agua con un aspirador de vacío. Los tubos cónicos se almacenaron a -80 °C.

Se midieron las actividades enzimáticas de ALS *in vitro* de los lisados como se describe. La Tabla 64 muestra la media de la actividad enzimática de ALS *in vitro* de los lisados de las cepas tras 72 h. La actividad de ALS se puede medir en GEVO2348 (media de 3,14 Unidades/mg de lisado), así como en ambas cepas de *tma29Δ* GEVO6403 y GEVO6404 (medias de 1,63 y 1,58 Unidades/mg de lisado, respectivamente).

La Tabla 64 también muestra los títulos de DH2MB y DHIV según la LC4 para estas cepas. Las cepas GEVO2348 (*TMA29*) produjeron títulos de DH2MB medios de 0,89 g/l, mientras que no se detectó DHIV. Los títulos de DH2MB disminuyeron significativamente en las cepas de *tma29Δ* GEVO6403 y GEVO6404, que se midieron a 0,16 y 0,15 g/l respectivamente. Mientras que la actividad de ALS disminuye en las cepas de *tma29Δ*, esto no tiene en cuenta la disminución > 80 % en los títulos de DH2MB en las cepas de delección. Por ejemplo, una réplica técnica de GEVO2348 presentó una actividad de ALS de 2,5 Unidades/mg de lisado y produjo DH2MB a 0,83 g/l, mientras que una de las réplicas técnicas de la cepa de *tma29Δ* GEVO6404 tiene una actividad similar de 1,9 Unidades/mg de lisado y produjo solo DH2MB a 0,16 g/l.

Tabla 64. Actividad de ALS, Títulos de DH2MB y DHIV, y porcentaje de reducción de DH2MB en las cepas de *tma29Δ* tras la fermentación de 72 h.

Cepa	<i>TMA29</i>	Actividad de ALS (U/mg de lisado)	DH2MB según LC4 (g/l)	DHIV según la LC4 (g/l)	Disminución de DH2MB (%)
GEVO2348	+	3,1 ± 0,5	0,89 ± 0,07	n.d.	
GEVO6403	Δ	1,6 ± 0,2	0,16 ± 0,02	n.d.	82 %
GEVO6404	Δ	1,6 ± 0,3	0,15 ± 0,01	n.d.	83 %
n.d. = no detectado					

Ejemplo 21: Efecto de la delección de *TMA29* en *Kluyveromyces lactis*

El fin de este ejemplo es demostrar que la delección de *TMA29* en una cepa de *Kluyveromyces lactis* que comprende la actividad de ALS da lugar a una producción reducida de DH2MB.

Las cepas, los plásmidos y los cebadores oligonucleotídicos que se desvelan en este ejemplo se enumeran en las Tablas 65, 66 y 67, respectivamente.

Tabla 65. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 21.

Número GEVO	Genotipo
1742	<i>MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan</i> , derivado de la cepa de la cepa de <i>K. lactis</i> ATCC 200826 (<i>Kluyveromyces lactis</i> (Dombrowski) van der Walt, teleomorfo)
4458	<i>MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph</i>
6310, 6311, 6312	<i>MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan [pGV1429]</i>
6313, 6314, 6315	<i>MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan [pGV1645]</i>
6316, 6317	<i>MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan</i> + integración aleatoria de <i>Bs_alsS:TRP1</i>
6318, 6319, 6320	<i>MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph [pGV1429]</i>
6321, 6322, 6323	<i>MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph [pGV1645]</i>
6324, 6325	<i>MATalpha uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8 [pKD1] pdc1::kan tma29::hph</i> + integración aleatoria de <i>Bs_alsS:TRP1</i>

Tabla 66. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 21.

Nombre del plásmido	Genes relevantes/Uso	Genotipo
pGV1429	Vector vacío de 1,6 µm de alta copia que contiene <i>TRP1</i>	<i>ori</i> de 1,6 µm, <i>PMB1 ori</i> , <i>bla</i> , <i>TRP1</i>
pGV1645	Vector vacío de 1,6 µm de alta copia que contiene <i>TRP1</i> y <i>Bs_alsS</i>	<i>ori</i> de 1,6 µm, <i>PMB1 ori</i> , <i>bla</i> , <i>TRP1</i> , <i>Bs_alsS</i>
pGV1726 (linealizado con <i>AhdI</i>)	Vector que contiene <i>TRP1</i> y <i>Bs_alsS</i>	<i>PMB1 ori</i> , <i>bla</i> , <i>TRP1</i> , <i>Bs_alsS</i>

Tabla 67. Secuencias oligonucleotídicas desveladas en el Ejemplo 21.

Cebador	Secuencia
oGV3065	AAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCGTTGATAAGGGCAACAACGTTAG TATC (SEQ ID NO: 153)
oGV3066	ATACTAACGTTGTTGCCCTTATCAACGCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTT TTAC (SEQ ID NO: 154)
oGV3067	TCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGTTACCCAAGCTGTTTTGCCTATTTTCAAA GC (SEQ ID NO: 155)
oGV3068	GCTTTGAAAATAGGCAAAACAGCTTGGGTAAGTGTACAGAAAAAAGAAAAATT TG (SEQ ID NO: 156)
oGV3103	ACCGGTGCTTCTGCAGGTATTG (SEQ ID NO: 157)
oGV3106	ATGCTTGTTGGAAGCAAATAC (SEQ ID NO: 158)
oGV1321	AATCATATCGAACACGATGC (SEQ ID NO: 159)
oGV1324	AGCTGGTCTGGTGATTCTAC (SEQ ID NO: 160)

Construcción de cepas: Se eliminó el homólogo del gen *TMA29* de *K. lactis* codificante de la proteína TMA29 de *K. lactis* (SEQ ID NO: 7) de la cepa parental de *K. lactis* GEVO1742 de la manera siguiente, dando lugar a la cepa

GEVO4458 como se describe en el Ejemplo 18.

Las cepas de *K. lactis* GEVO1742 (parental, *TMA29*) y GEVO4458 (*tma29Δ*) se transformaron con el plásmido pGV1429 (vector de control vacío), pGV1645 (que expresa *Bs_alsS*) o con el plásmido pGV1726 linealizado con *AhdI* (que produce una integración aleatoria de *Bs_alsS*) como se describe, se volvieron a suspender en 400 µl de 1,25 x SC-HWLU y se extendieron sobre placas SCD-W para seleccionar las células transformadas. La integración aleatoria de pGV1726 linealizado con *AhdI* tanto en GEVO1742 como la cepa de *tma29Δ* GEVO4458 se confirmó mediante PCR de colonias con los cebadores oGV1321 y oGV1324 que son específicos para la región de codificación interna de *Bs_alsS* como se describe. Las cepas GEVO6316, GEVO6317, GEVO6324 y GEVO6325 resultaron ser positivas para la integración del gen.

Fermentación: Se realizó una fermentación en matraz de agitación en las diferentes cepas de GEVO (Tabla 65) como se describe para determinar si la delección de *TMA29* en cepas que expresan *Bs_alsS* daría lugar a una producción reducida de DH2MB. Se parchearon transformantes aislados de una sola colonia en placas de SCD-W, no se parchearon cepas parentales transformadas en YPD. Se usaron células de los parches para inocular cultivos de 3 ml en YPD (cepas parentales y cepas integradas) o 3 ml de SCD-W. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Tras la incubación nocturna, se determinó la DO₆₀₀ de estos cultivos diluyendo 1:40 en agua. Se añadió la cantidad apropiada de cultivo a 50 ml de YPD que contenía glucosa al 5 % o SCD-W que contenía glucosa al 5 %, obteniéndose una DO₆₀₀ de 0,1 en matraces con tabique deflector de 250 ml, y se incubó a 30 °C y 250 rpm. Tras una incubación de 24 h, se determinó la DO₆₀₀ de estos cultivos diluyendo 1:40 en agua. Se añadió la cantidad apropiada de cultivo a 50 ml de YPD que contenía glucosa al 8 %, MES 200 mM a pH 6,5 o SCD-W que contenía glucosa al 8 %, obteniéndose una DO₆₀₀ de 5. Cuando no hubo 250 DO disponibles para comenzar la fermentación, se usó el cultivo entero de 50 ml. Los cultivos de fermentación se incubaron a 30 °C y 75 rpm en matraces de 250 ml sin tabique deflector. También se recogió un tubo cónico de 15 ml para los blancos de los medios para el análisis de LC1 y LC4 como se describe, y se mantuvo a 4 °C hasta la presentación de la muestra. A las 72 h, se recogieron 1,5 ml de cultivo. se determinaron los valores de DO₆₀₀, y se prepararon las muestras para el análisis de LC1 y LC4 mediante centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm y retirando 1 ml del sobrenadante para analizar. Además, se recogieron muestras para los ensayos de enzimas en el punto de tiempo de 72 h. Se transfirieron 60 DO de la muestra apropiada a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 3000 X g durante 5 min a 4 °C. Se volvieron a suspender los sedimentos en 3 ml de agua estéril, fría, y se transfirieron a 3 tubos Eppendorf de 1,5 ml (1 ml cada uno) para preparar 3 x 20 réplicas de DO. Se centrifugaron los tubos a 5000 X g durante 2 min a 4 °C en un rotor de cubeta giratoria en la centrifuga de sobremesa. Se retiró el agua con un aspirador de vacío. Los tubos Eppendorf se almacenaron a -80 °C.

Se midieron las actividades enzimáticas de ALS *in vitro* de los lisados como se describe. La Tabla 68 muestra la media de la actividad enzimática de ALS *in vitro* de los lisados de las cepas tras 72 h. La actividad de ALS solo se pudo medir en cepas con *Bs_alsS* integrada aleatoriamente (GEVO6316, GEVO6317, GEVO6324, 6325) o expresada a partir de plásmido (GEVO6313-6315, GEVO6321-6323). La actividad de ALS en cepas con *Bs_alsS* integrada es menor que en las cepas que expresan *Bs_alsS* a partir del plásmido. Sin embargo, la actividad de 0,25 Unidades/mg de lisado en las cepas *TMA29* con *Bs_alsS* integrada (GEVO6316, GEVO6317) siguió bastando para producir un título de 1,06 g/l de DHIV + DH2MB combinados.

La Tabla 68 muestra los títulos de DHIV + DH2MB combinados para las diferentes cepas tras 72 h de fermentación según el análisis LC1. La cepa GEVO1742 (parental, *TMA29*) produjo títulos de DHIV + DH2MB combinados medibles solo cuando *Bs_alsS* se integró aleatoriamente (1,06 g/l) o se expresó a partir del plásmido pGV1645 (0,45 g/l). Estos títulos de DHIV + DH2MB se eliminaron en la cepa GEVO4458 *detma29Δ* al expresar *Bs_alsS* mediante integración aleatoria (GEVO6324, GEVO6325) o plásmido (GEVO6321-6323). El análisis de LC4 indicó que la mayoría del título de DHIV + DH2MB combinados era, de hecho, de DH2MB.

Tabla 68. Actividad de ALS, título de DHIV + DH2MB combinados y porcentaje de DH2MB del título de DHIV + DH2MB combinados.

Cepa	Cepa parental	Plásmido integrado (I), plásmido (P) o control (C)	TMA29	ALS	Actividad de ALS (U/mg de lisado)	DHIV + DH2MB según la LC1 (g/l)	% de DH2MB en DH2MB+DHIV según la LC4
GEV01742		ninguno	+	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	n/a
GEV06316, 6317	GEVO1742	PGV1726 (I)	+	+	0,25 ± 0,06	1,06 ± 0,23	80,0 ± 3,7
GEVO4458	GEVO1742	ninguno	Δ	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	n/a
GEVO6324, 6325	GEVO4458	PGV1726 (I)	Δ	+	0,86 ± 0,28	0,00 ± 0,00	n/a
GEVO6310-6312	GEVO1742	PGV1429 (C)	+	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	n/a
GEVO6313-6315	GEVO1742	PGV1645 (P)	+	+	6,12 ± 1,09	0,45 ± 0,02	87,2 ± 2,3
GEVO6318-6320	GEVO4458	PGV1429 (C)	Δ	-	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	n/a
GEVO6321-6323	GEVO4458	PGV1645 (P)	Δ	+	1,23 ± 0,45	0,00 ± 0,00	n/a
n/a = no aplicable, las muestras no tenían un máximo detectable según la LC1, por lo que no fueron analizadas mediante LC4							

Ejemplo 22: Efecto de la delección de *TMA29* en *I. orientalis*

El siguiente ejemplo ilustra que la delección del gen *TMA29* de *I. orientalis* produce una disminución de la actividad de *TMA29* y también una disminución de la producción de DH2MB en cepas que comprenden actividad de ALS.

5

Tabla 69. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 22.

GEVO n.º	Genotipo relevante
GEVO4450	<i>ura3Δ/ura3Δ</i> <i>pdcc1-1Δ::LI_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS /</i> <i>pdcc1-2Δ::LI_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS</i> <i>TMA29/TMA29</i>
GEVO12425	<i>ura3Δ/ura3Δ</i> <i>pdcc1-1Δ:: LI_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS pdcc1-2Δ:: LI_kivD: loxP</i> <i>TMA29/TMA29</i>
GEVO6155	<i>ura3Δ/ura3Δ</i> <i>pdcc1-1Δ::LI_kivD; T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS</i> <i>pdcc1-2Δ::LI_kivD: loxP</i> <i>TMA29/</i> <i>tma29Δ::P_{PDC}:LI_adhA^{RE1}: P_{TDH3}: Ec_ilvC^{P2D1-A1}: loxP: URA3: loxP: P_{ENO1}: LI_ilvD</i>
GEVO6158	<i>ura3Δ/ura3Δ</i> <i>pdcc1-1Δ:: LI_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS pdcc1-2Δ:: LI_kivD: loxP</i> <i>tma29Δ:: P_{PDC}: LI_adhA^{RE1}: P_{TDH3}: Ec_ilvC^{P2D1-A1}_coCB: loxP: URA3: loxP: P_{ENO1}:</i> <i>LI_ilvD /</i> <i>tma29Δ:: P_{PDC}: LI_adhA^{RE1}: P_{TDH3}:Ec_ilvC^{P2D1-A1}: loxP: URA3: loxP: P_{ENO1}: LI_ilvD</i>
GEVO12473	<i>ura3Δ/ura3Δ</i> <i>pdcc1-1Δ:: LI_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS</i> <i>pdcc1-2Δ:: LI_kivD: loxP</i> <i>tma29Δ:: loxP: URA3: loxP/</i> <i>tma29Δ::loxP: MEL5: loxP</i>
GEVO12474	<i>ura3Δ/ura3Δ</i> <i>pdcc1-1Δ:: LI_kivD: T_{ScCYC1}: loxP: P_{ENO1}: Bs_alsS</i> <i>pdcc1-2Δ:: LI_kivD: loxP</i> <i>tma29Δ:: loxP: URA3: loxP/</i> <i>tma29Δ:: loxP: MEL5: loxP</i>

Construcción de cepas: Se construyeron cepas de *Issatchenkia orientalis* derivadas de PTA-6658 que eran de tipo silvestre para el gen *TMA29* (GEVO4450, GEVO12425), heterocigóticas para la delección de una copia del gen *TMA29* (GEVO6155) o de delección completa para el gen *TMA29* (GEVO6158, GEVO12473, GEVO12474) usando métodos convencionales de genética de levaduras y biología molecular. Estas cepas también portan una copia del gen *alsS* de *Bacillus subtilis*.

Ensayo de enzimas TMA29: Para el ensayo *in vitro* de TMA29, se cultivaron cepas de *I. orientalis* GEVO4450 (*TMA29/TMA29*), GEVO6155 (*tma29Δ/TMA29*) y GEVO6158 (*tma29Δ/tma29Δ* completa) inoculando 25 ml de YPD en matraces con tabique deflector de 125 ml con células de una placa de YPD nueva. Los cultivos se cultivaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Estos cultivos se usaron para inocular 50 ml de YPD en matraces con tabique deflector de 250 ml a una DO₆₀₀ de 0,05. Los cultivos se cultivaron a 30 °C y 250 rpm hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 5-8 (fase logarítmica tardía). Se recogieron las células recogiendo 80 DO de células en un tubo Falcon de 50 ml y centrifugando a 2.700 x g durante 3 min. Tras retirar el sobrenadante, se colocaron las células en hielo y se lavaron con 5 ml de agua fría. Las células se centrifugaron a 2.700 x g durante 3 minutos y se eliminó el agua. Los sedimentos celulares se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Además, las mismas cepas se cultivaron inoculando 3 ml de YPD de placas nuevas y cultivando durante 8 h a 30 °C y 250 rpm. Estos cultivos se usaron para inocular 50 ml de YPD en matraces con tabique deflector de 250 ml a una DO₆₀₀ de 0,01, y los cultivos se cultivaron a 30 °C y 250 rpm hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 4-8. Estos cultivos se usaron para inocular 50 ml de YPD que contenía glucosa al 8 %, MES 200 mM, pH 6,5 a una DO₆₀₀ final de 4-5, centrifugando una cantidad apropiada de cultivo a 2.700 x g durante 3 minutos en un tubo Falcon de 50 ml y luego volviendo a suspender el sedimento celular en 50 ml del medio indicado. Las células se incubaron en 250 ml de matraces sin tabique deflector a 30 °C y 75 rpm durante 48 h (fase de fermentación). Se recogieron sedimentos celulares de ochenta DO como se describe. Se volvieron a suspender las células, se lisaron y se ensayó la actividad de TMA29 como se describe.

La Tabla 70 muestra la actividad de TMA29 específica de los lisados de las cepas GEVO4450, 6155 y 6158 de *I. orientalis* en U/mg de proteína total. La actividad específica de TMA29 se reduce en GEVO6155 (*tma29/TMA29*) y

GEVO6158 (delección completa de *tma29*) en comparación con GEVO4450 (*TMA29/TMA29*).

Tabla 70. Actividad de TMA29 en cepas de *I. orientalis*.

CEPA	Fase logarítmica tardía de actividad de TMA29 [U/mg de proteína total]	Fase de fermentación de 48 h de actividad de TMA29 [U/mg de proteína total]
GEVO4450	0,0048 ± 0,0010	0,0027 ± 0,0003
GEVO6155	0,0025 ± 0,0008	0,0010 ± 0,0001
GEVO6158	0,0023 ± 0,0003	0,0010 ± 0,0003

5 Fermentación: Para la fermentación, se cultivaron cepas de *I. orientalis* GEVO12425 (*TMA29/TMA29*), GEVO12473 (*tma29/tma29*) y GEVO12474 (*tma29/tma29*) inoculando 12 ml de YPD en matraces con tabique deflector de 125 ml con células de una placa de YPD nueva. Los cultivos se cultivaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Se determinó la DO₆₀₀ de los 12 ml de cultivos de una noche y se usó la cantidad apropiada para inocular 50 ml de YPD que contenía glucosa al 5 % en 250 ml de matraces con tabique deflector hasta una DO₆₀₀ de 0,1. Los matraces se incubaron a 30 °C y 250 rpm durante la noche. Se determinó la DO₆₀₀ de los cultivos de 50 ml. Se centrifugó la cantidad apropiada de cultivo a 2.700 rcf durante 5 min a 25 °C en tubos Falcon de 50 ml y se retiró el sobrenadante. Las células de cada cultivo de 50 ml se volvieron a suspender en 50 ml de YPD que contenía glucosa al 8 %, MES 200 mM, pH 6,5. A continuación, se transfirieron los cultivos a matraces sin tabique deflector con tapón a rosca de 250 ml y se incubaron a 30 °C y 75 rpm. A las 72 h, se retiraron muestras de cada matraz, se midió la DO₆₀₀ y se prepararon las muestras para el análisis de LC4 transfiriendo una muestra de 1 ml a un tubo Eppendorf y centrifugando a 18.000 x g, 10 segundos, 25 °C. Tras la centrifugación, se transfirieron 0,75 ml de sobrenadante a una placa de microtitulación y se analizaron mediante LC4. También a las 72 h, se recogieron células para los ensayos enzimáticos transfiriendo 80 DO a tubos de Falcon de 15 ml como se describe. Se volvieron a suspender células para los ensayos de ALS, se lisaron y se ensayaron como se describe.

La Tabla 71 muestra la producción de DH2MB y las actividades de ALS para GEVO12425, 12473 y 12474 a las 72 h. El título de DH2MB se determinó mediante LC4. La actividad de ALS fue similar en todas las cepas.

Tabla 71. Producción de DH2MB y actividad de ALS en cepas de *I. orientalis* a las 72 h de fermentación.

CEPA	DH2MB según LC4 [g/l]	Actividad de ALS [U/mg]
GEVO12425	1,87 ± 0,60	4,6 ± 1,1
GEVO12473	0,08 ± 0,01	4,0 ± 0,1
GEVO12474	0,07 ± 0,00	3,1 ± 1,1

Ejemplo 23: Efecto de la delección de TMA29 en *S. pombe*

El siguiente ejemplo ilustra que la actividad de reducción de (S)-2-acetolactato disminuye significativamente en una cepa de *tma29Δ* de *S. pombe* en comparación con una cepa de *TMA29* de *S. pombe*.

Tabla 72. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 23.

GEVO n.º	Genotipo	Origen
GEVO6444	<i>h⁺ ade6-M216, ura4-D18, leu1-32</i>	Cepa BG_0000H8 de Bioneer
GEVO6445	<i>h⁺ SPAC521.03Δ::kanMX4, ade6-M216, ura4-D18, homólogo de TMA29 leu1-32 (SEQ ID NO: 22) eliminado</i>	Cepa BG_1772H de Bioneer

Se cultivaron cepas de levadura GEVO6444 que tienen un gen *TMA29* intacto (SEQ ID NO: 161) y GEVO6445 que tiene el gen *TMA29* eliminado, durante la noche en 12 ml de YPD en matraces con tabique deflector de 125 ml a 250 rpm y 30 °C. Al día siguiente, se determinaron los valores de DO₆₀₀ y se iniciaron cultivos técnicos por triplicado en 50 ml de YPD con glucosa al 5 % a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,3. Los cultivos se dejaron crecer a 250 rpm y 30 °C a lo largo del día. Al final del día, los cultivos se diluyeron en YPD con glucosa al 5 % hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,15 y se incubaron durante la noche a 250 rpm y 30 °C. Se recogieron las células al alcanzar una DO₆₀₀ de entre 4 y 6. Para recoger los sedimentos para los ensayos enzimáticos, se transfirieron 80 DO de la muestra apropiada a dos tubos Falcon de 15 ml (para muestras por duplicado) y se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 min a 4 °C. Se volvieron a suspender los sedimentos en 3 ml de agua estéril, fría, a 5.000 Xg durante 2 min a 4 °C en un rotor de cubeta giratoria en la centrifuga de sobremesa. Se retiró el agua con un aspirador de vacío. Los sedimentos se almacenaron a -80 °C. Se prepararon lisados y se realizaron ensayos de enzimas TMA29 como se describe.

La actividad específica de los lisados de GEVO6444 de *S. pombe* para la reducción de (S)-2-acetolactato fue de 0,018 $\pm$ 0,002 U/mg de proteína total. Los lisados de la cepa GEVO6445 de *tma29* Δ tenían una actividad específica de 0,001 $\pm$ 0,002 U/mg de proteína total.

Ejemplo 24: Efecto de la delección de *ALD6* en *K. marxianus*

El fin de este ejemplo es demostrar que la delección de *ALD6* en una cepa de *Kluyveromyces marxianus* produce una reducción de la actividad de oxidación del isobutiraldehído y de la producción de isobutirato.

Las cepas, los plásmidos y los cebadores oligonucleotídicos desvelados en este ejemplo se enumeran en las Tablas 73, 74 y 75, respectivamente.

Tabla 73. Genotipo de cepas de *K. marxianus* desveladas en el Ejemplo 24.

Número GEVO	Genotipo
GEVO1947	<i>ura3-delta2</i>
GEVO6264, GEVO6265	<i>ura3-delta2 ald6Δ::P_{TEF1}-hph</i>
GEVO2087	<i>ura3-delta2, PDC1, P_{Sc_PDC1}:31COX4 MTS:alsS:P_{Sc_TDH3}:kivD co HMI1 MTS:P_{Sc_ADH1}:ADH7:P_{Sc_FBA1}:URA3</i>
GEVO6270 GEVO6271	<i>ura3-delta2, PDC1, P_{Sc_PDC1}:31COX4 MTS:alsS:P_{Sc_TDH3}:kivD co HMI1 MTS:P_{Sc_ADH1}:ADH7:P_{Sc_URA1}:URA3 ald6Δ::P_{TEF1}-hph</i>

Tabla 74. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 24.

Nombre del plásmido	Genes relevantes/Uso	Genotipo
pGV2701	Para que la PCR de SOE dé el fragmento de <i>hph</i>	<i>P_{TEF1}, hph, CEN, pUC ori, bla</i>

Tabla 75. Secuencias oligonucleotídicas desveladas en el Ejemplo 24.

Cebador	Secuencia
oGV3490	GTCAAGATTGTTGAACAAAAGCC (SEQ ID NO: 162)
oGV3492	GAGTAAAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGGTTTAGTGGGGTTGGGGAA GCTGGC (SEQ ID NO: 163)
oGV3493	CAAATTTTCTTTTTTCTGTACAGGCCAACATCAAGAAGACTATTCCAACTTG GTC (SEQ ID NO: 164)
oGV3495	TGTATGATTGAAAGCTTCTTCACC (SEQ ID NO: 165)
oGV3491	GCCAGCTTCCCCAACCCCACTAAACCATAGCTTCAAAATGTTTCTACTCCTTTTT TACTC (SEQ ID NO: 166)
oGV3494	GACCAAGTTTGAATAGTCTTCTTGATGTTGGCCTGTACAGAAAAAAGAAAAA TTTG (SEQ ID NO: 167)
oGV3497	TTACTCGAGCTTGATTCTGAC (SEQ ID NO: 168)
oGV2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG (SEQ ID NO: 169)
oGV3496	ATGTCTTCATCACTAGCAGAG (SEQ ID NO: 170)
oGV0821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG (SEQ ID NO: 171)
oGV0706	GGTTGGTATTCCAGCTGGTGTGCG (SEQ ID NO: 172)

Construcción de cepas: Se eliminó el homólogo del gen *ALD6* de *K. marxianus* codificante de la proteína *ALD6* de *K. marxianus* (SEQ ID NO: 39) de las cepas parentales de *K. marxianus* GEVO1947 y GEVO2087 de la manera siguiente, produciendo las cepas GEVO6264/GEVO6265 y GEVO6270/GEVO6271 respectivamente.

El ADN genómico se aisló de GEVO1947 como se describe. Se realizaron construcciones para integrar el casete de *hph* de *E. coli* (resistencia a la higromicina) en el locus *ALD6* de GEVO1947 y GEVO2087 mediante PCR de SOE como se describe. La etapa n.º 1 de la PCR consistió en tres reacciones: la secuencia de dirección a *ALD6* de 5', la secuencia de dirección a *ALD6* de 3' y el marcador *hph*. La secuencia de dirección de 5' se amplificó a partir del ADN genómico de GEVO1947 preparado con los cebadores oGV3490 y oGV3492. El fragmento de 635 pb se purificó por electroforesis en gel. La secuencia de dirección de 3' se amplificó a partir del ADN genómico de GEVO1947 preparado con los cebadores oGV3493 y oGV3495. El fragmento de 645 pb se purificó en gel. El casete $P_{TEF1}::hph.T_{CYC1(partial)}$ se amplificó a partir de pGV2701 con los cebadores oGV3491 y oGV3494. El fragmento de 1.665 pb se purificó en gel. La etapa final de la PCR de SOE unió los 3 productos de la etapa n.º 1 (secuencia de dirección a *ALD6* de 5'/marcador de *hph*/secuencia de dirección a *ALD6* de 3'). La reacción se amplificó usando los cebadores oGV3490 y oGV3495. El fragmento de 2.826 pb se purificó en gel y se usó para las transformaciones de GEVO1947 y GEVO2087 como se describe. El medio usado para cultivar las células para la transformación fue YPD. Tras la transformación, se dispersaron 150 µl de cada cultivo de transformación en placas de YPD complementadas con higromicina a 0,2 g/l. Las placas se incubaron a 30 °C. Las colonias transformadas se parchearon para la selección mediante PCR de colonias inicial, luego se aisló una colonia individual y se volvió a parchear en placas de YPD complementadas con higromicina a 0,2 g/l.

Se usó la PCR de colonias de levadura para detectar la unión de integración adecuada de 3', la unión de integración de 5', así como la falta de la región de codificación de *ALD6* como se describe. La unión de integración de 3' correcta se confirmó usando los cebadores oGV3497 y oGV2320. La unión de integración de 5' correcta se confirmó usando los cebadores oGV3496 y oGV0821. Finalmente, la delección de la región de codificación interna de *ALD6* se confirmó usando los cebadores oGV3495 y oGV0706.

Fermentación: Se realizó una fermentación en matraz de agitación con isobutiraldehído a 2 g/l como se describe usando triplicados técnicos de las cepas de *ald6Δ* GEVO6264/GEVO6265 y GEVO6270/GEVO6271, y sus correspondientes cepas parentales de *ALD6* GEVO1947 y GEVO2087.

Se parchearon transformantes aislados de una sola colonia de cepas de *ald6Δ* confirmadas en placas de YPD complementadas con placas de higromicina a 0,2 g/l, y las parentales se parchearon en placas de YPD. Se usaron células de los parches para inocular cultivos por triplicado técnico de 3 ml de YPD. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Tras la incubación nocturna, se determinó la DO_{600} de estos cultivos diluyendo 1:40 en agua. Se añadió la cantidad apropiada de cultivo a 50 ml de YPD con glucosa al 5 % para obtener una DO_{600} de 0,1 en matraces de 250 ml con tabique deflector, y se incubaron los cultivos a 30 °C y 250 rpm. Tras una incubación de 24 h, se determinó la DO_{600} de estos cultivos diluyendo 1:40 en agua. Se añadió la cantidad apropiada de cultivo a 50 ml de YPD que contenía glucosa al 8 %, MES 200 mM, pH 6,5, e isobutiraldehído a 2 g/l, obteniéndose una DO_{600} de 5. Los cultivos de fermentación se incubaron a 30 °C y 75 rpm en matraces de 250 ml sin tabique deflector. Los medios no usados se recogieron como un blanco de medios para el análisis de LC y se mantuvieron a 4 °C hasta el envío de la muestra. A las 48 h, se tomaron muestras de cada uno de los matraces de la siguiente manera. Se retiraron 1,5 ml de cultivo en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se determinaron los valores de DO_{600} y se prepararon muestras para el análisis de LC1. Cada tubo se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm, y el sobrenadante se analizó mediante LC1. Además, se recogieron muestras para los ensayos enzimáticos tras 48 h. Se transfirieron 80 µl de la muestra apropiada a dos tubos Falcon de 15 ml (para muestras por duplicado) y se centrifugaron a 3.000 X g durante 5 min a 4 °C. Se volvieron a suspender los sedimentos en 3 ml agua estéril, fría, y se centrifugaron a 5.000 X g durante 2 min a 4 °C en un rotor de cubeta giratoria. Se retiró el agua con un aspirador de vacío. Los tubos cónicos se almacenaron a -80 °C.

La Tabla 76 muestra el título del isobutirato tras 48 h de fermentación. La cepa de *ALD6* parental GEVO1947 produjo una media de títulos de isobutirato total y específico de 0,19 g/l y 0,013 g/l/DO, respectivamente. Estos títulos de isobutirato total y específico disminuyeron significativamente en la cepa de *ald6Δ* GEVO6264 (0,06 g/l y 0,004 g/l/DO, respectivamente), y también en la cepa de *ald6Δ* GEVO6265 (0,05 g/l y 0,003 g/l/DO, respectivamente). La cepa de *ALD6* GEVO2087 produjo títulos de isobutirato total y específico de 0,15 g/l y 0,008 g/l/DO, respectivamente. Los títulos de isobutirato total y específico disminuyeron significativamente en la cepa de *ald6Δ* GEVO6270 (0,05 g/l y 0,003 g/l/DO), y también en la cepa de *ald6Δ* GEVO6271 (0,08 g/l y 0,005 g/l/DO, respectivamente).

Tabla 76. Producción de isobutirato de cepas parentales de *ALD6* y cepas de *ald6Δ* derivadas de dichas cepas parentales de *ALD6*.

Cepa	Cepa parental	ALD6	Fermentación con suministro de isobutiraldehído (48 h)	
			Título de isobutirato (g/l)	Reducción del isobutirato (%)
GEVO1947		+	0,19 ± 0,05	
GEVO6264	GEVO1947	-	0,06 ± 0,02	68 %

(continuación)

Cepa	Cepa parental	ALD6	Fermentación con suministro de isobutiraldehído (48 h)	
			Título de isobutirato (g/l)	Reducción del isobutirato (%)
GEVO6265	GEVO1947	-	0,05 ± 0,02	74 %
GEVO2087		+	0,15 ± 0,03	
GEVO6270	GEVO2087	-	0,05 ± 0,03	67 %
GEVO6271	GEVO2087	-	0,08 ± 0,02	47 %

Ejemplo 25: Efecto de la delección de ALD6 en *K. lactis*

El fin de este ejemplo es demostrar que la delección de *ALD6* en una cepa de *Kluyveromyces lactis* reduce la actividad de oxidación del isobutiraldehído y la producción de isobutirato.

Las cepas, los plásmidos y los cebadores oligonucleotídicos que se desvelan en este ejemplo se enumeran en las Tablas 77, 78 y 79, respectivamente.

Tabla 77. Genotipo de cepas de *K. lactis* desveladas en el Ejemplo 25.

Número GEVO	Genotipo
GEVO1287	<i>MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8</i> [pKD1], <i>Kluyveromyces lactis</i> (Dombrowski) van der Walt, teleomorfo, ATCC 200826
GEVO6242	<i>MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 adel lac4-8</i> [pKD1] <i>ald6Δ::P_{TEF1}-hph</i>
GEVO1830	<i>MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8</i> [pKD1] <i>pdcl::kan:Ec_ilvC_AN:EcJlvDΔN_coKI::Sc-LEU2 integrado</i> { <i>LI_kivD;Sc_Adh7:Km_URA3 integrado aleatoriamente</i> } { <i>P_{Sc_CUP1-1}:Bs_alsS:TRP1 integrado aleatoriamente</i> }
GEVO6244, GEVO6245	<i>MATa uraA1 trp1 leu2 lysA1 ade1 lac4-8</i> [pKD1] <i>pdcl::kan:Ec_ilvC_AN:Ec_ilvDΔN_coKI::Sc-LEU2 integrado</i> { <i>LI_kivD;Sc_Adh7:Km_URA3 integrado</i> } { <i>P_{Sc_CUP1-1}:Bs_alsS:TRP1 integrado aleatoriamente</i> } <i>ald6Δ::P_{TEF1}-hph</i>

Table 78. Plásmidos desvelados en el Ejemplo 25.

Nombre del plásmido	Genotipo
pGV2701	<i>P_{TEF1}:hph, CEN, pUC ori, bla</i>

Tabla 79. Secuencias oligonucleotídicas desveladas en el Ejemplo 25.

Cebador	Secuencia
oGV3502	GAAACACAGTGGATTAGTGCTGTC (SEQ ID NO: 173)
oGV3504	GAAGAGTAAAAAAGGAGTAGAAACATTTTGAAGCTATGCTCTTTGTAATTGTTGTTGGTG (SEQ ID NO: 174)
oGV3505	CAAATTTTCTTTTTTTCTGTACAAACAGAGTCCATCCGTTTGAAACTGATTGCATGTC (SEQ ID NO: 175)
oGV3507	TCAAATTCTATTATCGCGCGGG (SEQ ID NO: 176)
oGV3503	CACCAACAACAATTACAAAGAGCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTTACTCTTC (SEQ ID NO: 177)

(continuación)

Cebador	Secuencia
oGV3506	GACATGCAATCAGTTTCAAACGGATGGACTCTGTTTGTACAGAAAAAAGAAAA ATTTG (SEQ ID NO: 178)
oGV3509	CTCCTCCGTTGCAGAACAAAGGCTTTG (SEQ ID NO: 179)
oGV2320	GGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG (SEQ ID NO: 180)
oGV3508	CGGTGTTAAGTGCCAGAAATTGGTTG (SEQ ID NO: 181)
oGV0821	CGGGTAATTAACGACACCCTAGAGG (SEQ ID NO: 182)
oGV3510	CGGCGTACTCGACGTCTTGAGAAGTAG (SEQ ID NO: 183)

Construcción de cepas: Se eliminó el homólogo del gen *ALD6* de *K. lactis* que codifica la proteína ALD6 de *K. lactis* (SEQ ID NO: 29) de las cepas parentales de *K. lactis* GEVO1287 y GEVO1830 de la siguiente manera, dando lugar a las cepas GEVO6242 y GEVO6244/GEVO6245, respectivamente.

5 El ADN genómico se aisló de GEVO1287 como se describe. Se realizaron construcciones para integrar el casete de *hph* de *E. coli* (resistencia a la higromicina) en el locus *ALD6* de GEVO1287 y GEVO1830 mediante PCR de SOE como se describe. La etapa n.º 1 de la PCR consistió en tres reacciones: la secuencia de dirección a *ALD6* de 5', la secuencia de dirección a *ALD6* de 3' y el marcador *hph*. La secuencia de dirección de 5' se amplificó a partir del ADN genómico de GEVO1287 preparado con los cebadores oGV3502 y oGV3504. El fragmento de 639 pb se purificó por electroforesis en gel. La secuencia de dirección de 3' se amplificó a partir del ADN genómico de GEVO1287 preparado con los cebadores oGV3505 y oGV3507. El fragmento de 628 pb se purificó en gel. El casete P_{TEF1}:*hph*:T_{CYC1}(*parcial*) se amplificó a partir de pGV2701 con los cebadores oGV3503 y oGV3506. El fragmento de 1.663 pb se purificó en gel. La etapa final de la PCR de SOE unió los 3 productos de la etapa n.º 1 (secuencia de dirección 5'/marcador de *hph*/secuencia de dirección 3'). La reacción se amplificó usando los cebadores oGV3502 y oGV3507. El fragmento de 2.810 pb se purificó en gel y se usó para las transformaciones de GEVO1287 y GEVO1830 como se describe. Se seleccionaron colonias para la resistencia a la higromicina en placas de YPD complementadas con higromicina a 0,1 g/l. Se usó la PCR de colonias de levadura para detectar la unión de integración adecuada de 3', la unión de integración de 5', así como la falta de la región de codificación de *ALD6* como se describe. La unión de integración de 3' correcta se confirmó usando los cebadores oGV3509 y oGV2320. La unión de integración de 5' correcta se confirmó usando los cebadores oGV3508 y oGV0821. Finalmente, la delección de la región de codificación interna de *ALD6* se confirmó usando los cebadores oGV3508 y oGV3510.

25 **Fermentación:** Se realizó una primera fermentación en matraz de agitación con isobutiraldehído a 2 g/l en el medio usando triplicados técnicos de la cepa GEVO6242 de *ald6Δ* y la cepa parental GEVO1287 de *ALD6*. Se parchearon transformantes aislados de una sola colonia de cepas de delección de *ald6Δ* confirmadas en placas de YPD complementadas con placas de higromicina a 0,1 g/l, las cepas parentales se parchearon en YPD. Se usaron células de los parches para inocular cultivos por triplicado técnico de 3 ml de YPD. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Tras la incubación nocturna, se determinó la DO₆₀₀ de estos cultivos diluyendo 1:40 en agua. Se añadió la cantidad apropiada de cultivo a 50 ml de YPD con glucosa al 5 % para obtener una DO₆₀₀ de 0,1 en matraces de 250 ml con tabique deflector, y se incubaron los cultivos a 30 °C y 250 rpm. Tras una incubación de 24 h, se determinó la DO₆₀₀ de estos cultivos diluyendo 1:40 en agua. Se añadió la cantidad apropiada de cultivo a 50 ml de YPD que contenía glucosa al 8 %, MES 200 mM, pH 6,5, e isobutiraldehído a 2 g/l, obteniéndose una DO₆₀₀ de 5. Los cultivos de fermentación se incubaron a 30 °C y 75 rpm en matraces de 250 ml sin tabique deflector. Los medios no usados se recogieron como un blanco de medios para el análisis de LC1 y se mantuvieron a 4 °C hasta la presentación de la muestra. A las 24 h, se tomaron muestras de cada uno de los matraces de la siguiente manera. Se retiraron 1,5 ml de cultivo en tubos Eppendorf de 1,5 ml. Se determinaron los valores de DO₆₀₀ y se prepararon muestras para el análisis de LC1 como se describe. Se centrifugó cada tubo durante 10 min a 14.000 rpm y el sobrenadante se recogió para su análisis mediante LC1 como se describe.

40 Se realizó una segunda fermentación en matraz de agitación con isobutiraldehído a 2 g/l como se describe usando las cepas de delección de *ald6Δ* GEVO6244/GEVO6245 y su correspondiente cepa parental de *ALD6* GEVO1830. Esta fermentación se muestreó a las 24 y 48 h como se describe. La Tabla 80 muestra el título de isobutirato para ambas fermentaciones. Los títulos de isobutirato disminuyeron significativamente en las cepas de *ald6Δ* en comparación con las cepas parentales de *ALD6*.

Tabla 80. Producción de isobutirato de cepas parentales de *ALD6* y cepas de *ald6Δ* derivadas de dichas cepas parentales de *ALD6*.

Cepa	Fermentación con suministro de isobutiraldehído (24 h)		Fermentación con suministro de isobutiraldehído (48 h)	
	Título de isobutirato (g/l)	Reducción del isobutirato (%)	Título de isobutirato (g/l)	Reducción del isobutirato (%)
GEVO1287	0,19 ± 0,03		n.d.	n.d.
GEVO6242	0,12 ± 0,02	36,8 %	n.d.	n.d.
GEVO1830	0,16 ± 0,00		0,12 ± 0,01	
GEVO6244	0,06 ± 0,02	62,5 %	0,04 ± 0,01	66,7
GEVO6245	0,07 ± 0,00	56,3 %	0,00 ± 0,00	≥ 79,2*
n.d. = no determinado en este experimento				
*basado en LOQ para el isobutirato de 0,025 g/l				

Ejemplo 26: Actividad de TMA29 hacia el 2-aceto-2-hidroxitirato

El siguiente ejemplo ilustra que la proteína TMA29 de *S. cerevisiae* es activa hacia el (S)-2-acetolactato ((S)-AL) y el 2-aceto-2-hidroxitirato (AHB).

Tabla 81. Genotipo de las cepas desveladas en el Ejemplo 26.

GEVO n.º	Genotipo	Origen
GEVO3527	<i>MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i>	ATCC n.º 201389 (BY4742)
GEVO3939	<i>MATα his3Δ-1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ tma29::kan^R</i>	OpenBiosystems cat n.º YSC1054 (colección de Yeast MATα)

Se cultivaron cepas de levadura GEVO3939 de las que se eliminó el gen *TMA29* (YMR226C) y su GEVO3527 parental cada una por triplicado inoculando 3 ml de YPD en un tubo de cultivo de 14 ml por triplicado para cada cepa. Los cultivos se iniciaron a partir de parches en placa de agar YPD para GEVO3527 y en placas de YPD que contenían G418 a 0,2 g/l para GEVO3939. Los cultivos se incubaron durante la noche a 30 °C y 250 rpm. Al día siguiente, se midió la DO₆₀₀ de los cultivos durante la noche y se calculó el volumen de cada cultivo para inocular un cultivo de 50 ml a una DO₆₀₀ de 0,1. Se usó el volumen calculado de cada cultivo para inocular 50 ml de YPD en un matraz con tabique deflector de 250 ml, y los cultivos se incubaron a 30 °C y 250 rpm.

Se recogieron las células durante la fase logarítmica media a DO de 2,2-2,7 tras 8 h de crecimiento. Se transfirieron los cultivos a tubos Falcon de 50 ml previamente pesados y se recogieron las células mediante centrifugación durante 5 minutos a 3000 x g. Tras la eliminación del medio, las células se lavaron con 10 ml de H₂O MilliQ. Tras la eliminación del agua, se centrifugaron las células de nuevo a 3.000 x g durante 5 minutos y se retiró el agua restante cuidadosamente usando una punta de pipeta de 1 ml. Los sedimentos celulares se pesaron y luego se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

Los sedimentos celulares se descongelaron en hielo y se volvieron a suspender en tampón de lisis (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, ditiotritol 1 mM, glicerol al 5 % p/v), de modo que el resultado fue una suspensión celular del 20 % en masa. Se añadió 1 ml de perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro) a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para cada muestra y se añadieron 850 µl de suspensión celular. Las células de levadura se lisaron usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a velocidad completa con 1 min de incubación en hielo entre medias. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 21.500 xg a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Los extractos se mantuvieron en hielo hasta que se analizaron usando el ensayo de TMA29 como se describe para determinar la actividad de TMA29 hacia (R/S)-AHB y (R/S)-AL.

La actividad específica de TMA29 de *S. cerevisiae* en lisados GEVO3527, una cepa de tipo silvestre MATα de *S. cerevisiae*, para la reducción de (R/S)-AHB fue de 10,5 ± 0,6 mU/mg. La cepa de *tma29Δ* GEVO3939 tenía una actividad específica de 4,8 ± 0,1 mU/mg. La cepa GEVO3527 de tipo silvestre tenía una actividad de TMA29 específica aproximadamente 2 veces más alta que la cepa de eliminación.

La actividad específica de TMA29 de *S. cerevisiae* en lisados GEVO3527, una cepa de tipo silvestre MATα de *S. cerevisiae*, para la reducción de (R/S)-AL fue de 12,3 ± 0,2 mU/mg. La cepa con *tma29Δ* GEVO3939 tenía una actividad específica de 2,9 ± 0,3 mU/mg. La cepa GEVO3527 de tipo silvestre tenía una actividad de TMA29 específica aproximadamente 4 veces más alta que la cepa de eliminación.

Métodos generales para los Ejemplos 27-30

Las cepas, los plásmidos, las secuencias de genes/aminoácidos y las secuencias de cebadores descritas en los Ejemplos 27-30 se enumeran en las Tablas 82, 83, 84 y 85, respectivamente.

Tabla 82. Genotipo de cepas desveladas en el Ejemplo 27-30.

Genotipo o referencia
BL21 de <i>E. coli</i> (DE3) (Lucigen Corporation, Middleton, WI)
DH5α de <i>E. coli</i> (Novagen, Gibbstown, NJ)
CEN.PK2 de <i>S. cerevisiae</i> (Euroscarf, Frankfurt, Alemania)

Tabla 83. Plásmidos desvelados en los Ejemplos 27-30.

GEVO n.º	Genotipo o referencia
pET22(b)+	Novagen, Gibbstown, NJ
pGV1102	<i>P_{Sc_TEF1}-HA-tag-MCS-T_{CYC1}, URA3, 2-micrómetros, bla, pUC-ori</i>
pGV1662	<i>P_{Sc_TEF1}-L. lactis kivD-T_{Sc_CYC1}, bla, ColE1 ori, URA3, 2 μ ori.</i>
pGV1947	<i>P_{Sc_TEF1}-LI_adhA-T_{Sc_CYC1} bla URA3 pMB1 ori 2 μ ori</i>
pGV1947his	<i>P_{Sc_TEF1}-LI_adhA^{his6}-T_{Sc_CYC1} bla URA3 pMB1 ori 2 μ ori</i>
pET1947	<i>P_{T7}::LI_adhA^{his6}, bla, oripBR322, lacI</i>
pGV2274	Vector de clonación que contiene la secuencia de <i>LI_adhA_coSc</i> (sintetizada mediante DNA2.0, Menlo Park, CA)
pGV2475	<i>P_{Sc_TEF1}-LI_adhA_coSc^{28E7-his6}-T_{Sc_CYC1}, bla, URA3, pMB1 ori, 2 μ ori</i>
pGV2476	<i>P_{Sc_TEF1}-LI_adhA_coSc^{his6}-T_{Sc_CYC1}, bla, URA3, pMB1 ori, 2 μ ori</i>
pGV2477	<i>P_{Sc_TEF1}-LI_adhA_coSc^{RE1-his6}-T_{Sc_CYC1}, bla, URA3, pMB1 ori, 2 μ ori</i>
pGV30C11	<i>P_{Sc_TEF1}-LI_adhA_coSc^{30C11-his6}-T_{Sc_CYC1}, bla, URA3, pMB1 ori, 2 μ ori</i>

Tabla 84. Secuencias de ácidos nucleicos y proteínas desveladas en los Ejemplos 27-30.

Origen	Gen (SEQ ID NO)	Proteína(SEQ ID NO)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA</i> (SEQ ID NO: 184)	LI_AdhA (SEQ ID NO: 185)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc^{his6}</i> (SEQ ID NO: 186)	LI_AdhA ^{his6} (SEQ ID NO: 187)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc^{28E7-his6}</i> (SEQ ID NO: 188)	LI_AdhA ^{28E7-his6} (SEQ ID NO: 189)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc^{30C11-his6}</i> (SEQ ID NO: 190)	LI_AdhA ^{30C11-his6} (SEQ ID NO: 191)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc^{RE1-his6}</i> (SEQ ID NO: 192)	LI_AdhA ^{RE1-his6} (SEQ ID NO: 193)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc^{7A4-his6}</i> (SEQ ID NO: 194)	LI_AdhA ^{7A4-his6} (SEQ ID NO: 195)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc^{4A3-his6}</i> (SEQ ID NO: 196)	LI_AdhA ^{4A3-his6} (SEQ ID NO: 197)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA^{1H7-his6}</i> (SEQ ID NO: 198)	LI_AdhA ^{1H7-his6} (SEQ ID NO: 199)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA^{10F10-his6}</i> (SEQ ID NO: 200)	LI_AdhA ^{10F10-his6} (SEQ ID NO: 201)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA^{8F11-his6}</i> (SEQ ID NO: 202)	LI_AdhA ^{8F11-his6} (SEQ ID NO: 203)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA^{8D10-his6}</i> (SEQ ID NO: 204)	LI_AdhA ^{8D10-his6} (SEQ ID NO: 205)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc</i> (SEQ ID NO: 206)	LI_AdhA (SEQ ID NO: 185)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc^{28E7}</i> (SEQ ID NO: 207)	LI_AdhA ^{28E7} (SEQ ID NO: 208)

(continuación)

Origen	Gen (SEQ ID NO)	Proteína(SEQ ID NO)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc</i> ^{30C11} (SEQ ID NO: 209)	LI_AdhA ^{30C11} (SEQ ID NO: 210)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc</i> ^{RE1} (SEQ ID NO: 211)	LI_AdhA ^{RE1} (SEQ ID NO: 212)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc</i> ^{7A4} (SEQ ID NO: 213)	LI_AdhA ^{7A4} (SEQ ID NO: 214)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA_coSc</i> ^{4A3} (SEQ ID NO: 215)	LI_AdhA ^{4A3} (SEQ ID NO: 216)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA</i> ^{1H7} (SEQ ID NO: 217)	LI_AdhA ^{1H7} (SEQ ID NO: 218)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA</i> ^{10F10} (SEQ ID NO: 219)	LI_AdhA ^{10F10} (SEQ ID NO: 220)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA</i> ^{8F11} (SEQ ID NO: 221)	LI_AdhA ^{8F11} (SEQ ID NO: 222)
<i>L. lactis</i>	<i>LI_adhA</i> ^{8D10} (SEQ ID NO: 223)	LI_AdhA ^{8D10} (SEQ ID NO: 224)

Tabla 85. Secuencias de cebadores (mostradas de 5' a 3') desveladas en los Ejemplos 27-30.

Nombre del cebador	Secuencia*
XX7	GGAGAAAACCCATATGTCGTTTAC (SEQ ID NO: 225)
XX9	GCAGCCGAACGCTCGAGGGCGGCCG (SEQ ID NO: 226)
His_Not1_1947_rev	CTCGAGCGGCCGCTTAGTG GTGGTGGTGGTGGTGGTGT TAGTAA ATCAA (SEQ ID NO: 227)
Sal1_for	GAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGTT (SEQ ID NO: 228)
adhAcoSc_Sallin_for	GTTTGTG CACATGAAGGCTGCAGTTGTCCGT (SEQ ID NO: 229)
adhAcoSC_Notlin_his_rev	TCGAGCGGCCGCTTAGTG GTGGTGGTGGTGGTGGT GCTTCGTGAAG TCTATAACCATTCTACC (SEQ ID NO: 230)
pGV1994ep_for	CGGTCTTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGT TCTATT ACAAC (SEQ ID NO: 231)
pGV1994ep_rev	CTAACTCCTTCCTTTTCGGTTAGAGCGGATGTGGG (SEQ ID NO: 232)
RecombADHY50_for	TGCTGCCG GAGATTWCGGCAACAAGGCAGG (SEQ ID NO: 233)
RecombADHY50_rev	CCTGCCTTGTTGCCGWAATCTCCGGCAGCA (SEQ ID NO: 234)
RecombADHL264_for	ATGGTAGCCGTTGCTKTACCAAACACAGAA (SEQ ID NO: 235)
RecombADHL264_rev	TTCTGTGTTTGGTAMAGCAACGGCTACCAT (SEQ ID NO: 236)
RecombADHI212_Y219_for	GCTGATGTCAYAATTA ACTCTGGTGACGTTWACCCTGTAG (SEQ ID NO: 237)
RecombADHI212Y219_rev	CTACAGGGTWAACGTCACCAGAGTTAATTRTGACATCAGC(SEQ ID NO: 238)
NNKADHF50_for	TGCTGCCG GAGATNNKGGCAACAAG (SEQ ID NO: 239)
NNKADHF50_rev	GCCTTGTTGCCMNNATCTCCGGCAG (SEQ ID NO: 240)
NNKADHR77_for	GTTAGTTCTCTCNNKG TAGGTGATAG (SEQ ID NO: 241)
NNKADHR77_rev	CACTCTATCACCTACMNNGAGAGAAC (SEQ ID NO: 242)
NNKADHA108_for	ACATTTTGCCGAGAANNKAAAAACGC (SEQ ID NO: 243)
NNKADHA108_rev	ACCAGCGTTTTT MNNTTCTCGGCAAA (SEQ ID NO: 244)
NNKADHF113_for	GTCAAAAACGCTGGTN NKAGCGTTGA (SEQ ID NO: 245)
NNKADHF113_rev	ACCATCAACGCTMNN ACCAGCGTTTT (SEQ ID NO: 246)
NNKADHT212_for	AGATAGGTGCTGATG TCNNKATTAAC (SEQ ID NO: 247)

(continuación)

Nombre del cebador	Secuencia*
NNKADHT212_rev	CAGAGTTAATMNNACATCAGCACCT (SEQ ID NO: 248)
NNKADHV264_for	GGTAGCCGTTGCTNNKCCAAACACAG (SEQ ID NO: 249)
NNKADHV264_rev	ATTTCTGTGTTTGMNNAGCAACGGC (SEQ ID NO: 250)
Recomb2F50Minilib_for	GTTGCAGCAGGTGATTDKGGCAACAAAGCA (SEQ ID NO: 251)
Recomb2F50Minilib_rev	TGCTTTGTTGCCMHAATCACCTGCTGCAAC (SEQ ID NO: 252)
Recomb2Q77Gen5_for3	TGATGTAAGCTCGCTTCAAGTTGGTGATCG (SEQ ID NO: 253)
Recomb2Q77Gen5_rev4	CGATCACCAACTTGAAGCGAGCTTACATCA (SEQ ID NO: 254)
Recomb2R77Gen5_for5	TGATGTAAGCTCGCTTCGAGTTGGTGATCG (SEQ ID NO: 255)
Recomb2R77Gen5_rev6	CGATCACCAACTCGAAGCGAGCTTACATCA (SEQ ID NO: 256)
Recomb2S77Gen5_for7	TGATGTAAGCTCGCTTTCTGTTGGTGATCG (SEQ ID NO: 257)
Recomb2S77Gen5_rev8	CGATCACCAACAGAAAGCGAGCTTACATCA (SEQ ID NO: 258)
Recomb2Y113 Gen5_for9	TTAAAAATGCAGGATATTCAGTTGATGGCG (SEQ ID NO: 259)
Recomb2Y113 Gen5_rev10	CGCCATCAACTGAATATCCTGCATTTTTAA (SEQ ID NO: 260)
Recomb2F113 Gen5_for11	TTAAAAATGCAGGATTTTCAGTTGATGGCG (SEQ ID NO: 261)
Recomb2F113 Gen5_rev12	CGCCATCAACTGAAAATCCTGCATTTTTAA (SEQ ID NO: 262)
Recomb2G113 Gen5_for13	TTAAAAATGCAGGAGGGTCAGTTGATGGCG (SEQ ID NO: 263)
Recomb2G113 Gen5_rev14	CGCCATCAACTGACCCTCCTGCATTTTTAA (SEQ ID NO: 264)
Recomb2T212 mini_for15	GAGCTGATGTGRYAATCAATTCTGGTGATG (SEQ ID NO: 265)
Recomb2T212 mini_rev16	CATCACCAGAATTGATTRYCACATCAGCTC (SEQ ID NO: 266)
Recomb2V264 mini_for17	TGGTTGCTGTGGCAKTACCCAATACTGAGA (SEQ ID NO: 267)
Recomb2V264 mini_rev18	TCTCAGTATTGGGTAMTGCCACAGCAACCA (SEQ ID NO: 268)
* A (Adenina), G (Guanina), C (Citosina), T (Timina), U (Uracilo), R (Purina - A o G), Y (Pirimidina - C o T), N (cualquier nucleótido), W (Débil - A o T), S (Fuerte - G o C), M (Amino - A o C), K (Ceto - G o T), B (No A - G o C o T), H (No G - A o C o T), D (No C - A o G o T) y V (No T - A o G o C)	

Medios y tampones:

- 5 SC-URA: Base nitrogenada de levadura Difco™ Yeast Nitrogen Base a 6,7 g/l, complemento de medios sintéticos de pérdida alélica Sigma™ Synthetic Dropout Media a 14 g/l (incluye aminoácidos y nutrientes, excluyendo histidina, triptófano y leucina), casaminoácidos a 10 g/l, glucosa a 20 g/l, adenina hemisulfato a 0,018 g/l y triptófano a 0,076 g/l.

- 10 SD-URA: Disponible en el mercado en MP Biomedicals (Irvine, CA). Composición: base nitrogenada de levadura a 1,7 g/l (YNB), sulfato de amonio a 5 g/l, glucosa a 20 g/l, con casaminoácidos sin uracil CSM-URA.

Medios de YPD (dextrosa de peptona de levadura): extracto de levadura a 10 g/l, peptona a 20 g/l, glucosa a 20 g/l.

Tris-TDT: 0,39 g de 1,4-ditiotreitól por cada 1 ml de TrisHCl 1 M, pH 8,0, esterilizado por filtración.

- 15 Tampón A: Tris 20 mM, imidazol 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, ajustado a pH 7,4, esterilizado por filtración.

Tampón B: Tris 20 mM, Imidazol 300 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, ajustado a pH 7,4, esterilizado por filtración.

- 20 Tampón E: 1,2 g de base de Tris, 92,4 g de glucosa y 0,2 g de MgCl₂ por cada litro de agua desionizada, ajustado a pH 7,5, esterilizado por filtración.

Construcción de pET1947: El gen *adhA* de *L. lactis* (LI_adiA) se clonó a partir de pGV1947 usando los cebadores His_Not1_1947_fwd y Sal1_rev, y se ligó en pET22b(+), dando el plásmido pET1947.

Construcción de pGV2476: El plásmido pGV2274 sirvió como plantilla para la PCR usando el cebador directo adhAcoSc_Sallin_for y el cebador inverso adhAcoSC_Notlin_his_rev. El producto de la PCR se purificó. Se digirió con enzimas de restricción *NotI* y *Sall*, y se ligó en pGV1662, que se había cortado con *NotI* y *Sall*, y se purificó.

5 Transformación de *S. cerevisiae*: Por la tarde, antes de una transformación planificada, se inoculó un cultivo de YPD con una única colonia CEN.PK2 de *S. cerevisiae* y se incubó a 30 °C y 250 rpm durante la noche. A la mañana siguiente, se inició un cultivo de 20 ml de YPD en un matraz Erlenmeyer de 250 ml sin tabique deflector con el cultivo de la noche a una DO₆₀₀ de 0,1. Este cultivo se incubó a 30 °C y 250 rpm hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 1,3 a 1,5.
10 Cuando el cultivo alcanzó la DO₆₀₀ deseada, se añadieron 200 µl de Tris-DTT, y se dejó incubar el cultivo a 30 °C y 250 rpm durante otros 15 minutos. Las células se sedimentaron a 4 °C y 2.500 xg durante 3 min. Tras retirar el sobrenadante, el sedimento se volvió a suspender en 10 ml de tampón E enfriado con hielo y se volvió a centrifugar como se ha descrito anteriormente. Después, se volvió a suspender el sedimento celular en 1 ml de tampón E enfriado con hielo y se centrifugó una vez más como antes. Tras la retirada del sobrenadante con una pipeta, se añadieron
15 200 µl de tampón E enfriado con hielo, y el sedimento se volvió a suspender suavemente. Los 6 µl de la mezcla de inserción/estructura principal se dividieron por la mitad y se añadieron a 50 µl de la suspensión celular. Se transfirieron las mezclas de ADN/células a cubetas de electroporación de 0,2 cm (BIORAD) y se sometieron a electroporación sin un controlador de pulso a 0,54 kV y 25 µF. Inmediatamente, se añadió 1 ml de YPD precalentado y se permitió que las células transformadas se regeneraran a 30 °C y 250 rpm en tubos de cultivo de fondo redondo de 15 ml (Falcon).
20 Después de 1 hora, las células se centrifugaron a 4 °C y 2.500 xg durante 3 minutos, y los sedimentos se volvieron a suspender en 1 ml de medio SD-URA precalentado. Se dispusieron diferentes cantidades de células transformadas en placas de SD-URA y se incubaron a 30 °C durante 1,5 días o hasta que las colonias fueran lo suficientemente grandes como para ser seleccionadas con palillos estériles.

25 Mini-preparación de plásmidos de células de levadura: Se usó el kit Zymoprep™ II -Miniprep de plásmidos de levadura (Zymo Research, Orange, CA) para preparar ADN plasmídico a partir de células de *S. cerevisiae* de acuerdo con el protocolo del fabricante para cultivos líquidos, que fue ligeramente modificado. Se centrifugó una parte alícuota de 200 µl de células de levadura a 600 xg durante 2 min. Tras decantar el sobrenadante, se añadieron 200 µl de Solución
30 1 para volver a suspender los sedimentos. A las muestras, se añadieron 3 µl de Zymolyase™ y se mezclaron suavemente las suspensiones de células/enzimas con el dedo. Tras incubar las muestras durante 1 hora a 37 °C, se añadieron las soluciones 2 y 3, y se mezclaron bien tras cada adición. Se centrifugaron las muestras a la velocidad máxima y 4 °C durante 10 min. La siguiente limpieza sobre columnas Zymo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN plasmídico se eluyó con 10 µl de agua de grado de PCR. Se usó la mitad de este volumen para transformar DH5α de *E. coli*.

35 Expresión de ADH heteróloga en *E. coli*: Se inocularon matraces (Erlenmeyer de 500 ml) que contenían 50 ml de medio Luria-Bertani (LB) (10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura por litro) con ampicilina (concentración final de 0,1 mg/ml) a una DO₆₀₀ inicial de 0,1 usando 0,5 ml de cultivo LB_{amp} durante la noche de una sola colonia portadora del plásmido pET1947. Se dejaron crecer los 50 ml de cultivo de expresión de LB durante 3-4 h
40 a 250 rpm y 37 °C. La expresión de la proteína se indujo a una DO₆₀₀ de aproximadamente 1 con la adición de IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Se permitió que la expresión de la proteína continuara durante 24 h a 225 rpm y 25 °C. Se recogieron las células a 5.300 xg y 4 °C durante 10 min, y luego se congelaron los sedimentos celulares a -20 °C hasta su uso posterior.

45 Expresión heteróloga en CEN.PK2 de *S. cerevisiae*: Se inocularon matraces (Erlenmeyer de 1.000 ml) llenos con 100 ml de SC-URA con 1 ml de cultivo durante la noche (5 ml de SC-URA inoculados con una sola colonia de CEN.PK2, cultivados a 30 °C y 250 rpm. Los cultivos de expresión se cultivaron a 30 °C y 250 rpm durante 24 horas. Las células se sedimentaron a 5.300 xg durante 5 min. El sobrenadante se desechó y los gránulos se volvieron a centrifugar. El sobrenadante residual se retiró con una pipeta. Los sedimentos se congelaron a -20 °C hasta su uso
50 posterior.

Expresión heteróloga en CEN.PK2 en placas de 96 pocillos para ensayos de alto rendimiento: Se inocularon placas poco profundas de 96 pocillos, 1 ml de capacidad por pocillo, llenos con 300 µl de SC-URA con colonias individuales de CEN.PK2 portadoras de plásmidos codificantes de LI_adhA^{his6} o sus variantes. Se inocularon placas profundas de
55 96 pocillos, 2 ml de capacidad por pocillo, llenos con 600 µl de SC-URA por pocillo con 50 µl de estos cultivos durante la noche. Las placas se cultivaron a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, y luego se recogieron a 5.300 xg durante 5 min y 4 °C, y se almacenaron a -20 °C.

Preparación de extractos que contenían ADH de *E. coli*: Se descongelaron sedimentos celulares de *E. coli* que contenían ADH expresada y se volvieron a suspender (0,25 g de peso húmedo/ml de tampón) en tampón A. Las células resuspendidas se lisaron por sonicación durante 1 min con un ciclo de trabajo del 50 % y se sedimentaron a
60 11.000 xg y 4 °C durante 10 minutos. Los extractos fueron almacenados a 4 °C.

Preparación de extractos que contenían ADH de CEN.PK2 de *S. cerevisiae*: Se descongelaron sedimentos celulares de CEN.PK2 de *S. cerevisiae* que contenían ADH expresada y se pesaron, obteniéndose el peso húmedo de los
65 sedimentos. Las células se volvieron a suspender luego en tampón A, de modo que el resultado fue una suspensión

de células al 20 % en masa. Se añadieron perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro hasta la marca de 1000 µl de (0,5 mm de diámetro) de un tubo Eppendorf de 1,5 ml, antes de añadirse 875 µl de suspensión celular. Se lisaron células de levadura mediante batido de perlas usando un molino mezclador Retsch MM301 (Retsch Inc. Newtown, PA), mezclando 6 veces durante 1 min cada vez a la velocidad máxima con etapas de 1 min de congelación entre medias. Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 23.500 xg y 4 °C, y se retiró el sobrenadante. Los extractos fueron almacenados a 4 °C.

Purificación de ADH: La ADH se purificó mediante IMAC (cromatografía de afinidad con metales inmovilizados) sobre una columna Histrap High Performance (histrap HP) de 1 ml precargada con níquel (GE Healthcare) usando un sistema de FPLC purificador de Akta (GE Healthcare). La columna se equilibró con cuatro volúmenes de columna (VC) de tampón A. Tras inyectar los extractos en bruto en la columna, la columna se lavó con tampón A para 2 VC, seguido de un gradiente lineal al 100 % de tampón de elución B para 15 VC y se recogió en placas de 96 pocillos. Las fracciones que contenían la proteína se agruparon y almacenaron a 4 °C.

Ensayo en cubeta de ADH: La actividad de ADH se ensayó cinéticamente controlando la disminución en la concentración de NADH midiendo la absorbancia a 340 nm. Se preparó un tampón de reacción que contenía Tris/HCl 100 mM a pH 7,0, DTT 1 mM, isobutiraldehído 11 mM y NADH 200 µM. La reacción se inició mediante la adición de 100 µl de extracto en bruto o proteína purificada en una dilución apropiada hasta 900 µl del tampón de reacción.

Ensayo de actividad de placa de microtitulación de ADH: La medición de la actividad en placas de microtitulación es un ensayo de cubeta de escala reducida. El volumen de reacción total fue de 100 µl. Se dispusieron diez µl de lisados en bruto o de enzimas purificadas, diluidos apropiadamente, en placas de ensayo. El tampón de reacción se preparó como se ha descrito anteriormente (solo sustrato de isobutiraldehído) y se añadieron 90 µl del mismo a las soluciones de enzimas en las placas. Se registró el consumo de NADH a 340 nm en un lector de placas M200 infinito (TECAN Trading AG, Suiza).

Ensayo de actividad de alto rendimiento de ADH: Se descongelaron sedimentos celulares de levadura congelados en placas de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 20 min, y luego se añadieron 100 µl de Y-Per (Pierce, Cat n.º 78990). Las placas se agitaron brevemente con formación de vórtice para volver a suspender los sedimentos celulares. Tras un período de incubación de 60 minutos a temperatura ambiente y 130 rpm, se añadieron 300 µl de Tris-HCl 100 mM (pH 7,0) a las placas para diluir el extracto en bruto. Tras una etapa de centrifugación a 5.300 xg y 4 °C durante 10 min, se transfirieron 40 µl del extracto en bruto resultante a las placas de ensayo (fondo plano, Rainin) usando un robot de manipulación de líquidos. Se centrifugaron las placas de ensayo brevemente a 4.000 rpm y a temperatura ambiente. Se prepararon doce ml de tampón de ensayo por placa (Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, 1 mM, 0,5 mM, isobutiraldehído 0,25 mM o 0,125 mM, DTT 1 mM, NADH 200 µM) y se añadieron 100 µl del mismo a cada pocillo para iniciar la reacción. El agotamiento de NADH se controló a 340 nm en un lector de placas M200 infinito (TECAN Trading AG, Suiza) durante 2 min.

Determinación de la actividad específica basándose en los datos obtenidos de los ensayos de actividad: Las concentraciones de proteína de las muestras que contenían AdhA de *L. lactis* expresada de manera heteróloga, tales como extracto en bruto y proteínas purificadas, se midieron usando el kit Quick Start™ Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una unidad de actividad enzimática (1 U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto en las condiciones especificadas del método de ensayo.

Mediciones de termoestabilidad: Se midieron los valores de T₅₀ (temperatura a la que se conserva el 50 % de la actividad de la enzima tras un tiempo de incubación de 15 minutos) del LI_adhA parental y sus variantes para obtener datos de termoestabilidad. Se transfirieron alícuotas de treinta µl de enzima purificada a tubos de PCR. Cada tubo fue asignado a una temperatura de incubación específica, que correspondía a una ranura en el bloque de una máquina de PCR Mastercycler®ep (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) programada con un gradiente que cubría un intervalo de temperatura de 20 °C. Los tubos se incubaron durante 15 minutos en sus ranuras. Después, la reacción se enfrió en hielo. La actividad residual se determinó con el ensayo de actividad de placa de microtitulación de ADH como se ha descrito anteriormente.

Uso de marcadores de His para la purificación: En cada uno de los ejemplos descritos a continuación, se hace referencia a una enzima ADH que comprende un marcador de His. Como se entiende en la técnica, dichos marcadores facilitan la purificación de proteínas. Como entenderá un experto en la materia dotado de la presente divulgación, las enzimas ADH que carecen de dichos marcadores de His son igualmente o más adecuadas para la conversión del isobutiraldehído en isobutanol. Los ejemplos de las enzimas ADH modificadas descritas en el presente documento que carecen de los marcadores de His que permiten la purificación se encuentran en las SEQ ID NO: 206-224.

Ejemplo 27: Evolución dirigida a través de mutagénesis aleatoria

El siguiente ejemplo ilustra un método para mejorar las propiedades cinéticas de una ADH y también describe las propiedades cinéticas de dichas enzimas ADH mejoradas.

El plásmido pGV2476, un derivado del plásmido pGV1662, portador del gen *LI_adhA_coSc^{his6}* sirvió como plantilla para la PCR propensa a errores usando el cebador directo pGV1994ep_for y el cebador inverso pGV1994_rev. Estos cebadores son específicos de la estructura principal pGV1662 y se unen 50 pb dirección 5' y dirección 3' de la inserción de ADH para crear una superposición para la recombinación homóloga en levadura. Las composiciones de las tres reacciones de PCR propensas a error se resumen en la Tabla 86. El perfil de temperatura fue el siguiente: 95 °C 3 min desnaturalización inicial, 95 °C 30 s desnaturalización, 55 °C 30 s hibridación, 72 °C 2 min de alargamiento, 25 ciclos, 5 min de alargamiento final a 72 °C.

Tabla 86. Condiciones de PCR para las bibliotecas propensas a errores.

Conc. final de MnCl ₂ [μM]	100	200	300
Plantilla [ng]	2	2	2
cebador directo [μM]	0,2	0,2	0,2
cebador inverso [μM]	0,2	0,2	0,2
dNTP [μM]	400	400	400
Tampón de <i>Taq</i> (solución madre x10) [μl]	10	10	10
MgCl ₂ [μM]	7	7	7
Polimerasa de <i>Taq</i> [U]	8	8	8
MnCl ₂ (solución madre 1 mM) [μM]	100	200	300
agua de calidad para PCR [μl]	41,4	31,4	21,4

Los productos de PCR se comprobaron en un gel de agarosa TAE analítico al 1 %, se digirieron con *DpnI* durante 1 h a 37 °C para eliminar trazas de ADN de plantilla y luego se limpiaron con un gel de agarosa TAE preparativo al 1 %. Se limpiaron los fragmentos de agarosa que contenían los productos de la PCR usando tubos de compresión Freeze 'n' (BIORAD, Hercules, CA; catálogo n.º 732-6166) seguido de un procedimiento de pintura de sedimentos (Novagen, catálogo n.º 69049-3) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. Mientras tanto, el plásmido pGV1662 fue digerido por restricción con *NotI* y *Sall* antes de agotar la mezcla de digestión en un gel de agarosa y la pintura de los sedimentos. Se mezclaron el plásmido y la inserción, 500 ng cada uno, entre sí, se hicieron precipitar con pintura de sedimentos, se volvieron a suspender en 6 μl de agua de grado de PCR y se usaron para transformar células de *S. cerevisiae* electrocompetentes como se describe en el apartado de Métodos generales.

Se seleccionó un total de 88 clones de cada una de las bibliotecas de MnCl₂ de 100, 200 y 300 μM en placas de 96 pocillos junto con cuatro clones que contenían el plásmido parental pGV2476 y tres clones que contenían pGV1102 como control sin ADH. Se dejó vacío un pocillo y sirvió como control de esterilidad. Tras seleccionar estas bibliotecas como se describe en el apartado de Métodos generales (expresión heteróloga en CEN.PK2 en placas de 96 pocillos para ensayos de alto rendimiento, Ensayo de actividad de alto rendimiento de ADH), se escogió la biblioteca de 300 μM y se seleccionaron 4.000 clones adicionales de la misma manera. Un total de 24 variantes tuvieron una mejora de más de 1,5 veces en comparación con el tipo silvestre y se escogieron para una nueva selección por triplicado. Las diez primeras variantes de las mismas se cultivaron y expresaron en cultivos de 100 ml como se describe en el apartado de Métodos generales (expresión heteróloga en CEN.PK2 de *S. cerevisiae*), y se determinaron sus actividades específicas en extractos de levadura en bruto como se describe en el apartado de Métodos generales (ensayo en placa de microtitulación de ADH). Dos variantes, LI_AdhA^{28E7-his6} y LI_AdhA^{30C11-his6} mostraron una mejora de la actividad más de 2 veces mayor (0,3 y 0,25 U/mg de proteína de lisado total, respectivamente) en comparación con la enzima de tipo silvestre LI_AdhA^{his6} (0,1 U/mg de proteína de lisado total) y se caracterizaron con mayor detalle.

El ADN plasmídico de estas dos variantes se extrajo como se describe en el apartado de Métodos generales (plásmidos en miniatura a partir de células de levadura) y se sometió a secuenciación de ADN (Laragen, Los Angeles, CA), que reveló dos mutaciones por variante como se indica en la Tabla 87. Dos de estas mutaciones (Y50F y L264V) se localizan muy cerca del sitio activo, que es un espacio entre el dominio de unión al sustrato (cian) y el dominio de unión al cofactor (verde). Las mutaciones I212T y N219Y están ubicadas en la superficie del dominio de unión al cofactor (como se muestra en la Figura 17). Con el fin de resaltar la ubicación de las mutaciones del sitio de unión al cofactor, la Figura 17 conlleva dos vistas sobre la alineación de la estructura.

Tabla 87. Lista de mutaciones encontradas en dos variantes mejoradas de la primera biblioteca propensa a errores (Generación 1).

Variante	Mutaciones
LI_adhA ^{28E7-his6}	N219Y, L264V
LI_adhA ^{30C11-his6}	Y50F, I212T

Las dos variantes enzimáticas, LI_AdhA^{28E7-his6} y LI_AdhA^{30C11-his6}, se expresaron a partir de los plásmidos pGV2475 y pGV30C11, respectivamente a mayor escala (100 ml de cultivos de cada), se purificaron y se caracterizaron con mayor detalle como se describe en el apartado de Métodos generales (expresión heteróloga en CEN.PK2 de *S. cerevisiae*, Preparación de extractos que contienen ADH de CEN.PK2 de *S. cerevisiae*, Purificación de ADH). La enzima LI_AdhA^{his6} de tipo silvestre se expresó a partir del plásmido pGV2476 y se purificó de la misma manera. Las enzimas se caracterizaron por las propiedades cinéticas descritas en el apartado de Métodos generales (ensayo de cubeta de ADH). La Tabla 88 muestra los parámetros cinéticos medidos con isobutiraldehído y NADH. Se observó una disminución del valor de K_M para ambas variantes, mientras que la k_{cat} solo fue mejor para LI_AdhA^{28E7}.

Tabla 88. Parámetros cinéticos de las dos variantes (Generación 1) en isobutiraldehído en comparación con la enzima parental.

Variante	Lisado en bruto	Proteína purificada			
	U/mg	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
LI_AdhA ^{his6}	0,28 ± 0,08	11,7 ± 0,6	25 ± 0,2	30	2.800
LI_AdhA ^{28E7-his6}	0,74 ± 0,15	2,7 ± 0,2	43 ± 2	60	21.000
LI_AdhA ^{30C11-his6}	0,46 ± 0,2	3,9 ± 0,1	60 ± 0,2	80	20.000

La termoestabilidad de la enzima de tipo silvestre y las dos variantes se determinaron como se describe en el apartado de Métodos generales (medidas de termoestabilidad). Las mutaciones encontradas tuvieron un impacto positivo en la estabilidad de las variantes además de los efectos beneficiosos en su eficiencia catalítica. La Tabla 89 resume las T_{50} medidas para la parental y las variantes.

Tabla 89. Resumen de las T_{50} de la enzima parental y las variantes.

Variante	T_{50} [°C], 15 min
LI_AdhA ^{his6}	54,4 ± 0,5
LI_AdhA ^{28E7-his6}	62,3 ± 0,3
Variante	T_{50} [°C], 15 min
LI_AdhA ^{30C11-his6}	57,6 ± 0,6

Ejemplo 28: Evolución dirigida a través de la recombinación

El siguiente ejemplo ilustra un método para mejorar las propiedades cinéticas de una ADH y también ilustra las propiedades cinéticas de dichas enzimas ADH mejoradas.

Se construyó una segunda biblioteca de genes (Generación 2) para recombinar mutaciones beneficiosas encontradas en la primera biblioteca propensa a errores y el resto de tipo silvestre en cada uno de estos sitios (Tabla 90).

Tabla 90. Mutaciones de aminoácidos incluidas en la biblioteca de recombinación.

Posición de aminoácido	Tipo silvestre	Mutaciones	N.º total (incluyendo el tipo silvestre)
50	Y	F	2
212	I	T	2
219	Y	N	2
264	L	V	2

Se generaron cuatro fragmentos de PCR usando los cebadores RecombADHY50_rev y pGV1994ep_for (fragmento 1), RecombADHY50_for y RecombADHI212_Y219_rev (fragmento 2), RecombADHI212_Y219_for y RecombADH

L264_rev (fragmento 3), y RecombADHL264_rev y pGV1994ep_rev (fragmento 4). Los fragmentos se analizaron en un gel analítico de TAE al 1 %, se digirieron con *DpnI*, se separaron en un gel de agarosa TAE preparativo al 1 %, se trataron con Freeze'n'Squeeze (BIORAD)y, finalmente, se pintaron los sedimentos (Novagen). Los fragmentos limpios sirvieron de plantilla para la PCR de montaje. Después de la PCR de montaje correcta, los productos de PCR se trataron como se describe en el Ejemplo 27, se mezclaron con la estructura principal pGV1662 como se describe en el Ejemplo 27, y la mezcla se usó para transformar *S. cerevisiae* como se describe en el apartado de Métodos generales para los Ejemplos 27-30. Se seleccionaron ochenta clones individuales de la biblioteca de recombinación y se compararon en una pantalla de alto rendimiento con el tipo silvestre y las dos variantes encontradas en la biblioteca propensa a errores.

Se seleccionó un total de 80 clones individuales en una placa de 96 pocillos junto con la parental original y las dos variantes mejoradas. Tras explorar la placa de recombinación, como se describe en apartado de Métodos generales (expresión heteróloga en CEN.PK2 en placas de 96 pocillos para ensayos de alto rendimiento, Ensayo de actividad de alto rendimiento de ADH), se cultivaron doce variantes, presentando todas una actividad al menos dos veces mayor en comparación con cualquiera de LI_AdhA^{28E7-his6} o LI_AdhA^{30C11-his6} parentales, y se expresaron en cultivos de 100 ml como se describe en el apartado de Métodos generales (expresión heteróloga en CEN.PK2 de *S. cerevisiae*), y se determinaron sus actividades en los extractos de levadura en bruto como se describe en el apartado de Métodos generales (ensayo en placa de microtitulación de ADH). Dos variantes tuvieron una actividad específica muy similar en el extracto en bruto. Se escogió LI_AdhA^{RE1} para modificaciones adicionales, ya que su actividad fue un 40 % mejor que la de LI_AdhA^{28E7-his6} y un 64 % mejor que la de LI_AdhA^{30C11-his6}.

El ADN plasmídico de esta variante se extrajo como se describe en el apartado de Métodos generales (Mini preparación de plásmidos a partir de células de levadura) y se sometió a secuenciación de ADN (Laragen, Los Angeles, CA), que reveló que las mutaciones Y50F, I212T y L264V (que se encuentran en LI_AdhA^{RE1}) contribuyeron a las mejoras observadas, mientras que la mutación en la posición 219 fue perjudicial para la actividad de las variantes y no se encontró en ninguna de las variantes mejoradas de la biblioteca de recombinación.

La variante LI_AdhA^{RE1-his6} se expresó a partir del plásmido pGV2477, a mayor escala (100 ml de cultivos de cada), se purificó y se caracterizó con mayor detalle como se describe en el apartado de Métodos generales (expresión heteróloga en CEN.PK2 de *S. cerevisiae*, Preparación de extractos que contienen ADH de CEN.PK2 de *S. cerevisiae*, Purificación de ADH). La enzima LI_AdhA^{his6} de tipo silvestre se expresó a partir del plásmido pGV2476 y se purificó de la misma manera. Las enzimas se caracterizaron por las propiedades cinéticas descritas en el apartado de Métodos generales (ensayo de cubeta de ADH). La Tabla 91 muestra los parámetros cinéticos medidos con isobutiraldehído y NADH. Comparado con LI_AdhA^{his6}, LI_AdhA^{28E7-his6}, LI_AdhA^{30C11-his6}, se observó una disminución de K_M y un aumento de k_{cat} para LI_AdhA^{RE1-his6}.

Tabla 91. Propiedades bioquímicas de LI_AdhA^{RE1} medidas en isobutiraldehído.

Variante	Lisado en bruto	Proteína purificada			
	U/mg	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
LI_AdhA ^{his6}	0,28 ± 0,08	11,7 ± 0,6	25 ± 0,2	30	2.800
LI_AdhA ^{28E7-his6}	0,74 ± 0,15	2,7 ± 0,2	43 ± 2	60	21.000
LI_AdhA ^{30C11-his6}	0,46 ± 0,2	3,9 ± 0,1	60 ± 0,2	80	20.000
LI_AdhA ^{RE1-his6}	1,15 ± 0,2	1,7 ± 0,0	105 ± 1	140	82.000

La variante LI_adhA^{RE1-his6}, presentó un valor de T_{50} de 61,6 ± 0,1 °C, que es 5 grados más alto que T_{50} del tipo silvestre y aproximadamente 1 grado más bajo que el de la parental más estable de la serie de recombinación, LI_AdhA^{28E7-his6}.

Ejemplo 29: Evolución dirigida de AdhA de *L. lactis* a través de mutagénesis aleatoria, mutagénesis de saturación del sitio y recombinación

El siguiente ejemplo ilustra un método para mejorar las propiedades cinéticas de una ADH y también describe las propiedades cinéticas de dichas enzimas ADH mejoradas.

El gen *LI_adhA*^{RE1-his6} sirvió como plantilla para una segunda serie de PCR y detección propensas a errores (Generación 3). El ensayo de selección utilizó isobutiraldehído 0,125 mM. Se expresaron aproximadamente 3.000 clones de una biblioteca generada usando PCR propensa a errores con MnCl₂ 200 µM de acuerdo con el Ejemplo 1 anterior y se seleccionaron de manera altamente productiva. Se escogieron varios aciertos para una repetición de la selección por triplicado y dos variantes, LI_AdhA^{7A4-his6} y LI_AdhA^{4A3-his6}, se identificaron con actividad mejorada. Las mutaciones de estas variantes se muestran en la Tabla 92.

Tabla 92. Lista de mutaciones acumuladas en las variantes de la Generación 3 LI_AdhA^{7A4-his6} y LI_AdhA^{4A3-his6}.

Variante	Mutaciones
LI_AdhA ^{7A4-his6}	Y50F, I212T, L264V, Q77R, V108A
LI_AdhA ^{4A3-his6}	Y50F, I212T, L264V, Y113F

Se midieron las actividades específicas (U/mg) en lisados de LI_AdhA^{7A4-his6} y LI_AdhA^{4A3-his6}, así como las parentales, en triplicados biológicos a pH 7,0 (Tabla 93).

Tabla 93. Propiedades bioquímicas de LI_AdhA^{7A4-his6} y LI_AdhA^{4A3-his6} a pH 7,0.

Variante	Lisado en bruto	Proteína purificada			
	[U/mg]	K_M [mM]	U/mg	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat} / K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
LI_AdhA ^{7A4-his6}	1,14 ± 0,1	1,2 ± 0,2	88,8 ± 2,9	117	94.000
LI_AdhA ^{4A3-his6}	1,36 ± 0,1	0,9 ± 0,1	70 ± 2,9	95	100.000

Los valores de T_{50} de LI_AdhA^{7A4-his6} (59,4 °C) y LI_AdhA^{4A3-his6} (57,6 °C) fueron ambos superiores a los de LI_AdhA^{his6} e inferiores a los de LI_AdhA^{RE1-his6}.

Tras dos series de PCR propensas a errores y una serie de recombinación, se realizó mutagénesis de saturación del sitio en cada uno de los seis sitios, generando seis bibliotecas (bibliotecas 50, 77, 108, 113, 212 y 264). La parental original, LI_AdhA^{his6}, se usó como plantilla para cada fragmento de NNK. Se amplificaron dos fragmentos para cada biblioteca usando los cebadores enumerados en la Tabla 4 (pGV1994ep_for y NNKADHF50_rev para el fragmento 1 de la biblioteca 50, NNKADHF50_for y pGV1994ep_rev para el fragmento 2 de la biblioteca 50; pGV1994ep_for y NNKADHR77_rev para el fragmento 1 de la biblioteca 77, NNKADHR77_for y pGV1994ep_rev para el fragmento 2 de la biblioteca 77; pGV1994ep_for y NNKADHA108_rev para el fragmento 1 de la biblioteca 108, NNKADHA108_for y pGV1994ep_rev para el fragmento 2 de la biblioteca 108; pGV1994ep_for y NNKADHF113_rev para el fragmento 1 de la biblioteca 113, NNKADHF113_for y pGV1994ep_rev para el fragmento 2 de la biblioteca 113; pGV1994ep_for y NNKADHT212_rev para el fragmento 1 de la biblioteca 212, NNKADHT212_for y pGV1994ep_rev para el fragmento 2 de la biblioteca 212; pGV1994ep_for y NNKADHV264_rev para el fragmento 1 de la biblioteca 264, NNKADHV264_for y pGV1994ep_rev para el fragmento 2 de la biblioteca 264), y luego se usaron como plantillas para la PCR de montaje. Los productos de la PCR de montaje se trataron como se ha descrito anteriormente para generar las bibliotecas de NNK en levadura. Se seleccionaron noventa clones para cada biblioteca de NNK y se exploraron por separado. Tras volver a explorar, se prepararon nueve clones en miniatura de seis bibliotecas a partir de levadura, los plásmidos se usaron para transformar *E. coli* y los plásmidos resultantes se secuenciaron. Sus actividades de lisado y los resultados de la secuenciación se resumen en la Tabla 94.

Tabla 94. Resumen de mutagénesis de saturación del sitio (Generación 4).

Posición de las bibliotecas de NNK	Variante	U/mg en lisado	Mutación encontrada en la biblioteca de NNK	Mutaciones ilustrativas encontradas en la biblioteca de NNK	Mutaciones para la recombinación
-	LI_adhA ^{his6}	0,28 ± 0,08			
-	LI_AdhA ^{RE1}	1,15 ± 0,20			
50	1G4	0,78 ± 0,02	Y50W	F, W	C, L, F, W, Y, X
77	2G3	0,42 ± 0,00	Q77S	R, S	Q, R, S
77	2H2	0,43 ± 0,00	-	-	-
108	3D10	0,61 ± 0,01	V108A	-	-

(continuación)

Posición de las bibliotecas de NNK	Variante	U/mg en lisado	Mutación encontrada en la biblioteca de NNK	Mutaciones ilustrativas encontradas en la biblioteca de NNK	Mutaciones para la recombinación
108	3D12	0,53 ± 0,07	V108S	-	-
113	4A3b	0,38 ± 0,05	Y113G	F, G	Y, F, G
113	4E6	0,30 ± 0,04	Y113G	-	-
212	5D2	0,92 ± 0,02	I212V	T, V	A, I, T, V
264	6E12	0,38 ± 0,07	L264V	V	I, V

Se recombinaron varias mutaciones encontradas en las bibliotecas de mutagénesis de saturación del sitio de manera combinatoria usando la PCR de SOE, y la biblioteca se construyó usando una parental sin optimización de codones, pGV1947his. Los cebadores descritos en la Tabla 85 también permitieron la secuencia de tipo silvestre en los seis sitios diana. Se generaron seis fragmentos usando Recomb2F50Minilib_rev y pGV1994ep_for (fragmento 1), Recomb2F50Minilib_for y una mezcla de Recomb2Q77Gen5_rev4, Recomb2R77Gen5_rev6 y Recomb2S77Gen5_rev8 (fragmento 2), mezcla de Recomb2Q77Gen5_for3, Recomb2R77Gen5_for5 y Recomb2S77Gen5_for7 y una mezcla de Recomb2Y113 Gen5_rev10, Recomb2F113 Gen5_rev12 y Recomb2G113 Gen5_rev14 (fragmento 3), mezcla de Recomb2Y113 Gen5_for9, Recomb2F113 Gen5_for11 y Recomb2G113 Gen5_for13 y Recomb2T212 mini_rev16 (fragmento 4), Recomb2T212 mini_for15 y Recomb2V264 mini_rev18 (fragmento 5), y Recomb2V264 mini_for17 y pGV1994ep_rev (fragmento 6). Los fragmentos de PCR se analizaron en un gel analítico de TAE al 1 % y luego, los productos se digirieron con *DpnI* durante 1 h a 37 °C, se separaron en un gel de agarosa TAE preparativo al 1 %, se trataron con Freeze'n'Squeeze (BIORAD) y, finalmente, se pintaron los sedimentos (Novagen). Los fragmentos limpios sirvieron de plantilla para la PCR de montaje. Después de la PCR de montaje correcta, se usó recombinación homóloga (como se describe anteriormente) para crear la biblioteca. Se exploraron más de mil clones individuales usando una concentración de isobutiraldehído de 0,125 mM. Se compiló una placa de repetición de la exploración que consistía en las 60 variantes principales, y se ensayó con isobutiraldehído 0,125 mM.

Se eligieron diez variantes para la expresión en 100 ml de medio SC-URA para determinar sus actividades específicas en el lisado. Cuatro de ellas se secuenciaron (véase la Tabla 95 para consultar las mutaciones), se purificaron y se caracterizaron con mayor detalle (Tabla 96). Las nuevas variantes mostraron actividades específicas similares en lisado como LI_AdhA^{RE1}. Notablemente, La variante 4A3 se destacó como una enzima con alta actividad específica.

Tabla 95. Lista de mutaciones en variantes de la Generación 5.

Variante	Mutaciones
LI_AdhA ^{1H7-his6}	Y50F, I212A, L264V, Y113F
LI_AdhA ^{10F10-his6}	Y50F, I212T, L264V, Q77S, Y113F
LI_AdhA ^{8F11-his6}	Y50F, I212A, L264V, Q77R, Y113F
LI_AdhA ^{8F10-his6}	Y50F, I212V, L264V, Q77S, Y113F

Tabla 96. Propiedades bioquímicas de las variantes de la Generación 5.

Variante	Lisado en bruto	Proteína purificada			
	U/mg	K _M [mM]	U/mg	k _{cat} [s ⁻¹]	k _{cat} /K _M [M ⁻¹ *s ⁻¹]
LI_AdhA ^{1H7-his6}	1,12 ± 0,11		39,9 ± 1,7		
LI_AdhA ^{10F10-his6}	1,15 ± 0,17		75,4 ± 12,3		
LI_AdhA ^{8F11-his6}	1,09 ± 0,13	0,8 ± 0,2	41,7 ± 0,2	55	68233
LI_AdhA ^{8D10-his6}	1,05 ± 0,08		58,8 ± 4,5		

Ejemplo 30: Modificación por ingeniería genética de enzimas ADH homólogas

El siguiente ejemplo ilustra cómo se identifican y modifican por ingeniería genética enzimas ADH adicionales para mejorar las propiedades cinéticas de las enzimas ADH adicionales.

Se identificaron enzimas homólogas a AdhA de *L. lactis* a través de búsquedas con BlastP de bases de datos disponibles para el público en general, usando la secuencia de aminoácidos de AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185) con los siguientes parámetros de búsqueda: Umbral de espera = 10, tamaño de palabra = 3, Matriz = BLOSUM62, apertura de hueco = 11, extensión de hueco = 1. Se seleccionaron los cien mejores aciertos, homólogos representativos con más de aproximadamente el 60 % de identidad de secuencia y se enumeran en la Tabla 97. Las secuencias se alinearon usando la herramienta de alineación de secuencias múltiples AlignX, un componente de Vector NTI Advance 10.3.1 con los siguientes parámetros: penalización por apertura de hueco = 10, penalización por extensión de hueco = 0,05, intervalo de penalización por separación de huecos = 8. La alineación de secuencias múltiples mostró niveles muy altos de conservación entre los restos correspondientes a (a) tirosina 50 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (b) glutamina 77 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (c) valina 108 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (d) tirosina 113 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); (e) isoleucina 212 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185); y (f) leucina 264 de la AdhA de *L. lactis* (SEQ ID NO: 185), estando AdhA (SEQ ID NO: 185) codificada por el gen *adhA* de la alcohol deshidrogenasa de *L. lactis* (ADH) (SEQ ID NO: 184) o una versión optimizada en codones del mismo (SEQ ID NO: 206).

Tabla 97. Enzimas homólogas con > 60 % de identidad de secuencia con AdhA de *L. lactis*

Acceso	Descripción	% de identidad de secuencia	Valor de E	Puntuación total
YP_003354381.1	alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147]	100	0	684
NP_267964.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> II1403]	99	0	681
YP_001033251.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363]	95	0	659
YP_811585.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> SK11]	95	0	658
ZP_07367864.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284]	69	2,00E-129	466
YP_794451.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367]	66	1,00E-127	460
ZP_06197454.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Pediococcus acidilactici</i> 7_4]	69	8,00E-124	447
YP_001374103.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus cereus</i> subsp. <i>cytotoxis</i> NVH 391-98]	65	1,00E-123	447
ZP_00741101.1	Alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> ATCC 35646]	64	9,00E-123	444
ZP_04431756.1	Proteína del dominio GroES de la alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus coagulans</i> 36D1]	63	1,00E-122	444
ZP_04101989.1	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>berliner</i> ATCC 10792]	64	1,00E-122	443
ZP_03943574.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus buchneri</i> ATCC 11577]	62	2,00E-122	443
YP_002338331.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus cereus</i> AH187]	64	2,00E-122	443
ZP_04145518.1	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>tochigiensis</i> BGSC 4Y1]	64	2,00E-122	443

(continuación)

Acceso	Descripción	% de identidad de secuencia	Valor de E	Puntuación total
<u>ZP</u> <u>00236660.1</u>	alcohol deshidrogenasa, preferencia por el propanol [<i>Bacillus cereus</i> G9241]	64	2,00E-122	443
<u>ZP</u> <u>03954717.1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus hilgardii</i> ATCC 8290]	62	2,00E-122	443
<u>ZP</u> <u>06011170.1</u>	alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Leptotrichia goodfellowii</i> F0264]	65	2,00E-122	442
<u>ZP</u> <u>07537679.1</u>	Proteína del dominio de unión al cinc de la alcohol deshidrogenasa [<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 9 cepa CVJ13261]	63	2,00E-122	442
<u>NP</u> 844655.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus anthracis</i> cepa Ames]	64	3,00E-122	442
<u>ZP</u> <u>04071880.1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200]	64	3,00E-122	442
<u>YP</u> <u>001844344.1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus fermentum</i> IFO 3956]	64	3,00E-122	442
<u>ZP</u> <u>04227732.1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> Rock3-29]	64	4,00E-122	442
<u>YP</u> <u>002529920.1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus cereus</i> Q1]	64	4,00E-122	442
<u>ZP</u> <u>03107320.1</u>	Alcohol deshidrogenasa putativa, que contiene cinc [<i>Bacillus cereus</i> NVH0597-99]	64	5,00E-122	441
<u>YP</u> <u>001644942.1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4]	64	5,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>03940565.1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus brevis</i> subsp. <i>gravesensis</i> ATCC 27305]	62	5,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>05863633.1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus fermentum</i> 28-3-CHN]	64	5,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>04174477.1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> AH1273]	64	5,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>04168725.1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048]	64	5,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>03945523.1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931]	64	5,00E-122	441
<u>YP</u> 894846.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa AI Hakam]	64	6,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>04273257.1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> BDRD-ST24]	64	6,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>07337905.1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 2 cepa 4226]	63	6,00E-122	441
<u>YP</u> 795183.1	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC	64	6,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>03234447.1</u>	Alcohol deshidrogenasa putativa, que contiene cinc [<i>Bacillus cereus</i> H3081.97]	64	7,00E-122	441

(continuación)

Acceso	Descripción	% de identidad de secuencia	Valor de E	Puntuación total
<u>ZP</u> <u>00134308,2</u>	COG1064: Alcohol deshidrogenasas dependientes del cinc [<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 1 cepa 4074]	63	7,00E-122	441
<u>NP</u> 831985,1	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579]	64	7,00E-122	441
<u>NP</u> 978607,1	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987]	65	7,00E-122	441
<u>YP</u> <u>002366965,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus cereus</i> B4264]	64	8,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>04283955,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> ATCC 4342]	64	8,00E-122	441
<u>ZP</u> <u>04218185,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> Rock3-44]	64	1,00E-121	441
<u>ZP</u> <u>04186048,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> AH1271]	64	1,00E-121	441
<u>ZP</u> <u>07542038,1</u>	Proteína del dominio de unión al cinc de la alcohol deshidrogenasa [<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 11 cepa 56153]	63	1,00E-121	440
<u>YP</u> <u>003664530,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus thuringiensis</i> BMB171]	64	1,00E-121	440
<u>ZP</u> <u>04222478,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> Rock3-42]	64	1,00E-121	440
<u>ZP</u> <u>04305999,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> 172560W]	64	1,00E-121	440
<u>ZP</u> <u>04317351,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876]	64	2,00E-121	440
<u>YP</u> <u>001035842,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus sanguinis</i> SK36]	66	2,00E-121	439
<u>ZP</u> <u>07336540,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> serovar 6 cepa Femo]	63	2,00E-121	439
<u>ZP</u> <u>03232573,1</u>	Alcohol deshidrogenasa putativa, que contiene cinc [<i>Bacillus cereus</i> AH1134]	64	2,00E-121	439
<u>ZP</u> <u>04084316,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>huazhongensis</i> BGSC 4BD1]	64	2,00E-121	439
<u>YP</u> 036379,1	alcohol deshidrogenasa [<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>konkukian</i> cepa 97-27]	64	2,00E-121	439
<u>ZP</u> <u>03713785,1</u>	Proteína hipotética EIKCOROL_01470 [<i>Eikenella corrodens</i> ATCC 23834]	64	3,00E-121	439
<u>ZP</u> <u>04300512,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> mM3]	64	3,00E-121	439
<u>ZP</u> <u>04261933,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> BDRD-ST196]	64	3,00E-121	439
<u>ZP</u> <u>04197309,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> AH603]	64	3,00E-121	439

(continuación)

Acceso	Descripción	% de identidad de secuencia	Valor de E	Puntuación total
<u>ZP</u> <u>04289229,1</u>	Alcohol deshidrogenasa 1 [<i>Bacillus cereus</i> R309803]	64	6,00E-121	438
<u>YP</u> <u>001449881,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus gordonii</i> cepa <i>Challis</i> subcepa CH1]	64	1,00E-120	437
<u>YP</u> <u>002886170,1</u>	Proteína del dominio de unión al cinc de la alcohol deshidrogenasa [<i>Exiguobacterium</i> sp. AT1b]	64	1,00E-120	437
<u>ZP</u> <u>03072955,1</u>	Proteína del dominio de GroES de la alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus reuteri</i> 100-23]	63	3,00E-120	435
<u>ZP</u> <u>01817011,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que contiene cinc [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP3-BS71]	65	5,00E-120	435
<u>ZP</u> <u>03974464,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus reuteri</i> CF48-3A]	63	6,00E-120	434
<u>ZP</u> <u>01824429,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que contiene cinc [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP11-BS70]	65	8,00E-120	434
<u>YP</u> <u>002735395,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus pneumoniae</i>]	65	8,00E-120	434
<u>CAQ</u> 49114,1	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ST398]	63	1,00E-119	434
<u>ZP</u> <u>01819490,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que contiene cinc [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP6-BS73]	65	1,00E-119	434
<u>ZP</u> <u>01832462,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que contiene cinc [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP19-BS75]	65	1,00E-119	434
<u>ZP</u> <u>01834441,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que contiene cinc [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP23-BS72]	65	1,00E-119	433
<u>ZP</u> <u>07644167,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol [<i>Streptococcus mitis</i> NCTC 12261]	65	1,00E-119	433
<u>NP</u> 344823,1	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4]	65	1,00E-119	433
<u>YP</u> <u>003878532,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol [<i>Streptococcus pneumoniae</i> 670-6B]	65	1,00E-119	433
<u>YP</u> <u>001272079,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016]	63	1,00E-119	433
<u>ZP</u> <u>03960239,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus vaginalis</i> ATCC 49540]	62	1,00E-119	433
<u>ZP</u> <u>07646288,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus mitis</i> SK564]	65	2,00E-119	433
<u>YP</u> <u>002739644,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus pneumoniae</i> 70585]	65	2,00E-119	433
<u>YP</u> <u>002737553,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus pneumoniae</i> P1031]	65	2,00E-119	433
<u>YP</u> <u>002741829,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus pneumoniae</i> Taiwan19F-14]	65	2,00E-119	433

(continuación)

Acceso	Descripción	% de identidad de secuencia	Valor de E	Puntuación total
<u>ZP</u> <u>05689169,1</u>	Proteína que contiene el dominio de GroES de la alcohol deshidrogenasa [<i>Staphylococcus aureus</i> A9299]	63	2,00E-119	432
<u>ZP</u> <u>07642509,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus mitis</i> SK597]	65	2,00E-119	432
<u>ZP</u> <u>02718124,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol [<i>Streptococcus pneumoniae</i> CDC3059-06]	65	2,00E-119	432
<u>ZP</u> <u>07647302,1</u>	proteína de la familia de las alcohol deshidrogenasas [<i>Streptococcus mitis</i> SK321]	65	2,00E-119	432
<u>NP</u> 371129,1	alcohol deshidrogenasa [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Mu50]	62	3,00E-119	432
<u>NP</u> 645385,1	alcohol deshidrogenasa [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MW2]	62	3,00E-119	432
<u>ZP</u> <u>01826570,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que contiene cinc [<i>Streptococcus pneumoniae</i> SP14-BS69]	65	4,00E-119	432
<u>CBW</u> 35926,1	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus pneumoniae</i> INV104]	65	4,00E-119	432
<u>YP</u> <u>003305918,1</u>	Proteína del dominio de unión al cinc de la alcohol deshidrogenasa [<i>Streptobacillus moniliformis</i> DSM 12112]	63	4,00E-119	432
<u>YP</u> <u>003445415,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol, COG1064 [<i>Streptococcus mitis</i> B6]	64	4,00E-119	432
<u>ZP</u> <u>05900148,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol [<i>Leptotrichia hofstadii</i> F0254]	64	6,00E-119	431
<u>ZP</u> <u>06901123,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Streptococcus parasanguinis</i> ATCC 15912]	64	1,00E-118	430
<u>ZP</u> <u>05685696,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Staphylococcus aureus</i> A9635]	62	1,00E-118	430
<u>ZP</u> <u>07728047,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol [<i>Streptococcus parasanguinis</i> F0405]	63	2,00E-118	430
<u>ZP</u> <u>04783075,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313]	62	4,00E-118	429
<u>YP</u> <u>003163500,1</u>	Proteína del dominio de GroES de la alcohol deshidrogenasa [<i>Leptotrichia buccalis</i> DSM 1135]	63	7,00E-118	427
<u>ZP</u> <u>05745418,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus antri</i> DSM 16041]	63	3,00E-117	426
<u>ZP</u> <u>07729093,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol [<i>Lactobacillus oris</i> PB013-T2-3]	63	4,00E-117	425
<u>ZP</u> <u>03960690,1</u>	alcohol deshidrogenasa [<i>Lactobacillus vaginalis</i> ATCC 49540]	61	1,00E-116	424
<u>YP</u> <u>003920444,1</u>	RBAM017440 [<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM7]	60	2,00E-116	422
<u>ZP</u> <u>04603652,1</u>	proteína hipotética GCWU000324_03153 [<i>Kingella oralis</i> ATCC 51147]	62	3,00E-116	422

(continuación)

Acceso	Descripción	% de identidad de secuencia	Valor de E	Puntuación total
<u>ZP</u> <u>05553195,1</u>	formaldehído deshidrogenasa dependiente del micotiol [<i>Lactobacillus coleohominis</i> 101-4-CHN]	63	4,00E-116	422
<u>ZP</u> <u>07073134,1</u>	alcohol deshidrogenasa, que prefiere el propanol [<i>Rothia dentocariosa</i> M567]	63	1,00E-115	421

La descripción detallada que antecede se ha proporcionado solo para aclarar la comprensión, y no se deben entender limitaciones innecesarias de la misma, ya que las modificaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GEVO, INC.
CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY
Buelter, Thomas
10 Hawkins, Andrew
Porter-Scheinman, Stephanie
Meinhold, Peter
Dundon, Catherine Asleson
Aristidou, Aristos
15 Urano, Jun
Lies, Doug
Peters, Matthew
Dey, Melissa
Jancauskas, Justas
20 Evans, Kent
Kelly, Julie
Berry, Ruth
Bastian, Sabine
Arnold, Frances
25
- <120> Microorganismos de levadura con acumulación reducida de subproductos para una mejor producción de combustibles, productos químicos y aminoácidos
- <130> GEVO-045/0 3WO
30
- <150> US 61/304.069
<151> 12-02-2010
- <150> US 61/308.568
35 <151> 26-02-2010
- <150> US 61/282.641
<151> 10-03-2010
- <150> US 61/352.133
40 <151> 07-06-2010
- <150> US 61/411.885
<151> 09-11-2010
45
- <150> US 61/430.801
<151> 07-01-2010
- <160> 268
50
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 267
55 <212> PRT

ES 2 739 894 T3

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

5

```

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

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Lys Ala Thr Ala Leu Glu
      20      25      30

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

Arg Leu Glu Lys Leu Glu Glu Leu Lys Lys Thr Ile Asp Gln Glu Phe
50      55      60

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

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

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

Gly Gln Ile Ala Thr Glu Asp Ile Gln Asp Val Phe Asp Thr Asn Val
      115      120      125

Thr Ala Leu Ile Asn Ile Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Gln Ala
      130      135      140

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Ile Ala Gly Arg Asp
145      150      155      160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Phe Ala Val Gly
      165      170      175

Ala Phe Thr Asp Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg
      180      185      190

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

Arg Tyr Arg Gly Asn Glu Glu Gln Ala Lys Asn Val Tyr Lys Asp Thr
210      215      220

Thr Pro Leu Met Ala Asp Asp Val Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
225      230      235      240

Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Thr
      245      250      255

Asn Gln Ala Ser Pro His His Ile Phe Arg Gly
      260      265

```

10

<210> 2
<211> 267
<212> PRT

ES 2 739 894 T3

<213> *Kabatiella polyspora*

<400> 2

```

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

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Lys Ala Thr Ala Leu Glu
          20           25           30

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

Arg Leu Glu Lys Leu Gln Glu Leu Lys Glu Thr Ile Cys Lys Glu Tyr
 50           55           60

Pro Glu Ser Lys Val His Val Glu Glu Leu Asp Ile Ser Asp Ile Asn
 65           70           75           80

Arg Ile Pro Glu Phe Ile Ala Lys Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile
          85           90           95

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Ser Asp Thr Ile
          100          105          110

Gly Asn Ile Glu Asn Glu Asp Ile Lys Gly Met Phe Glu Thr Asn Val
          115          120          125

Phe Gly Leu Ile Cys Leu Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Ala
 130           135           140

Lys Asn Gly Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Ile Ala Gly Ile Glu
 145           150           155           160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys Phe Ala Val Lys
          165           170           175

Ala Phe Thr Glu Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg
          180           185           190

Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Met Val Asn Thr Glu Phe Ser Val Ile
          195          200          205

Arg Tyr Lys Gly Asp Gln Glu Lys Ala Asp Lys Val Tyr Glu Asn Thr
 210           215           220

Thr Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Thr Thr
 225           230           235           240

Ser Arg Lys Ser Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Pro Thr
          245           250           255

Cys Gln Ala Ser Ala Ser His Ile Tyr Arg Gly
          260           265

```

ES 2 739 894 T3

<211> 267
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces castellii*

5 <400> 3

```

Met Ser Gln Gly Pro Lys Ala Ala Glu Arg Leu Asn Glu Lys Ile Val
1          5          10          15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Leu Glu
          20          25          30

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

Arg Leu Glu Lys Leu Gln Gln Leu Lys Glu Val Ile Glu Ala Lys Tyr
          50          55          60

Pro Lys Ser Lys Val Tyr Ile Gly Lys Leu Asp Val Thr Glu Leu Glu
65          70          75          80

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

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

Gly Asp Ile Asp Ile Lys Asp Val Lys Gly Met Met Asp Thr Asn Val
          115          120          125

Leu Gly Leu Ile Asn Val Thr Gln Ala Val Leu His Ile Phe Gln Lys
130          135          140

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Asp
145          150          155          160

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Phe Ala Val Arg
          165          170          175

Ala Phe Thr Glu Ser Leu Arg Arg Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg
          180          185          190

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

Arg Tyr Lys Gly Asp Asn Glu Arg Ala Lys Ser Val Tyr Asp Gly Val
210          215          220

```

ES 2 739 894 T3

His Pro Leu Glu Ala Asp Asp Val Ala Asp Leu Ile Val Tyr Thr Thr
225 230 235 240

Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Thr
245 250 255

Ser Gln Gly Ser Ala Phe His Val His Arg Asp
260 265

<210> 4
<211> 268
<212> PRT
<213> *Candida glabrata*

<400> 4

Met Ser Gln Gly Arg Lys Ala Ala Glu Arg Leu Gln Gly Lys Ile Ala
1 5 10 15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Lys Ala Thr Ala Ile Glu
20 25 30

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

Arg Met Glu Lys Leu Glu Glu Leu Lys Lys Glu Leu Leu Ala Gln Tyr
50 55 60

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

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

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

Gly Asp Ile Asp Pro Glu Asp Ile Ala Gly Met Val Asn Thr Asn Val
115 120 125

Leu Ala Leu Ile Asn Leu Thr Gln Leu Leu Leu Pro Leu Phe Lys Lys
130 135 140

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Ile Ala Gly Arg Asp
145 150 155 160

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

Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Asp Ile Arg

ES 2 739 894 T3

	180		185		190										
Val	Ile	Glu	Ile	Ala	Pro	Gly	Met	Val	Glu	Thr	Glu	Phe	Ser	Val	Val
	195					200						205			
Arg	Tyr	Lys	Gly	Asp	Lys	Ser	Lys	Ala	Asp	Asp	Val	Tyr	Arg	Gly	Thr
	210					215					220				
Thr	Pro	Leu	Tyr	Ala	Asp	Asp	Ile	Ala	Asp	Leu	Ile	Val	Tyr	Ser	Thr
	225				230					235					240
Ser	Arg	Lys	Pro	Asn	Met	Val	Val	Ala	Asp	Val	Leu	Val	Phe	Pro	Thr
				245					250					255	
His	Gln	Ala	Ser	Ala	Ser	His	Ile	Tyr	Arg	Gly	Asp				
			260					265							

<210> 5
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces bayanus*

<400> 5

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

ES 2 739 894 T3

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Asp
 145 150 155 160
 Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Phe Ala Val Gly
 165 170 175
 Ala Phe Thr Asp Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg
 180 185 190
 Val Ile Leu Ile Ala Pro Gly Leu Val Glu Thr Glu Phe Ser Leu Val
 195 200 205
 Arg Tyr Arg Gly Asn Glu Glu Gln Ala Lys Asn Val Tyr Lys Asp Thr
 210 215 220
 Thr Pro Leu Met Ala Asp Asp Val Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ser Thr
 225 230 235 240
 Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Val Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Thr
 245 250 255
 Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Phe Arg Gly
 260 265

<210> 6
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> *Zygosaccharomyces rouxii*

<400> 6

Met Ser Gln Gly Val Lys Ala Ala Glu Arg Leu Ala Gly Lys Thr Val
 1 5 10 15
 Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Lys Glu
 20 25 30
 Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Gly Gln Ile Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg
 35 40 45
 Arg Leu Glu Lys Leu His Glu Phe Lys Glu Gln Thr Thr Lys Ser Tyr
 50 55 60
 Pro Ser Ala Gln Val His Ile Gly Lys Leu Asp Val Thr Ala Ile Asp
 65 70 75 80
 Thr Ile Lys Pro Phe Leu Asp Lys Leu Pro Lys Glu Phe Gln Asp Ile
 85 90 95
 Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Thr Asp Lys Val

ES 2 739 894 T3

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

Asn

<210> 7
<211> 268
<212> PRT
<213> *Kluyveromyces lactis*

<400> 7

Met	Ser	Gln	Gly	Arg	Lys	Ala	Ala	Glu	Arg	Leu	Gln	Asn	Lys	Thr	Ile
1				5					10					15	
Phe	Ile	Thr	Gly	Ala	Ser	Ala	Gly	Ile	Gly	Gln	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu
			20					25					30		
Tyr	Leu	Asp	Ala	Ala	Asn	Gly	Asn	Val	Lys	Leu	Ile	Leu	Ala	Ala	Arg
		35					40					45			

ES 2 739 894 T3

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

<210> 8
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> *Ashbya gossypii*
 <400> 8

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

<210> 9
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces kluyveri*

5

<400> 9

```

Met Ser Gln Gly Arg Arg Ala Ala Glu Arg Leu Ala Asn Lys Thr Val
 1          5          10          15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Leu Glu
          20          25          30

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

Arg Leu Glu Lys Leu Gln Glu Leu Lys Asp Lys Ile Thr Lys Glu Tyr
          50          55          60

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

Lys Ile Lys Pro Phe Leu Asp Gly Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile
          85          90          95

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

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

Leu Ala Leu Ile Asn Ile Thr Gln Ala Val Leu Pro Ile Phe Lys Ala
          130          135          140

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

Ala Tyr Pro Thr Gly Ala Ile Tyr Cys Ala Ser Lys His Ala Val Arg
          165          170          175

Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Val Asn Thr Asn Ile Arg
          180          185          190

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

Arg Tyr Lys Gly Asp Thr Asp Arg Ala Lys Lys Val Tyr Glu Gly Thr
210          215          220
  
```

ES 2 739 894 T3

Asn Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
225 230 235 240

Ser Arg Lys Pro Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Ser
245 250 255

Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly Asp
260 265

<210> 10

<211> 267

<212> PRT

<213> *Kluyveromyces thermotolerans*

<400> 10

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

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Gln Glu
20 25 30

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

Arg Leu Asp Lys Leu Glu Glu Ile Lys Ala Lys Val Ser Lys Asp Phe
50 55 60

Pro Glu Ala Gln Val His Ile Gly Gln Leu Asp Val Thr Gln Thr Asp
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Ile Asp Pro Asn Asp Ile Gln Gly Met Ile Gln Thr Asn Val
115 120 125

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

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

Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Arg
165 170 175

Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Asn Ile Arg
180 185 190

ES 2 739 894 T3

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

Arg Tyr Lys Gly Asp Ser Glu Lys Ala Lys Lys Val Tyr Glu Gly Thr
210 215 220

Gln Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
225 230 235 240

Ser Arg Lys Pro Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Ser
245 250 255

Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly
260 265

<210> 11
<211> 267
<212> PRT
<213> *Kluyveromyces waltii*
<400> 11

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

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Gln Ala Thr Ala Leu Glu
20 25 30

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

Arg Leu Glu Lys Leu Lys Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Lys Asp Phe
50 55 60

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

Glu Ile Lys Pro Phe Ile Asp Asn Leu Pro Glu Glu Phe Lys Asp Ile
85 90 95

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

Gly Thr Ile Asp Ala Ser Asp Ile Glu Gly Met Ile Gln Thr Asn Val
115 120 125

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

ES 2 739 894 T3

Lys Asn Ala Gly Asp Ile Val Asn Leu Gly Ser Val Ala Gly Arg Glu
 145 150 155 160
 Ala Tyr Pro Thr Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Arg
 165 170 175
 Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Asn Ile Arg
 180 185 190
 Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Leu Val
 195 200 205
 Arg Tyr Lys Gly Asp Pro Glu Lys Ala Lys Lys Val Tyr Glu Gly Thr
 210 215 220
 Thr Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
 225 230 235 240
 Ser Arg Lys Ser Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Ser
 245 250 255
 Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly
 260 265

<210> 12
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> *Pichia stipitis*

<400> 12

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

ES 2 739 894 T3

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

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

Lys Asn Ser Gly Asp Ile Val Asn Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Asp
145 150 155 160

Pro Tyr Pro Gly Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Ala Val Lys
165 170 175

Phe Phe Ser His Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Arg Ile Arg
180 185 190

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

Arg Phe His Gly Asp Gln Gly Ala Ala Asp Ala Val Tyr Glu Gly Thr
210 215 220

Gln Pro Leu Asp Ala Ser Asp Ile Ala Glu Val Ile Val Phe Gly Ile
225 230 235 240

Thr Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Glu Thr Leu Val Phe Pro Ser
245 250 255

His Gln Ala Ser Ala Ser His Val Tyr Lys Ala Pro Lys
260 265

<210> 13
<211> 270
<212> PRT
<213> *Debaryomyces hansenii*

<400> 13

Met Ser Tyr Gly Ser Lys Ala Ala Glu Arg Val Ala Asn Lys Ile Val
1 5 10 15

Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Lys Glu
20 25 30

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

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

ES 2 739 894 T3

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

<210> 14
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> *Pichia pastoris*

<400> 14

ES 2 739 894 T3

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

<210> 15

ES 2 739 894 T3

<211> 268
 <212> PRT
 <213> *Candida dubliniensis*

5 <400> 15

```

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

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

Phe Ala Glu Ala Ser Asn Gly Gln Val Lys Leu Val Leu Gly Ala Arg
35      40      45

Arg Lys Glu Arg Leu Val Lys Leu Ser Asp Thr Leu Ile Lys Gln Tyr
50      55      60

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

Ser Ile Ser Lys Phe Ile Ala Gly Ile Pro His Glu Phe Glu Pro Asp
85      90      95

Val Leu Ile Asn Asn Ser Gly Lys Ala Leu Gly Lys Glu Glu Val Gly
100     105     110

Glu Leu Lys Asp Glu Asp Ile Thr Glu Met Phe Asp Thr Asn Val Ile
115     120     125

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

Pro Tyr Ala Asp Val Val Phe Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Val Pro
145     150     155     160

Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Ala Val Arg Ser
165     170     175

Phe Thr Asp Thr Phe Arg Lys Glu Thr Ile Asn Thr Gly Ile Arg Val
180     185     190

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

Tyr Lys Gly Asp Thr Asp Ala Ala Asp Ala Val Tyr Thr Gly Thr Glu
210     215     220

Pro Leu Thr Pro Glu Asp Val Ala Glu Val Val Val Phe Ala Ser Ser
225     230     235     240

Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Asn His

```

ES 2 739 894 T3

245

250

255

Gln Ala Ser Pro Asp His Val Tyr Arg Lys Pro Asn
260 265

<210> 16
<211> 268
<212> PRT
<213> *Candida albicans*

<400> 16

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

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

Phe Ala Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Lys Leu Ile Leu Gly Ala Arg
35 40 45

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

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

Ser Ile Ser Lys Phe Ile Ala Gly Ile Pro Thr Asp Phe Glu Pro Asp
85 90 95

Val Leu Ile Asn Asn Ser Gly Lys Ala Leu Gly Lys Glu Gln Val Gly
100 105 110

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

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

Asn Tyr Ala Asp Val Val Phe Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Val Ala
145 150 155 160

Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Ala Val Arg Ser
165 170 175

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

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

ES 2 739 894 T3

Tyr Lys Gly Asp Thr Glu Ala Ala Asp Ala Val Tyr Thr Gly Thr Glu
210 215 220

Pro Leu Thr Pro Glu Asp Val Ala Glu Val Val Val Phe Ala Ala Ser
225 230 235 240

Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Asn His
245 250 255

Gln Ala Ser Pro Asp His Val Tyr Arg Lys Pro Asn
260 265

<210> 17

<211> 268

<212> PRT

<213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 17

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

Phe Val Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Gln Ala Thr Val Leu Ala
20 25 30

Leu Ala Glu Ala Ala Lys Gly Asp Leu Lys Phe Val Leu Ala Ala Arg
35 40 45

Arg Thr Asp Arg Leu Asp Glu Leu Lys Lys Lys Leu Glu Thr Asp Tyr
50 55 60

Lys Gly Ile Gln Val Leu Pro Phe Lys Leu Asp Val Ser Lys Val Glu
65 70 75 80

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

Asp Val Leu Ile Asn Asn Ala Gly Met Val His Gly Thr Glu Lys Val
100 105 110

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

Leu Gly Leu Ile Ser Val Thr Gln Gln Phe Val Gly Glu Met Arg Lys
130 135 140

Arg Asn Lys Gly Asp Ile Val Asn Ile Gly Ser Ile Ala Gly Arg Glu
145 150 155 160

Pro Tyr Val Gly Gly Gly Ile Tyr Cys Ala Thr Lys Ala Ala Val Arg

ES 2 739 894 T3

165

170

175

Ser Phe Thr Glu Thr Leu Arg Lys Glu Asn Ile Asp Thr Arg Ile Arg
180 185 190

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

Arg Phe Arg Gly Asp Lys Ser Lys Ala Asp Ala Val Tyr Ala Gly Thr
210 215 220

Glu Pro Leu Val Ala Asp Asp Ile Ala Glu Phe Ile Thr Tyr Thr Leu
225 230 235 240

Thr Arg Arg Glu Asn Val Val Ile Ala Asp Thr Leu Ile Phe Pro Asn
245 250 255

His Gln Ala Ser Pro Thr His Val Tyr Arg Lys Asn
260 265

<210> 18

<211> 270

<212> PRT

<213> *Issatchenkia orientalis*

<400> 18

5

10

Met Phe Gly Asn Ile Ser Gln Arg Leu Ala Gly Lys Asn Ile Leu Ile
1 5 10 15

Thr Gly Ala Ser Thr Gly Ile Gly Tyr His Thr Ala Lys Tyr Phe Ala
20 25 30

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

Glu Lys Leu Glu Ala Leu Lys Ala Asp Leu Leu Ala Lys Tyr Pro Ser
50 55 60

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

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

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

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

ES 2 739 894 T3

Met Ile Gln Leu Thr Gln Leu Val Val Gln Gln Met Lys Glu Arg Asn
130 135 140

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

Pro Gly Gly Gly Ile Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Ala Leu Arg Ser Phe
165 170 175

Thr His Val Leu Arg Glu Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg Val Ile
180 185 190

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

Phe Lys Gly Asp Lys Ser Lys Ala Glu Lys Val Tyr Glu Gly Thr Glu
210 215 220

Pro Leu Tyr Gly Thr Asp Ile Ala Glu Leu Ile Leu Phe Ala Val Ser
225 230 235 240

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

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

<210> 19
<211> 271
5 <212> PRT
<213> *Aspergillus nidulans*
<400> 19

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

Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Arg Ser Thr Ala Arg Glu Phe Ala
20 25 30

Arg Thr Ala Pro Lys Asp Leu Lys Leu Ile Val Thr Ala Arg Arg Ile
35 40 45

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

Gly Val Lys Thr Leu Pro Val Lys Leu Asp Val Ser Asn Pro Glu Glu
65 70 75 80

Val Lys Asn Phe Val Pro Ser Leu Pro Ala Glu Phe Gln Asp Ile Asp

ES 2 739 894 T3

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

<210> 20
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus niger*

<400> 20

ES 2 739 894 T3

Met	Ala	Thr	Ala	Met	Ala	Lys	Arg	Leu	Glu	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Val	1	5	10	15
Thr	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly	Arg	Ser	Thr	Ala	Lys	Glu	Phe	Ala	20	25	30	
Arg	Thr	Ser	Pro	Lys	Asp	Leu	Lys	Ile	Ile	Val	Thr	Ala	Arg	Arg	Ile	35	40	45	
Asp	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Gly	Glu	50	55	60	
Gly	Val	Lys	Val	Leu	Pro	Val	Gln	Leu	Asp	Val	Ser	Asn	Pro	Glu	Asp	65	70	75	80
Ile	Lys	Lys	Phe	Val	Pro	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Phe	Lys	Glu	Ile	Asp	85	90	95	
Val	Leu	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Leu	Val	Lys	Gly	Val	Ala	Lys	Ala	Pro	100	105	110	
Glu	Ile	Ala	Pro	Glu	Asp	Ile	Asn	Val	Met	Phe	Ser	Thr	Asn	Val	Thr	115	120	125	
Gly	Leu	Ile	Asn	Met	Thr	Gln	Ala	Ile	Leu	Pro	Ile	Phe	Lys	Lys	Arg	130	135	140	
Ala	Asp	Gly	Gly	Arg	Gly	Asp	Ile	Ile	Asn	Ile	Gly	Ser	Ile	Ala	Gly	145	150	155	160
Arg	Glu	Ala	Tyr	Pro	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	Cys	Ala	Thr	Lys	Ala	Ala	165	170	175	
Ile	Arg	Ser	Phe	Thr	Asp	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Leu	Ile	Ala	Thr	Arg	180	185	190	
Ile	Arg	Ile	Ile	Glu	Ile	Asp	Pro	Gly	Gln	Val	Glu	Thr	Glu	Phe	Ser	195	200	205	
Val	Val	Arg	Phe	Tyr	Gly	Asp	Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Ala	Val	Tyr	Ala	210	215	220	
Gly	Cys	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Asp	Asp	Ile	Ala	Glu	Val	Val	Val	Phe	225	230	235	240
Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Glu	Asn	Val	Val	Ile	Ala	Asp	Thr	Leu	Ile	Phe	245	250	255	
Pro	Ser	His	Gln	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	His	Thr	Gly	Leu	Asn	Ser	Ile	260	265	270	
Ala	Asp	Gly	Thr	Val	Thr	275													

<210> 21
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> *Neurospora crassa*

5

<400> 21

```

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

Thr Gly Ala Ser Ser Gly Ile Gly Arg Ser Thr Ala Phe Glu Phe Ala
      20              25              30

Arg Thr Ala Pro Asn His Gly Leu Lys Leu Ile Leu Thr Ala Arg Arg
      35              40              45

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

Glu Gly Val Gln Val Leu Pro Val Lys Leu Asp Val Ser Gln Pro Glu
65              70              75              80

Glu Val Arg Gly Phe Val Gly Asn Leu Pro Glu Glu Trp Arg Asp Ile
      85              90              95

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

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

Ile Asn Met Thr Gln Ala Ile Leu Pro Ile Phe Lys Ala Arg Gly Ser
      130              135              140

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

Glu Pro Tyr Ala Gly Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys Ala Ala Val
      165              170              175

Arg Ser Phe Thr Asp Ala Leu Arg Lys Glu Leu Ile Ala Thr Arg Ile
      180              185              190

Arg Val Met Glu Ile Asp Pro Gly Gln Val Glu Thr Glu Phe Ser Val
      195              200              205

Val Arg Phe Tyr Gly Asp Lys Asn Lys Ala Asp Ala Val Tyr Ala Gly
      210              215              220

Val Asp Pro Leu Thr Pro Asp Asp Ile Ala Glu Ile Val Val Phe Val
225              230              235              240

Val Thr Arg Arg Glu Asn Val Val Val Ala Asp Thr Leu Val Phe Pro
      245              250              255

```

ES 2 739 894 T3

Ser His Gln Ala Gly Ala Gly Ile Met His Arg Lys Ser Thr
260 265 270

<210> 22
<211> 259
<212> PRT
<213> *Schizosaccharomyces pombe*

<400> 22

Met Ser Arg Leu Asp Gly Lys Thr Ile Leu Ile Thr Gly Ala Ser Ser
1 5 10 15

Gly Ile Gly Lys Ser Thr Ala Phe Glu Ile Ala Lys Val Ala Lys Val
20 25 30

Lys Leu Ile Leu Ala Ala Arg Arg Phe Ser Thr Val Glu Glu Ile Ala
35 40 45

Lys Glu Leu Glu Ser Lys Tyr Glu Val Ser Val Leu Pro Leu Lys Leu
50 55 60

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

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

Leu Gly Thr Asp Lys Val Ile Asp Leu Asn Ile Asp Asp Ala Val Thr
100 105 110

Met Ile Thr Thr Asn Val Leu Gly Met Met Ala Met Thr Arg Ala Val
115 120 125

Leu Pro Ile Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Gly Asp Ile Leu Asn Val Gly
130 135 140

Ser Ile Ala Gly Arg Glu Ser Tyr Val Gly Gly Ser Val Tyr Cys Ser
145 150 155 160

Thr Lys Ser Ala Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr
165 170 175

Ile Asp Thr Arg Ile Arg Ile Met Glu Val Asp Pro Gly Leu Val Glu
180 185 190

Thr Glu Phe Ser Val Val Arg Phe His Gly Asp Lys Gln Lys Ala Asp
195 200 205

ES 2 739 894 T3

Asn Val Tyr Lys Asn Ser Glu Pro Leu Thr Pro Glu Asp Ile Ala Glu
210 215 220

Val Ile Leu Phe Ala Leu Thr Arg Arg Glu Asn Val Val Ile Ala Asp
225 230 235 240

Thr Leu Val Phe Pro Ser His Gln Gly Gly Ala Asn His Val Tyr Arg
245 250 255

Lys Gln Ala

<210> 23

<211> 268

<212> PRT

<213> *Kluyveromyces marxianus*

<400> 23

Met Ser Gln Gly Arg Arg Ala Ala Glu Arg Leu Gln Asn Lys Thr Ile
1 5 10 15

Phe Ile Thr Gly Ala Ser Ala Gly Ile Gly Glu Ala Thr Ala Leu Glu
20 25 30

Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Gly Asn Val Lys Leu Val Leu Ala Ala Arg
35 40 45

Arg Leu Ser Lys Leu Gln Ala Leu Lys Asp Lys Ile Ala Ala Glu Tyr
50 55 60

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

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

Asp Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Lys Ala Leu Gly Val Asp Pro Val
100 105 110

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

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

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

Ala Tyr Pro Asn Gly Ser Ile Tyr Cys Ala Thr Lys His Ala Val Arg
165 170 175

ES 2 739 894 T3

Ala Phe Thr Gln Ser Leu Arg Lys Glu Leu Ile Asn Thr Lys Ile Arg
180 185 190

Val Ile Glu Ile Ala Pro Gly Asn Val Glu Thr Glu Phe Ser Tyr Val
195 200 205

Arg Tyr Lys Gly Asp Thr Asp Ala Ala Lys Lys Val Tyr Lys Gly Thr
210 215 220

Thr Pro Leu Tyr Ala Asp Asp Ile Ala Asp Leu Ile Val Tyr Ala Thr
225 230 235 240

Ser Arg Lys Gln Asn Thr Val Ile Ala Asp Val Leu Val Phe Ala Thr
245 250 255

Asn Gln Ala Ser Pro Tyr His Ile Tyr Arg Gly Glu
260 265

<210> 24

5 <400> 24
000

<210> 25

<211> 500

10 <212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 25

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80

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

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110

15

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

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

<210> 26
 <211> 499
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces castellii*

<400> 26

Met Thr Lys Ile Asn Phe Glu Ala Ala Glu Pro Ala Thr Ile Thr Leu
 1 5 10 15
 Pro Asn Gly Ile Thr Tyr Asn Gln Pro Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn
 20 25 30
 Glu Phe Met Lys Ser Gln Asp Tyr Lys Thr Ile Lys Val Glu Asn Pro
 35 40 45
 Ala Thr Ala Glu Ile Val Cys Glu Val Ser Ser Gly Thr Ser Glu Asp
 50 55 60
 Val Glu Tyr Ala Val Glu Ser Ala Glu His Ala Phe Asn Asp Thr Asp
 65 70 75 80
 Trp Ala Thr Gln Asp Pro Lys Ile Arg Gly Arg Tyr Leu Ser Lys Leu
 85 90 95

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

Gln Tyr Glu Thr Ile Leu Lys Tyr Ile Lys Ile Gly Lys Glu Glu Gly
355 360 365

Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Thr Ile Gly Asn Lys Gly Tyr Phe
370 375 380

Ile Lys Pro Thr Ile Phe Tyr Asp Val Lys Glu Asp Met Glu Ile Val
385 390 395 400

Arg Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ser Lys Phe Lys Asp
405 410 415

Ile Glu Asp Gly Val Ala Met Ala Asn Ala Ser Glu Phe Gly Leu Gly
420 425 430

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

Met Leu Lys Ser Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp
450 455 460

Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg Glu
465 470 475 480

Met Gly Glu Glu Val Tyr Asp Cys Tyr Thr Glu Val Lys Ala Ile Arg
485 490 495

Ile Lys Leu

<210> 27

<211> 497

<212> PRT

<213> *Candida glabrata*

<400> 27

Met Ala Tyr Lys Thr Ala Ala Thr Lys Thr Ile Lys Leu Pro Asn Gly
1 5 10 15

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

Glu Ser Ser Asp Gly Lys Thr Met Thr Ile Glu Asn Pro Ser Thr Gln
35 40 45

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

Ala Val Asp Cys Ala Glu Arg Ala Phe Glu Lys Ser Asp Trp Ala Thr

ES 2 739 894 T3

65				70				75				80				
Gln	Asp	Pro	Lys	Val	Arg	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Asp	Leu	
				85					90					95		
Met	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Leu	Ile	Ala	Ser	Ile	Glu	Thr	Leu	Asp	Asn	
				100					105					110		
Gly	Lys	Thr	Ile	Ala	Leu	Ser	Arg	Gly	Asp	Val	Gln	Leu	Ser	Ile	Asn	
				115					120					125		
Cys	Ile	Arg	Asp	Ala	Ala	Ser	Tyr	Ala	Asp	Lys	Val	Asp	Gly	Arg	Ser	
				130					135					140		
Ile	Asp	Thr	Gly	Asp	Gly	Tyr	Met	Asn	Tyr	Thr	Ile	Arg	Glu	Pro	Ile	
				145					150					155		
Gly	Val	Cys	Ala	Gln	Ile	Ile	Pro	Trp	Asn	Phe	Pro	Leu	Met	Met	Leu	
				165					170					175		
Ser	Trp	Lys	Val	Gly	Pro	Ala	Leu	Ala	Met	Gly	Asn	Cys	Ile	Val	Leu	
				180					185					190		
Lys	Pro	Ala	Ser	Ala	Thr	Pro	Leu	Asn	Ala	Leu	Tyr	Phe	Ser	Ser	Leu	
				195					200					205		
Cys	Lys	Gln	Val	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Asn	Ile	Ile	Pro	Gly	
				210					215					220		
Pro	Gly	Gly	Met	Val	Gly	Thr	Ala	Leu	Thr	Thr	His	Pro	Lys	Val	Arg	
				225					230					235		
Lys	Val	Ala	Phe	Thr	Gly	Ser	Thr	Asp	Ile	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Val	
				245					250					255		
Lys	Ala	Ser	Ala	Ser	Asn	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	
				260					265					270		
Lys	Ser	Ala	His	Leu	Val	Phe	Asn	Asp	Ala	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Leu	
				275					280					285		
Pro	Asn	Leu	Val	Asn	Gly	Ile	Phe	Lys	Asn	Ala	Gly	Gln	Ile	Cys	Ser	
				290					295					300		
Ser	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Ala	Gln	Ala	Gly	Ile	Tyr	Asp	Arg	Leu	Leu	
				305					310					315		
Lys	Glu	Phe	Lys	Ala	Tyr	Ile	Glu	Lys	Asn	Ile	Lys	Val	Gly	Asn	Pro	
				325					330					335		

ES 2 739 894 T3

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

Asn Thr Ile Leu Lys Tyr Ile Asn Ile Gly Lys Glu Glu Gly Ala Lys
355 360 365

Val Leu Thr Gly Gly Glu Thr Ala Ala Glu Lys Gly Tyr Phe Ile Lys
370 375 380

Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Lys Glu Asp Met Arg Val Val Lys Glu
385 390 395 400

Glu Ile Phe Gly Pro Cys Val Thr Ile Ser Lys Phe Glu Glu Ile Glu
405 410 415

Asp Gly Val Ala Met Ala Asn Asp Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala Gly
420 425 430

Ile Glu Thr Glu Asn Leu Ser Thr Ala Leu Lys Val Ala Lys Met Leu
435 440 445

His Ser Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Arg
450 455 460

Val Pro Phe Gly Gly Tyr Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg Glu Met Gly
465 470 475 480

Ser Glu Val Tyr Glu Cys Tyr Thr Gln Thr Lys Ala Val Arg Ile Lys
485 490 495

Leu

<210> 28

<211> 500

<212> PRT

<213> *Saccharomyces bayanus*

<400> 28

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Ala Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Phe Thr Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

305		310		315		320									
Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Phe	Lys	Ala	Tyr	Leu	Glu	Thr	Glu	Ile	Lys	Val
			325						330					335	
Gly	Asn	Pro	Phe	Asp	Lys	Ala	Asn	Phe	Gln	Gly	Ala	Ile	Thr	Asn	Arg
			340					345					350		
Gln	Gln	Phe	Asp	Thr	Ile	Met	Asn	Tyr	Ile	Asp	Ile	Gly	Lys	Lys	Glu
		355					360					365			
Gly	Ala	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Lys	Val	Gly	Asp	Lys	Gly	Tyr
	370					375					380				
Phe	Ile	Arg	Pro	Thr	Val	Phe	Tyr	Asp	Val	Glu	Glu	Asp	Met	Arg	Ile
385					390					395					400
Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Phe	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Val	Ala	Lys	Phe	Lys
				405					410					415	
Thr	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Ala	Met	Ala	Asn	Ser	Ser	Glu	Phe	Gly	Leu
			420					425					430		
Gly	Ser	Gly	Ile	Glu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Lys	Val	Ala
		435					440					445			
Lys	Met	Leu	Lys	Ala	Gly	Thr	Val	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Asn	Asp	Phe
	450					455					460				
Asp	Ser	Arg	Val	Pro	Phe	Gly	Gly	Val	Lys	Gln	Ser	Gly	Tyr	Gly	Arg
465					470					475					480
Glu	Met	Gly	Glu	Glu	Val	Tyr	His	Ala	Tyr	Thr	Glu	Val	Lys	Ala	Val
				485					490					495	
Arg	Ile	Lys	Leu												
			500												

<210> 29
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> *Kluyveromyces lactis*

<400> 29

ES 2 739 894 T3

Met	Ser	Ser	Thr	Ile	Ala	Glu	Lys	Leu	Asn	Leu	Lys	Ile	Val	Glu	Gln	1	5	10	15
Asp	Ala	Val	Ser	Ile	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly	Leu	Thr	Tyr	Gln	Gln	Pro	20	25	30	
Thr	Gly	Leu	Phe	Ile	Asn	Asn	Gln	Phe	Ile	Lys	Ser	Gln	Asp	Gly	Lys	35	40	45	
Thr	Leu	Lys	Val	Glu	Asn	Pro	Ser	Thr	Glu	Glu	Ile	Ile	Val	Glu	Val	50	55	60	
Gln	Ser	Ala	Thr	Ser	Gln	Asp	Val	Glu	Tyr	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Asp	65	70	75	80
Ala	Ala	Phe	Asn	Ser	Glu	Trp	Ser	Thr	Met	Asp	Pro	Lys	Lys	Arg	Gly	85	90	95	
Ser	Leu	Leu	Phe	Lys	Leu	Ala	Asp	Leu	Ile	Glu	Ala	Gln	Lys	Glu	Leu	100	105	110	
Ile	Ala	Ser	Ile	Glu	Ser	Ala	Asp	Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Ala	Leu	Ala	115	120	125	
Arg	Gly	Asp	Val	Gly	Leu	Val	Ile	Asp	Tyr	Ile	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	130	135	140	
Tyr	Ala	Asp	Lys	Leu	Gly	Gly	Arg	Thr	Ile	Asn	Thr	Gly	Asp	Gly	Tyr	145	150	155	160
Ala	Asn	Phe	Thr	Tyr	Lys	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Cys	Gly	Gln	Ile	Ile	165	170	175	
Pro	Trp	Asn	Phe	Pro	Leu	Met	Met	Leu	Ser	Trp	Lys	Ile	Ala	Pro	Ala	180	185	190	
Leu	Val	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	Ile	Leu	Lys	Pro	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	195	200	205	
Leu	Asn	Ala	Leu	Phe	Phe	Ala	Ser	Leu	Cys	Lys	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	210	215	220	
Ala	Gly	Val	Val	Asn	Ile	Val	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg	Ser	Val	Gly	Asp	225	230	235	240
Thr	Ile	Thr	Asn	His	Pro	Lys	Ile	Arg	Lys	Ile	Ala	Phe	Thr	Gly	Ser	245	250	255	
Thr	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp	Val	Ala	Ile	Lys	Ala	Ala	Gln	Ser	Asn	Leu	260	265	270	
Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Ala	His	Leu	Val	Phe	275	280	285	

ES 2 739 894 T3

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

<210> 30

<211> 526

<212> PRT

<213> *Kluyveromyces thermotolerans*

<400> 30

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

<210> 31
 <211> 526
 <212> PRT
 <213> *Kluyveromyces waltii*

5

<400> 31

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

ES 2 739 894 T3

Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile Ile Pro Gly Pro Gly Arg Asp
 245 250 255
 Val Gly Glu Thr Leu Thr Thr His Pro Lys Ile Arg Lys Ile Ala Phe
 260 265 270
 Thr Gly Ser Thr Gly Thr Gly Lys Gly Ile Ala Val Lys Ala Ala Gln
 275 280 285
 Ser Asn Leu Lys Lys Val Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser Ala His
 290 295 300
 Met Val Phe Asn Asp Ala Asn Leu Glu Lys Thr Ile Pro Asn Leu Val
 305 310 315 320
 Asn Gly Ile Phe Leu Asn Ala Gly Gln Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg
 325 330 335
 Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp Lys Leu Leu Pro Ala Phe Lys
 340 345 350
 Lys Tyr Val Glu Glu Val Ile Thr Val Gly Ser Pro Phe Asp Glu Ser
 355 360 365
 Asn Phe Gln Gly Ala Ile Asn Asn Lys Ala Gln Phe Asp Thr Ile Met
 370 375 380
 Asn Tyr Val Gly Ile Gly Lys Glu Glu Gly Ala Lys Val Leu Thr Gly
 385 390 395 400
 Gly Lys Arg Ser Gly Asp Gln Gly Tyr Phe Ile Arg Pro Thr Ile Phe
 405 410 415
 Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly
 420 425 430
 Pro Val Val Thr Ile Ser Lys Phe Lys Glu Ile Glu Asp Gly Val Ala
 435 440 445
 Met Ala Asn Asn Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala Gly Ile Gln Thr Glu
 450 455 460
 Ser Val Ser Thr Ala Leu Lys Val Ser Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr
 465 470 475 480
 Val Trp Val Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp Ser Ser Val Pro Phe Gly
 485 490 495

ES 2 739 894 T3

Gly Cys Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Ser Glu Met Gly Ile Glu Ala Phe
500 505 510

Asp Ser Tyr Thr Thr Thr Lys Ala Val Arg Ile Lys Leu Ala
515 520 525

<210> 32
<211> 500
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 32

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80

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

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile
115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn
130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu
145 150 155 160

Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile
165 170 175

Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val
180 185 190

Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe

ES 2 739 894 T3

195					200					205					
Ala	Ser	Leu	Cys	Lys	Lys	Val	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Asn	Ile
210						215					220				
Val	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Thr	Asn	Asp	Pro
225					230					235					240
Arg	Ile	Arg	Lys	Leu	Ala	Phe	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Val	Gly	Lys	Ser
				245					250					255	
Val	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser	Asn	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Leu	Glu
			260					265					270		
Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Ala	His	Leu	Val	Phe	Asp	Asp	Ala	Asn	Ile	Lys
		275					280					285			
Lys	Thr	Leu	Pro	Asn	Leu	Val	Asn	Gly	Ile	Phe	Lys	Asn	Ala	Gly	Gln
	290					295					300				
Ile	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Val	Gln	Glu	Gly	Ile	Tyr	Asp
305					310					315					320
Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Phe	Lys	Ala	Tyr	Leu	Glu	Thr	Glu	Ile	Lys	Val
				325					330					335	
Gly	Asn	Pro	Phe	Asp	Lys	Ala	Asn	Phe	Gln	Gly	Ala	Ile	Thr	Asn	Arg
			340					345					350		
Gln	Gln	Phe	Asp	Thr	Ile	Met	Asn	Tyr	Ile	Asp	Ile	Gly	Lys	Lys	Glu
		355					360					365			
Gly	Ala	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Lys	Val	Gly	Asp	Lys	Gly	Tyr
	370					375					380				
Phe	Ile	Arg	Pro	Thr	Val	Phe	Tyr	Asp	Val	Asn	Glu	Asp	Met	Arg	Ile
385					390					395					400
Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Phe	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Val	Ala	Lys	Phe	Lys
				405					410					415	
Thr	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Glu	Met	Ala	Asn	Ser	Ser	Glu	Phe	Gly	Leu
			420					425					430		
Gly	Ser	Gly	Ile	Glu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Lys	Val	Ala
		435					440					445			
Lys	Met	Leu	Lys	Ala	Gly	Thr	Val	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Asn	Asp	Phe
	450					455					460				

ES 2 739 894 T3

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg
465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val
485 490 495

Arg Ile Lys Leu
500

<210> 33
<211> 500
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 33

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80

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

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile
115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn
130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu
145 150 155 160

Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile
165 170 175

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

435

440

445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe
450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg
465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val
485 490 495

Arg Ile Lys Leu
500

<210> 34
<211> 500
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*
<400> 34

5

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80

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

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile
115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn
130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu
145 150 155 160

10

ES 2 739 894 T3

Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile
 165 170 175
 Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val
 180 185 190
 Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe
 195 200 205
 Ala Ser Leu Cys Lys Lys Val Gly Ile Pro Ala Gly Val Val Asn Ile
 210 215 220
 Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro
 225 230 235 240
 Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser
 245 250 255
 Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu
 260 265 270
 Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Lys
 275 280 285
 Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln
 290 295 300
 Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp
 305 310 315 320
 Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val
 325 330 335
 Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg
 340 345 350
 Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu
 355 360 365
 Gly Ala Lys Ile Leu Thr Gly Gly Glu Lys Val Gly Asp Lys Gly Tyr
 370 375 380
 Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile
 385 390 395 400
 Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys
 405 410 415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu
420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala
435 440 445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe
450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg
465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val
485 490 495

Arg Ile Lys Leu
500

<210> 35
<211> 501
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 35

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80

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

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Phe Lys Ala Arg Gly Asp Val Thr
115 120 125

Ile Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val
130 135 140

ES 2 739 894 T3

Asn 145	Gly	Arg	Thr	Ile	Asn 150	Thr	Gly	Asp	Gly	Tyr 155	Met	Asn	Phe	Thr	Thr 160
Leu	Glu	Pro	Ile	Gly 165	Val	Cys	Gly	Gln	Ile 170	Ile	Pro	Trp	Asn	Phe	Pro 175
Ile	Met	Met	Leu	Ala	Trp	Lys	Ile	Ala 185	Pro	Ala	Leu	Ala	Met	Gly	Asn 190
Val	Cys	Ile	Leu	Lys	Pro	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Leu	Asn	Ala	Leu	Tyr 205
Phe	Ala	Ser	Leu	Cys	Lys	Lys	Val	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Asn 210
Ile	Val	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Thr	Asn	Asp 240
Pro	Arg	Ile	Arg	Lys	Leu	Ala	Phe	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Val	Gly	Lys 255
Ser	Val	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser	Asn	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Leu 270
Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Ala	His	Leu	Val	Phe	Asp	Asp	Ala	Asn	Ile 285
Lys	Lys	Thr	Leu	Pro	Asn	Leu	Val	Asn	Gly	Ile	Phe	Lys	Asn	Ala	Gly 300
Gln	Ile	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Val	Gln	Glu	Gly	Ile	Tyr 320
Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Phe	Lys	Ala	Tyr	Leu	Glu	Thr	Glu	Ile	Lys 335
Val	Gly	Asn	Pro	Phe	Asp	Lys	Ala	Asn	Phe	Gln	Gly	Ala	Ile	Thr	Asn 350
Arg	Gln	Gln	Phe	Asp	Thr	Ile	Met	Asn	Tyr	Ile	Asp	Ile	Gly	Lys	Lys 365
Glu	Gly	Ala	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Lys	Val	Gly	Asp	Lys	Gly 380
Tyr	Phe	Ile	Arg	Pro	Thr	Val	Phe	Tyr	Asp	Val	Asn	Glu	Asp	Met	Arg 400

ES 2 739 894 T3

Ile Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe
405 410 415

Lys Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly
420 425 430

Leu Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val
435 440 445

Ala Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp
450 455 460

Phe Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly
465 470 475 480

Arg Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala
485 490 495

Val Arg Ile Lys Leu
500

<210> 36
<211> 500
5 <212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*
<400> 36

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Thr Glu Asp
50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Thr Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80

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

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile

ES 2 739 894 T3

115					120					125					
Ala	Ile	Asn	Cys	Leu	Arg	Asp	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ala	Asp	Lys	Val	Asn
130						135					140				
Gly	Arg	Thr	Ile	Asn	Thr	Gly	Asp	Gly	Tyr	Met	Asn	Phe	Thr	Thr	Leu
145					150					155					160
Glu	Pro	Val	Gly	Val	Cys	Gly	Gln	Ile	Ile	Pro	Trp	Asn	Phe	Pro	Ile
				165					170					175	
Met	Met	Leu	Ala	Trp	Lys	Ile	Ala	Pro	Ala	Leu	Ala	Met	Gly	Asn	Val
			180					185					190		
Cys	Ile	Leu	Lys	Pro	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Leu	Asn	Ala	Leu	Tyr	Phe
		195					200					205			
Ala	Ser	Leu	Cys	Lys	Lys	Val	Gly	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Val	Asn	Ile
		210				215					220				
Val	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg	Thr	Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Thr	Asn	Asp	Pro
225					230					235					240
Arg	Ile	Arg	Lys	Leu	Ala	Phe	Thr	Gly	Ser	Thr	Glu	Val	Gly	Lys	Ser
				245					250					255	
Val	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Glu	Ser	Asn	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr	Leu	Glu
			260					265					270		
Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Ala	His	Leu	Val	Phe	Asp	Asp	Ala	Asn	Ile	Lys
		275					280					285			
Lys	Thr	Leu	Pro	Asn	Leu	Val	Asn	Gly	Ile	Phe	Lys	Asn	Ala	Gly	Gln
		290				295					300				
Ile	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Val	Gln	Glu	Gly	Ile	Tyr	Asp
305					310					315					320
Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Phe	Lys	Ala	Tyr	Leu	Glu	Thr	Glu	Ile	Lys	Val
				325					330					335	
Gly	Asn	Pro	Phe	Asp	Lys	Ala	Asn	Phe	Gln	Gly	Ala	Ile	Thr	Asn	Arg
			340					345					350		
Gln	Gln	Phe	Asp	Thr	Ile	Met	Asn	Tyr	Ile	Asp	Ile	Gly	Lys	Lys	Glu
		355					360					365			
Gly	Ala	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Lys	Val	Gly	Asp	Lys	Gly	Tyr
		370				375					380				

ES 2 739 894 T3

Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val Asn Glu Asp Met Arg Ile
385 390 395 400

Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val Thr Val Ala Lys Phe Lys
405 410 415

Thr Leu Glu Glu Gly Val Glu Met Ala Asn Ser Ser Glu Phe Gly Leu
420 425 430

Gly Ser Gly Ile Glu Thr Glu Ser Leu Ser Thr Gly Leu Lys Val Ala
435 440 445

Lys Met Leu Lys Ala Gly Thr Val Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Phe
450 455 460

Asp Ser Arg Val Pro Phe Gly Gly Val Lys Gln Ser Gly Tyr Gly Arg
465 470 475 480

Glu Met Gly Glu Glu Val Tyr His Ala Tyr Thr Glu Val Lys Ala Val
485 490 495

Arg Ile Lys Leu
500

<210> 37
<211> 500
<212> PRT
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 37

Met Thr Lys Leu His Phe Asp Thr Ala Glu Pro Val Lys Ile Thr Leu
1 5 10 15

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

Lys Phe Met Lys Ala Gln Asp Gly Lys Thr Tyr Pro Val Glu Asp Pro
35 40 45

Ser Thr Glu Asn Thr Val Cys Glu Val Ser Ser Ala Thr Pro Glu Asp
50 55 60

Val Glu Tyr Ala Ile Glu Cys Ala Asp Arg Ala Phe His Asp Thr Glu
65 70 75 80

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

5

10

ES 2 739 894 T3

Ala Asp Glu Leu Glu Ser Gln Ile Asp Leu Val Ser Ser Ile Glu Ala
100 105 110

Leu Asp Asn Gly Lys Thr Leu Ala Leu Ala Arg Gly Asp Val Thr Ile
115 120 125

Ala Ile Asn Cys Leu Arg Asp Ala Ala Ala Tyr Ala Asp Lys Val Asn
130 135 140

Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly Asp Gly Tyr Met Asn Phe Thr Thr Leu
145 150 155 160

Glu Pro Ile Gly Val Cys Gly Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile
165 170 175

Met Met Leu Ala Trp Lys Ile Ala Pro Ala Leu Ala Met Gly Asn Val
180 185 190

Cys Ile Leu Lys Pro Ala Ala Val Thr Pro Leu Asn Ala Leu Tyr Phe
195 200 205

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

Val Pro Gly Pro Gly Arg Thr Val Gly Ala Ala Leu Thr Asn Asp Pro
225 230 235 240

Arg Ile Arg Lys Leu Ala Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Lys Ser
245 250 255

Val Ala Val Asp Ser Ser Glu Ser Asn Leu Lys Lys Ile Thr Leu Glu
260 265 270

Leu Gly Gly Lys Ser Ala His Leu Val Phe Asp Asp Ala Asn Ile Lys
275 280 285

Lys Thr Leu Pro Asn Leu Val Asn Gly Ile Phe Lys Asn Ala Gly Gln
290 295 300

Ile Cys Ser Ser Gly Ser Arg Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Asp
305 310 315 320

Glu Leu Leu Ala Ala Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Thr Glu Ile Lys Val
325 330 335

Gly Asn Pro Phe Asp Lys Ala Asn Phe Gln Gly Ala Ile Thr Asn Arg
340 345 350

Gln Gln Phe Asp Thr Ile Met Asn Tyr Ile Asp Ile Gly Lys Lys Glu

ES 2 739 894 T3

355		360		365											
Gly	Ala	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Gly	Glu	Lys	Val	Gly	Asp	Lys	Gly	Tyr
370						375					380				
Phe	Ile	Arg	Pro	Thr	Val	Phe	Tyr	Asp	Val	Asn	Glu	Asp	Met	Arg	Ile
385					390					395					400
Val	Lys	Glu	Glu	Ile	Phe	Gly	Pro	Val	Val	Thr	Val	Ala	Lys	Phe	Lys
				405					410					415	
Thr	Leu	Glu	Glu	Gly	Val	Glu	Met	Ala	Asn	Ser	Ser	Glu	Phe	Gly	Leu
			420					425					430		
Gly	Ser	Gly	Ile	Glu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Lys	Val	Ala
		435					440					445			
Lys	Met	Leu	Lys	Ala	Gly	Thr	Val	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Asn	Asp	Phe
450						455					460				
Asp	Ser	Arg	Val	Pro	Phe	Gly	Gly	Val	Lys	Gln	Ser	Gly	Tyr	Gly	Arg
465					470					475					480
Glu	Met	Gly	Glu	Glu	Val	Tyr	His	Ala	Tyr	Thr	Glu	Val	Lys	Ala	Val
				485					490					495	
Arg	Ile	Lys	Leu												
			500												

<210> 38
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> *Pichia pastoris*
 <400> 38

5

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

10

ES 2 739 894 T3

Val Arg Gly Arg Trp Leu Tyr Lys Leu Ala Glu Leu Phe Glu Glu His
 85 90 95
 Lys Asp Thr Ile Ala Lys Leu Glu Ser Leu Asp Asn Gly Lys Ala Leu
 100 105 110
 His Cys Ala Gln Phe Asp Leu Asn Leu Val Val Glu Tyr Leu Arg Ser
 115 120 125
 Cys Ala Gly Tyr Ala Asp Lys Val Asp Gly Arg Thr Ile Asn Thr Gly
 130 135 140
 Lys Asp His Leu Asn Phe Thr Lys Arg Glu Pro Leu Gly Val Cys Gly
 145 150 155 160
 Gln Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Ile Leu Met Trp Ala Trp Lys Ile
 165 170 175
 Gly Pro Ala Leu Ala Thr Gly Asn Ala Val Val Leu Lys Pro Ala Ser
 180 185 190
 Ala Thr Pro Leu Thr Ala Leu Tyr Ala Thr Lys Leu Val Lys Glu Ala
 195 200 205
 Gly Ile Pro Ala Gly Leu Val Asn Ile Val Pro Gly Ser Gly Arg Gly
 210 215 220
 Cys Gly Asn Ala Ile Leu Gln His Pro Lys Ile Lys Lys Ile Ala Phe
 225 230 235 240
 Thr Gly Ser Thr Ala Val Gly Ile Asp Val Met Val Ala Ala Ala Thr
 245 250 255
 Phe Asn Leu Lys Lys Val Thr Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser Pro Asn
 260 265 270
 Ile Val Phe Asp Asp Cys Glu Leu Glu Ser Thr Ile Gln Asn Leu Ile
 275 280 285
 Thr Gly Ile Phe Phe Asn Gly Gly Glu Val Cys Cys Ala Gly Ser Arg
 290 295 300
 Ile Tyr Val Gln Glu Gly Ile Tyr Glu Gln Val Leu Ser Lys Phe Lys
 305 310 315 320
 Glu Glu Ile Ser Lys Leu Lys Val Gly Asn Pro Phe Glu Glu Gly Thr
 325 330 335

ES 2 739 894 T3

Tyr Gln Gly Ala Gln Ala Thr Pro Asp Gln Phe Glu Cys Val Leu Gly
340 345 350

Tyr Ile Glu Arg Ala Lys Lys Ala Gly Ala Lys Leu Leu Thr Gly Gly
355 360 365

Asn Arg Ile Gly Thr Lys Gly Tyr Phe Val Glu Pro Thr Val Phe Tyr
370 375 380

Asp Cys Asp Glu Asp Leu Glu Ile Val Lys Asp Glu Ile Phe Gly Pro
385 390 395 400

Val Ala Ser Ile Gly Lys Phe Lys Asp Val Ala Glu Leu Val Glu Lys
405 410 415

Ala Asn Asn Ser Glu Tyr Gly Leu Ala Ala Gly Ile His Thr Gln Asp
420 425 430

Leu Asn Lys Ala Phe Gly Val Ala Asp Gln Leu Glu Ala Gly Ser Val
435 440 445

Trp Ile Asn Thr Tyr Asn Asp Leu His Gln Ser Val Pro Phe Gly Gly
450 455 460

Tyr Lys Thr Ser Gly Ile Gly Arg Glu Met Gly Leu Glu Ala Phe Asp
465 470 475 480

Asn Tyr Thr Gln Val Lys Ala Val Arg Thr Arg Leu Asn Val Pro Thr
485 490 495

Ala

<210> 39

<211> 507

<212> PRT

<213> *Kluyveromyces marxianus*

<400> 39

Met Ser Ser Ser Leu Ala Glu Lys Leu Asn Val Lys Ile Val Glu Gln
1 5 10 15

Lys Pro Val Thr Val Thr Leu Pro Asn Gly Leu Thr Tyr Glu Gln Pro
20 25 30

Thr Gly Leu Phe Ile Asn Asn Gln Phe Ile Arg Ser Gln Asp Gly Ser
35 40 45

Thr Leu Lys Val Glu Asn Pro Ser Thr Glu Glu Ile Ile Val Glu Val
50 55 60

5

10

ES 2 739 894 T3

Gln	Ser	Ala	Thr	Ala	Gln	Asp	Val	Glu	Tyr	Ala	Val	Glu	Ser	Ala	Glu	65	70	75	80
Ala	Ala	Phe	Asn	Ser	Glu	Trp	Ser	Ser	Met	Asp	Pro	Arg	Asn	Arg	Ala	85	90	95	
Ala	Tyr	Leu	Val	Lys	Leu	Ala	Asn	Leu	Ile	Glu	Glu	Lys	Lys	Glu	Leu	100	105	110	
Ile	Ala	Ser	Ile	Glu	Ser	Thr	Asp	Asn	Gly	Lys	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	115	120	125	
Arg	Gly	Asp	Val	Gly	Leu	Val	Ile	Asp	Tyr	Ile	Arg	Ser	Ala	Ala	Gly	130	135	140	
Tyr	Ala	Asp	Lys	Leu	Gly	Gly	Arg	Thr	Ile	Asp	Thr	Gly	Asp	Gly	Tyr	145	150	155	160
Ala	Asn	Phe	Thr	Tyr	Arg	Glu	Pro	Ile	Gly	Val	Cys	Gly	Gln	Ile	Ile	165	170	175	
Pro	Trp	Asn	Phe	Pro	Leu	Met	Met	Leu	Ser	Trp	Lys	Ile	Ala	Pro	Ala	180	185	190	
Leu	Val	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	Ile	Leu	Lys	Pro	Ala	Ser	Pro	Thr	Pro	195	200	205	
Leu	Asn	Ala	Leu	Phe	Phe	Ala	Ser	Leu	Cys	Lys	Glu	Ala	Gly	Ile	Pro	210	215	220	
Ala	Gly	Val	Val	Asn	Ile	Val	Pro	Gly	Pro	Gly	Arg	Ser	Val	Gly	Asp	225	230	235	240
Thr	Ile	Thr	Asn	His	Pro	Lys	Ile	Arg	Lys	Ile	Ala	Phe	Thr	Gly	Ser	245	250	255	
Thr	Asp	Ile	Gly	Arg	Asp	Val	Ala	Ile	Lys	Ala	Ala	Gln	Ser	Asn	Leu	260	265	270	
Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ser	Ala	His	Leu	Val	Phe	275	280	285	
Ala	Asp	Ala	Asn	Ile	Lys	Lys	Thr	Ile	Pro	Asn	Leu	Val	Asn	Gly	Ile	290	295	300	
Phe	Lys	Asn	Ala	Gly	Gln	Ile	Cys	Ser	Ser	Gly	Ser	Arg	Ile	Tyr	Val	305	310	315	320

ES 2 739 894 T3

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

Glu Thr Glu Ile Lys Val Gly Ser Pro Phe Asp Glu Ser Asn Phe Gln
340 345 350

Ala Ala Ile Thr Asn Lys Ala Gln Phe Glu Thr Ile Leu Asn Tyr Ile
355 360 365

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

Val Gly Asn Lys Gly Tyr Phe Ile Arg Pro Thr Val Phe Tyr Asp Val
385 390 395 400

Lys Glu Asp Met Arg Ile Val Lys Glu Glu Ile Phe Gly Pro Val Val
405 410 415

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

Asp Ser Glu Phe Gly Leu Gly Ala Gly Ile Glu Thr Glu Asn Leu Ser
435 440 445

Val Ala Leu Lys Val Ala Lys Arg Leu His Ala Gly Thr Val Trp Ile
450 455 460

Asn Thr Tyr Asn Asp Phe Asp Ala Ala Val Pro Phe Gly Gly Tyr Lys
465 470 475 480

Gln Ser Gly Tyr Gly Arg Glu Met Gly Glu Glu Ala Phe Glu Ser Tyr
485 490 495

Thr Gln Val Lys Ala Val Arg Ile Lys Leu Glu
500 505

<210> 40
<211> 503
<212> PRT
<213> *Schizosaccharomyces pombe*

<400> 40

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

Lys Thr Tyr Ile Gln Pro Val Gly Leu Phe Ile Asn Asn Gln His Val
20 25 30

Asp Ser Val His Gly Gly Arg Val Lys Val Tyr Ser Pro Ser Thr Glu

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

Cys Ala Gly Ser Arg Val Tyr Val Gln Glu Asp Val Tyr Asp Glu Phe
 305 310 315 320
 Ile Lys Arg Met Val Ala Lys Ala Lys Thr Leu Lys Val Gly Asp Pro
 325 330 335
 Phe Ala Glu Asp Thr Phe Gln Gly Ala Gln Val Ser Lys Gln Gln Tyr
 340 345 350
 Glu Arg Ile Val Ser Tyr Ile Glu Ser Gly Ile Ala His Gly Ala Lys
 355 360 365
 Leu Glu Ile Gly Gly Lys Arg His Gly Asn Leu Gly Tyr Phe Val Glu
 370 375 380
 Pro Thr Ile Leu Ser Asn Val Thr Glu Asp Met Ala Val Gly Lys Glu
 385 390 395 400
 Glu Ile Phe Gly Pro Val Leu Ala Val Ile Lys Phe Lys Thr Ile Glu
 405 410 415
 Glu Ala Ile Arg Arg Gly Asn Asn Ser Thr Tyr Gly Leu Ala Ala Gly
 420 425 430
 Val His Thr Asn Asn Ile Thr Asn Ala Ile Lys Val Ser Asn Ala Leu
 435 440 445
 Glu Ala Gly Thr Val Trp Val Asn Cys Tyr Asn Leu Leu His His Gln
 450 455 460
 Ile Pro Phe Gly Gly Tyr Lys Glu Ser Gly Ile Gly Arg Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Ser Tyr Gly Leu Thr Asn Tyr Thr Gln Thr Lys Ala Val His Ile Asn
 485 490 495
 Leu Gly Met Asp Ser Pro Ile
 500

<210> 41
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> *Schizosaccharomyces pombe*

<400> 41

Met Ser Glu Asp Leu Phe Val Ser Ile Asn Phe Pro Asn Gly Lys Ser
 1 5 10 15

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

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

<210> 42
 <211> 1716
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 42

atgttgacta aagctacaaa agagcagaaa tcattggtga aaaatagggg tgcagaactt	60
gttggtgact gtttggtaga acagggcgta acacatgttt ttggtatccc aggtgcaaaa	120
atcgacgccg tgtttgatgc attacaagac aagggtccag aaattattgt tgctagacat	180
gagcaaaatg ccgcatttat ggcgcaagct gtaggtaggc ttacaggtaa acctggtgtt	240
gtcctagtta cgtctggccc aggagcctcc aatttagcaa ctggtctatt gacagcta	300
actgaggag atcctgtagt tgcgttagcc ggtaatgtaa ttagagctga taggcttaag	360
agaactcacc agtctctaga caacgctgct ttattccaac cgatcaccaa gtactcagta	420
gaggtacaag acgtaaagaa tatacctgaa gctgtgacaa acgcatttcg tatagcttct	480
gctggtcagg ctggtgccgc gtttgtttct tttcctcaag acgttgtcaa tgaagtgacc	540
aatactaaaa acgttagagc ggttgcagcc cctaaactag gtccagccgc agacgacgca	600
attagcgctg caattgctaa aattcagacg gcgaaactac cagtagtcct tgtcggtagt	660
aagggcggaa gaccagaagc aataaaagct gttcgtaagt tattgaagaa agtccaatta	720
cctttcgttg agacttacca agcagcaggt actttatcta gagatttaga ggatcagtat	780
tttggaagga taggtctatt tagaaaccaa ccaggagatt tactattaga acaagctgat	840
gttgtagtta ctatcggtta tgatcctata gtagtagacc caaagttttg gaacataaat	900
ggggatagaa caattatata tctagacgag ataatcgccg acatcgatca cgcttatcaa	960
ccagatttag aactaatcgg agatatcccg tcaacaatca atcatattga acatgatgct	1020
gtaaaggttg agttcgctga acgtgagcag aaaatcttat ctgatctaaa gcaatatatg	1080
catgaggggtg aacaagttcc agcagactgg aaatctgacc gtgcacatcc tttggaaatc	1140
gttaaggaac taagaaatgc ggtcgatgat catgtgactg ttacatgtga tatcggttca	1200
catgcaattt ggatgtcacg ttatttttagg agctacgaac cattaacttt aatgatattct	1260
aacgggatgc aaactctggg ggttgcactt ccttgggcta ttggcgctag tttagttaag	1320
cccggtgaga aggtggtatc ggtatcaggt gatggtggct ttctgttttc ggctatggaa	1380
ttagaaactg cagtccgttt aaaagctccc attgtgcata ttgtctggaa tgattctact	1440
tacgacatgg ttgcttttca acagttgaag aaatacaata gaacttcggc tgtagacttt	1500
ggtaacatcg atattgtgaa atatgctgag tcttttggcg caacaggcct gaggtggaa	1560
agtccagatc agttagctga tgtgttgaga caaggatga atgccgagg accggtaatc	1620
atagatgtgc cagttgacta ctcagacaat attaatttgg cttctgataa acttcctaaa	1680
gagtttggcg agctaatagaa gaccaaagcc ttataa	1716

5 <210> 43
 <211> 571
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

ES 2 739 894 T3

<400> 43

```

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

```

ES 2 739 894 T3

Asp Leu Leu Leu Glu Gln Ala Asp Val Val Leu Thr Ile Gly Tyr Asp
 275 280 285
 Pro Ile Glu Tyr Asp Pro Lys Phe Trp Asn Ile Asn Gly Asp Arg Thr
 290 295 300
 Ile Ile His Leu Asp Glu Ile Ile Ala Asp Ile Asp His Ala Tyr Gln
 305 310 315 320
 Pro Asp Leu Glu Leu Ile Gly Asp Ile Pro Ser Thr Ile Asn His Ile
 325 330 335
 Glu His Asp Ala Val Lys Val Glu Phe Ala Glu Arg Glu Gln Lys Ile
 340 345 350
 Leu Ser Asp Leu Lys Gln Tyr Met His Glu Gly Glu Gln Val Pro Ala
 355 360 365
 Asp Trp Lys Ser Asp Arg Ala His Pro Leu Glu Ile Val Lys Glu Leu
 370 375 380
 Arg Asn Ala Val Asp Asp His Val Thr Val Thr Cys Asp Ile Gly Ser
 385 390 395 400
 His Ala Ile Trp Met Ser Arg Tyr Phe Arg Ser Tyr Glu Pro Leu Thr
 405 410 415
 Leu Met Ile Ser Asn Gly Met Gln Thr Leu Gly Val Ala Leu Pro Trp
 420 425 430
 Ala Ile Gly Ala Ser Leu Val Lys Pro Gly Glu Lys Val Val Ser Val
 435 440 445
 Ser Gly Asp Gly Gly Phe Leu Phe Ser Ala Met Glu Leu Glu Thr Ala
 450 455 460
 Val Arg Leu Lys Ala Pro Ile Val His Ile Val Trp Asn Asp Ser Thr
 465 470 475 480
 Tyr Asp Met Val Ala Phe Gln Gln Leu Lys Lys Tyr Asn Arg Thr Ser
 485 490 495
 Ala Val Asp Phe Gly Asn Ile Asp Ile Val Lys Tyr Ala Glu Ser Phe
 500 505 510
 Gly Ala Thr Gly Leu Arg Val Glu Ser Pro Asp Gln Leu Ala Asp Val
 515 520 525
 Leu Arg Gln Gly Met Asn Ala Glu Gly Pro Val Ile Ile Asp Val Pro
 530 535 540
 Val Asp Tyr Ser Asp Asn Ile Asn Leu Ala Ser Asp Lys Leu Pro Lys
 545 550 555 560
 Glu Phe Gly Glu Leu Met Lys Thr Lys Ala Leu
 565 570

ES 2 739 894 T3

<210> 44
 <211> 1476
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 44

atggcgcaatt atttcaacac tctgaacctg cgtcaacaac tggcgcaact gggtaagtgc	60
cgtttcatgg gtcgtgacga gtttgcggaac ggtgcttctt atctgcaagg caagaaggtt	120
gttattgttg gttgcggtgc gcaaggcctg aatcaaggtc tgaatatgcg cgacagcggc	180
ctggacatta gctatgcgct gcgcaaggag gctatcgagg aaaaacgtgc tagctggcgc	240
aaggctactg agaacggctt caaggttggc acctatgagg agctgattcc gcaagctgac	300
ctgggttatca atctgacccc agataaagtg catagcgacg ttgttcgtac tgttcaaccg	360
ctgatgaagg atggtgctgc tctgggttat agccacggct ttaacattgt tgaggtaggt	420
gaacaaattc gcaaggacat tactgttgtt atggtggctc caaagtgtcc gggtagtgag	480
gttcgcgagg aatataagcg cggttttggt gttccaaccc tgatcgcggt gcatccagag	540
aatgacccaa agggtagagg tatggctatc gcgaaggcgt gggctgcggc gactggcggc	600
catcgcgctg gcgttctgga gagcagcttt gtggctgagg ttaagagcga tctgatgggt	660
gaacagacta ttctgtgttg tatgctgcaa gcgggtagcc tgctgtgttt tgataaactg	720
gttgaggagg gcaactgaccc ggcgtatgcg gagaagctga tccaatttgg ctgggagact	780
attactgagg cgctgaagca aggtggtatt actctgatga tggatcgctt gagcaatcca	840
gctaagctgc gcgcgtacgc tctgagcgag caactgaagg aaattatggc accgctgttt	900
caaaaagcaca tggatgatat cattagcggg gagtttagca gcggcatgat ggctgattgg	960
gcgaatgacg acaaaaagct gctgacttgg cgcgaggaaa ctggtaagac tgctttcgag	1020
actgctccac aatacgaggg taagattggt gaacaagaat attttgacaa ggggtgttctg	1080
atgatcgcta tgggttaaggc tgggtgtggag ctggcttttg agactatggg tgacagcggg	1140
attatcgagg aaagcgcgta ctacgagagc ctgcatgaac tgccactgat cgcaataact	1200
attgcgcgca aacgcctgta tgagatgaat gttgtgatta gcgacactgc ggaatatggc	1260
aattacctgt ttagctatgc gtgcgttcca ctgctgaagc cattcatggc ggaactgcag	1320
ccaggtgatc tgggcaaggc gatcccagag ggtgctgttg acaatgggtca gctgcgcgac	1380
gttaatgagg ctatccgttc tcacgctatc gaacaagttg gcaaaaagct gcgtgggttac	1440
atgaccgaca tgaagcgcat cgcggtggct ggctaa	1476

10

<210> 45
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

15

ES 2 739 894 T3

<400> 45

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

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

Met Thr Asp Met Lys Arg Ile Ala Val Ala Gly Leu Glu
485 490

<210> 46
<211> 1476
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 46

atggccaact attttaacac attaaatttg agacaacaat tggctcaact gggtaagtgc	60
agatttatgg gaagggacga gtttgctgat ggtgcttctt atctgcaagg aaagaaagta	120
gtaattgttg gctgcggtgc tcagggtcta aaccaagggt taaacatgag agattcaggt	180
ctggatattt cgtatgcatt gaggaagag tctattgcag aaaaggatgc cgattggcgt	240
aaagcgacgg aaaatgggtt caaagttggt acttacgaag aactgatccc tcaggcagat	300
ttagtgatta acctaacacc agataagggt cactcagacg tagtaagaac agttcaaccg	360
ctgatgaagg atggggcagc tttaggttac tctcatggct ttaatatcgt tgaagtgggc	420
gagcagatca gaaaaggat aacagtcgta atggttgccg caaagtggcc aggtacggaa	480
gtcagagagg agtacaagag gggttttggt gtacctacat tgatcgccgt acatcctgaa	540
aatgacccca aacgtgaagg tatggcaata gcgaaggcat gggcagccgc aaccggaggt	600
catagagcgg gtgtgttaga gagttctttc gtagctgagg tcaagagtga cttaatgggt	660
gaacaaacca ttctgtgcgg aatgttgacg gcaggggtctt tactatgctt tgataaattg	720
gtcgaagagg gtacagatcc tgcctatgct gaaaagttga tacaatttgg ttgggagaca	780
atcaccgagg cacttaaaca aggtggcata acattgatga tggatagact ttcaaaccg	840
gccaagctaa gagcctacgc cttatctgag caactaaaag agatcatggc accattattc	900
caaaagcaca tggacgatat tatctccggt gagttttcct caggaatgat ggcagattgg	960
gcaaacgatg ataaaaagtt attgacgtgg agagaagaaa ccggcaagac ggcattcgag	1020
acagccccac aatacgaagg taaaattggt gaacaagaat actttgataa gggagtattg	1080
atgatagcta tgggtgaaggc aggggtagaa cttgcattcg aaactatggt tgactccggt	1140
atcattgaag aatctgcata ctatgagtct ttgcatgaat tgcctttgat agcaaatact	1200
attgcaagaa aaagacttta cgagatgaat gttgtcatat cagacactgc agaatatggt	1260
aattacttat ttagctacgc gtgtgtcccg ttgttagagc ccttcatggc cgagttacaa	1320
cctggtgatt tggggaaggc tattccggaa ggagcgggtg acaatggcca actgagagac	1380
gtaaatgaag ctattcgttc gcatgctata gaacagggtg gtaaaaagct gagaggatat	1440
atgaccgata tgaaaagaat tgcagtggca ggatga	1476

<210> 47
<211> 491
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

ES 2 739 894 T3

<400> 47

```

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

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

Ser Tyr Leu Gln Gly Lys Lys Val Val Ile Val Gly Cys Gly Ala Gln
    35           40           45

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

Tyr Ala Leu Arg Lys Glu Ser Ile Ala Glu Lys Asp Ala Asp Trp Arg
65           70           75           80

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

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

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

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

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

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

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

Ala Trp Ala Ala Ala Thr Gly Gly His Arg Ala Gly Val Leu Glu Ser
    195           200           205

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

Leu Cys Gly Met Leu Gln Ala Gly Ser Leu Leu Cys Phe Asp Lys Leu
225           230           235           240

Val Glu Glu Gly Thr Asp Pro Ala Tyr Ala Glu Lys Leu Ile Gln Phe
    245           250           255

```

ES 2 739 894 T3

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

<210> 48
 <211> 1647
 <212> ADN

ES 2 739 894 T3

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 48

atgtatactg ttggtgatta tctgctggac cgtctgcatg aactgggtat cgaagaaatc	60
ttcggcggttc cgggtgatta caatctgcag ttcctggatc agatcatctc tcataaagac	120
atgaaatggg tgggtaacgc taacgaactg aacgcaagct acatggcaga tggttatgca	180
cgtaccaaga aagccgcggc atttctgacc actttcgggtg ttggcgaact gagcgccgtc	240
aacggtctgg cgggctccta cgccgaaaac ctgccggtgg tggagatcgt aggcagccca	300
acgagcaaaag ttcagaacga aggtaaattc gtccaccaca ctctggctga cggcgatttc	360
aaacacttca tgaaaatgca tgaacctgtg actgcggcac gtacgctgct gactgcagag	420
aacgctactg tggaaatcga ccgcgttctg tctgcgctgc tgaaagaacg caaaccagtt	480
tacatcaacc tgctgtgga tgttgcgga gctaaagcgg aaaaaccgag cctgccgctg	540
aagaaagaaa actccacttc taacactagc gaccaggaaa tcctgaacaa aatccaggag	600
tctctgaaaa acgcaaagaa accaatcgtg atcaccggcc acgaaatcat ttcttttgggt	660
ctggagaaga ccgtgaccca attcatcagc aaaaccaaac tgccgattac caccctgaac	720
ttcggcaagt cctctgttga cgaggctctg ccgtctttcc tgggcatcta caacggtact	780
ctgagcgaac cgaacctgaa agaatttgtt gaatctgcgg acttcatcct gatgctgggc	840
gttaaactga ccgactcttc taccggtgca ttcactcacc atctgaacga aaacaaaatg	900
attagcctga acatcgacga gggtaaaatc ttcaacgagc gtatccagaa cttcgacttc	960
gaaagcctga tcagctctct gctggacctg tccgaaatcg agtataaagg caaatacatt	1020
gacaaaaagc aagaagattt cgtaccatct aacgcactgc tgtcccagga tcgcctgtgg	1080
caggccgtgg agaacctgac ccagagcaat gaaacctcgt tggcggaaca aggtacgagc	1140
tttttcggcg cgtcttctat ctttctgaaa tccaaaagcc attttatcgg tcagccgctg	1200
tggggtagca ttggctatac tttcccgga gcgctgggct ctcagatcgc tgataaagaa	1260
tctcgtcac tgctgttcat cggtgacggt tccctgcagc tgaccgtaca ggaactgggt	1320
ctggcaattc gtgaaaagat caaccgatt tgcttcatta ttaacaatga cggctacacc	1380
gttgagcgtg agatccacgg tccgaaccag tcttacaacg atatccctat gtggaactac	1440
tctaaactgc cggagtccct cggcgcaact gaggaccgtg ttgtgtctaa aattgtgcgt	1500
accgaaaacg aatttgtgag cgtgatgaaa gagggccagg ccgatccgaa ccgtatgtac	1560
tggatcgaac tgatcctggc gaaagaaggc gcaccgaagg tactgaagaa aatgggcaag	1620
ctgtttgctg aacagaataa atcctaa	1647

5

<210> 49

<211> 548

ES 2 739 894 T3

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 49

5

```

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 His Lys Asp Met Lys Trp Val 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 Val
 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 Glu 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 Val
130      135      140

Glu Ile Asp Arg Val Leu Ser Ala 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

Ser Leu Pro Leu Lys Lys Glu Asn Ser Thr Ser Asn Thr Ser Asp Gln
180      185      190

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

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

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

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

```

ES 2 739 894 T3

Tyr Asn Gly Thr Leu Ser Glu Pro Asn Leu Lys Glu 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 Asn Glu Asn Lys Met Ile Ser Leu Asn
 290 295 300
 Ile Asp Glu Gly Lys Ile Phe Asn Glu Arg Ile Gln Asn Phe Asp Phe
 305 310 315 320
 Glu Ser Leu Ile Ser Ser Leu Leu Asp Leu Ser Glu Ile Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Gly Lys Tyr Ile Asp Lys Lys Gln Glu Asp Phe Val Pro Ser Asn Ala
 340 345 350
 Leu Leu Ser Gln Asp Arg Leu Trp Gln Ala Val Glu Asn 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 Ser Ile Phe Leu Lys Ser Lys Ser His 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 Ala Ile Arg Glu Lys Ile 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 Asn Gln Ser Tyr Asn Asp Ile Pro Met Trp Asn Tyr
 465 470 475 480
 Ser Lys Leu Pro Glu Ser 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 Pro Asn Arg Met Tyr Trp Ile Glu Leu Ile Leu Ala Lys
 515 520 525
 Glu Gly Ala Pro Lys Val Leu Lys Lys Met Gly Lys Leu Phe Ala Glu
 530 535 540
 Gln Asn Lys Ser
 545

<211> 1713
 <212> ADN
 <213> *Lactococcus lactis*

5 <400> 50

atggagtttta	agtataacgg	caaagttgaa	tctgttgaac	tgaataagta	cagcaaaacg	60
ttgacacaag	atccccacaca	accgccaca	caggcaatgt	attacggcat	cgggtttaaa	120
gacgaagatt	tcaagaaagc	tcaagtgggt	atagtgtcga	tggactggga	tggaaatcca	180
tgcaacatgc	atthaggaac	ccttggatca	aagattaaaa	gctcagtaaa	tcagacagat	240
ggctctgatcg	gcttacaatt	tcatacgata	ggagtttctg	atgggatagc	aaatggaaag	300
ttgggaatga	gatactccct	tgtttccaga	gaagttatag	ctgactctat	tgaaaccaac	360
gctggcgctg	aatactatga	tgcaattgta	gccatcccag	gttgtgacaa	aaatatgcca	420
ggttctatta	ttggatatggc	aagacttaat	aggccaagca	ttatgggtgta	tggaggaaca	480
atagaacacg	gtgaatataa	aggtgagaaa	ttgaacatcg	tatcggcttt	tgaatctcta	540
ggccagaaaa	ttaccggcaa	tatctctgat	gaagattatc	acggtgttat	ttgtaatgct	600
attcctggtc	aaggggcatg	tgggggggatg	tacacagcta	ataccttagc	tgccgctatc	660
gaaacactag	gtatgtcatt	gccgtattct	tcttcgaacc	ctgcagtatc	tcaagaaaaa	720
caagaagaat	gtgatgagat	tggattagcc	attaagaatc	ttttggaaaa	agacatcaag	780
cctagtgata	taatgactaa	ggaggcggtc	gagaacgcta	ttaccattgt	gatggctctg	840
gggggtagta	ctaattgctgt	cttgcataatt	attgcaatgg	ctaacgcgat	aggtgtcgaa	900
ataactcagg	atgacttcca	aagaattagt	gacattactc	cagtactagg	tgattttaaa	960
ccttcaggta	aatatatgat	ggaagatttg	cataaaattg	gaggcttgcc	agcagtgcct	1020
aagtaccttc	taaaggaagg	aaaattgcat	ggtgactgcc	ttactgtgac	gggtaaaaca	1080
ttagccgaga	atgtcgagac	tgccctagac	ttggatttcg	actcacaaga	tatcatgagg	1140
ccactaaaga	atcctatcaa	ggccaccggc	cacttgacaga	ttctgtacgg	taatttagct	1200
caaggggggtt	ccgtagcaaa	aattagcggt	aaagaaggag	agttcttcaa	aggcactgcc	1260
agagtctttg	atgggtgaaca	acattttatc	gacggcatag	aatctggtcg	tttgcagtct	1320
ggagatgtag	cggtaattag	gaatataggt	cccgtcggcg	gacctggtat	gcccgaatg	1380
ctgaagccta	catcagcatt	aattgggtgcg	ggtttaggga	aaagttgcgc	gttaattacg	1440

gatggtagat tctccggtgg cactcacggt tttgttgtcg gccatattgt gcctgaagcc 1500
 gttgagggtg gactaatcgg cttagttgaa gatgacgata taatagagat agatgcagtc 1560
 aacaactcta tatccctgaa agtttccgat gaagaaatcg caaagagaag agctaattat 1620
 cagaagccaa ctccgaaagc caccagggga gttttggcaa aattcgctaa attaaccctg 1680
 cctgcatcgg aagggtgtgt tactgatctg taa 1713

<210> 51
 <211> 570
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*

<400> 51

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

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

Ile Gly Pro Val Gly Gly Pro Gly Met Pro Glu Met Leu Lys Pro Thr
450 455 460

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

Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Thr His Gly Phe Val Val Gly His Ile
485 490 495

Val Pro Glu Ala Val Glu Gly Gly Leu Ile Gly Leu Val Glu Asp Asp
500 505 510

Asp Ile Ile Glu Ile Asp Ala Val Asn Asn Ser Ile Ser Leu Lys Val
515 520 525

Ser Asp Glu Glu Ile Ala Lys Arg Arg Ala Asn Tyr Gln Lys Pro Thr
530 535 540

Pro Lys Ala Thr Arg Gly Val Leu Ala Lys Phe Ala Lys Leu Thr Arg
545 550 555 560

Pro Ala Ser Glu Gly Cys Val Thr Asp Leu
565 570

<210> 52
<211> 1701
<212> ADN
<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 52
atgaagaagc tcaacaagta ctggtatata atcactgaac ctaagggcca aggtgcgtcc 60
caggccatgc tttatgccac cggtttcaag aaggaagatt tcaagaagcc tcaagtcggg 120
gttggttctt gttggtggtc cggtaaccca tgtaacatgc atctattgga cttgaataac 180
agatgttctc aatccattga aaaagcgggt ttgaaagcta tgcagttcaa caccatcggt 240
gtttcagacg gtatctctat ggggtactaaa ggtatgagat actcgttaca aagtagagaa 300
atcattgcag actcctttga aaccatcatg atggcacaac actacgatgc taacatcgcc 360
atcccatcat gtgacaaaaa catgcccggt gtcattgatg ccatgggtag acataacaga 420
ccttccatca tgggtatatg tgggtactatc ttgcccggtc atccaacatg tgggttcttcg 480
aagatctcta aaaacatcga tatcgtctct gcgttccaat cctacggtga atatatttcc 540
aagcaattca ctgaagaaga aagagaagat gttgtggaac atgcatgccc aggtcctggt 600
tcttgtggtg gtatgtatac tgccaacaca atggcttctg ccgctgaagt gctaggtttg 660
accattccaa actcctcttc cttcccagcc gtttccaagg agaagttagc tgagtgtgac 720
aacattqgtg aatacatcaa gaaqacaatg qaattqgqta ttttacctcg tqatatcctc 780

ES 2 739 894 T3

```

acaaaagagg cttttgaaaa cgccattact tatgtcgttg caaccggtgg gtccactaat      840
gctgttttgc atttggtggc tgttgctcac tctgcgggtg tcaagttgtc accagatgat      900
ttccaaagaa tcagtgatac tacaccattg atcggtgact tcaaaccctt tggtaaatac      960
gtcatggccg atttgattaa cgttggtggt acccaatctg tgattaagta tctatatgaa     1020
aacaacatgt tgcacggtaa cacaatgact gttaccggtg acactttggc agaacgtgca     1080
aagaaagcac caagcctacc tgaaggacaa gagattatta agccactctc ccaccaatc     1140
aaggccaacg gtcacttgca aattctgtac ggttcattgg caccagggtg agctgtgggt     1200
aaaattaccg gtaaggaagg tacttacttc aagggtagag cacgtgtgtt cgaagaggaa     1260
ggtgccttta ttgaagcctt ggaaagaggt gaaatcaaga aggggtgaaaa aaccgttggt     1320
gttatcagat atgaagggtc aagaggtgca ccaggtatgc ctgaaatgct aaagccttcc     1380
tctgctctga tgggttacgg tttgggtaaa gatgttgcat tgttgactga tggtagattc     1440
tctggtggtt ctcacgggtt cttaatcggc cacattgttc ccgaagccgc tgaaggtggt     1500
cctatcgggt tggtcagaga cggcgatgag attatcattg atgctgataa taacaagatt     1560
gacctattag tctctgataa ggaaatggct caacgtaaac aaagttgggt tgcacctcca     1620
cctcgttaca caagaggtac tctatccaag tatgctaagt tggtttccaa cgcttccaac     1680
ggttgtgttt tagatgcttg a                                           1701

```

<210> 53
 <211> 566
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*
 <400> 53

```

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

Gln Gly Ala Ser Gln Ala Met Leu Tyr Ala Thr Gly Phe Lys Lys Glu
      20              25              30

Asp Phe Lys Lys Pro Gln Val Gly Val Gly Ser Cys Trp Trp Ser Gly
      35              40              45

Asn Pro Cys Asn Met His Leu Leu Asp Leu Asn Asn Arg Cys Ser Gln
 50              55              60

Ser Ile Glu Lys Ala Gly Leu Lys Ala Met Gln Phe Asn Thr Ile Gly
65              70              75              80

Val Ser Asp Gly Ile Ser Met Gly Thr Lys Gly Met Arg Tyr Ser Leu
      85              90              95

Gln Ser Arg Glu Ile Ile Ala Asp Ser Phe Glu Thr Ile Met Met Ala

```

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

Gly Gln Glu Ile Ile Lys Pro Leu Ser His Pro Ile Lys Ala Asn Gly
370 375 380

His Leu Gln Ile Leu Tyr Gly Ser Leu Ala Pro Gly Gly Ala Val Gly
385 390 395 400

Lys Ile Thr Gly Lys Glu Gly Thr Tyr Phe Lys Gly Arg Ala Arg Val
405 410 415

Phe Glu Glu Glu Gly Ala Phe Ile Glu Ala Leu Glu Arg Gly Glu Ile
420 425 430

Lys Lys Gly Glu Lys Thr Val Val Val Ile Arg Tyr Glu Gly Pro Arg
435 440 445

Gly Ala Pro Gly Met Pro Glu Met Leu Lys Pro Ser Ser Ala Leu Met
450 455 460

Gly Tyr Gly Leu Gly Lys Asp Val Ala Leu Leu Thr Asp Gly Arg Phe
465 470 475 480

Ser Gly Gly Ser His Gly Phe Leu Ile Gly His Ile Val Pro Glu Ala
485 490 495

Ala Glu Gly Gly Pro Ile Gly Leu Val Arg Asp Gly Asp Glu Ile Ile
500 505 510

Ile Asp Ala Asp Asn Asn Lys Ile Asp Leu Leu Val Ser Asp Lys Glu
515 520 525

Met Ala Gln Arg Lys Gln Ser Trp Val Ala Pro Pro Pro Arg Tyr Thr
530 535 540

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

Gly Cys Val Leu Asp Ala
565

<210> 54

<211> 771

<212> ADN

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 54

atgtcgttta ctttgaccaa caagaacgtg attttcgttg ccggtctggg aggcattggt 60

ctggacacca gcaaggagct gctcaagcgc gatctgaaga acctggtgat cctcgaccgc 120

attgagaacc cggctgccat tgccgagctg aaggcaatca atccaaagggt gaccgtcacc 180

```

ttctaccct atgatgtgac cgtgcccatt gccgagacca ccaagctgct gaagaccatc 240
ttcgcccagc tgaagaccgt cgatgtcctg atcaacggag ctggtatcct ggacgatcac 300
cagatcgagc gcaccattgc cgtcaactac actggcctgg tcaacaccac gacggccatt 360
ctggacttct gggacaagcg caagggcggt cccggtggtg tcatctgcaa cattggatcc 420
gtcactggat tcaatgcat ctaccagggt cccgtctact ccggcaccaa ggccgccgtg 480
gtcaacttca ccagctccct ggcgaaactg gccccatta ccggcgtgac ggcttacact 540
gtgaaccccg gcatcaccgg caccaccctg gtgcacacgt tcaactcctg gttggatgtt 600
gagcctcagg ttgccgagaa gctcctgggt catccacccc agccctcgtt ggcctgcgcc 660
gagaacttcg tcaaggctat cgagctgaac cagaacggag ccactctgga actggacttg 720
ggcaccctgg aggccatcca gtggaccaag cactgggact ccggcatcta a 771

```

<210> 55

<211> 256

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 55

```

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

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

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

Glu Leu Lys Ala Ile Asn Pro Lys Val Thr Val Thr Phe Tyr Pro Tyr
50          55          60

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

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

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

Leu Val Asn Thr Thr Thr Ala Ile Leu Asp Phe Trp Asp Lys Arg Lys
115          120          125

Gly Gly Pro Gly Gly Ile Ile Cys Asn Ile Gly Ser Val Thr Gly Phe
130          135          140

```

ES 2 739 894 T3

Asn Ala Ile Tyr Gln Val Pro Val Tyr Ser Gly Thr Lys Ala Ala Val
145 150 155 160

Val Asn Phe Thr Ser Ser Leu Ala Lys Leu Ala Pro Ile Thr Gly Val
165 170 175

Thr Ala Tyr Thr Val Asn Pro Gly Ile Thr Arg Thr Thr Leu Val His
180 185 190

Thr Phe Asn Ser Trp Leu Asp Val Glu Pro Gln Val Ala Glu Lys Leu
195 200 205

Leu Ala His Pro Thr Gln Pro Ser Leu Ala Cys Ala Glu Asn Phe Val
210 215 220

Lys Ala Ile Glu Leu Asn Gln Asn Gly Ala Ile Trp Lys Leu Asp Leu
225 230 235 240

Gly Thr Leu Glu Ala Ile Gln Trp Thr Lys His Trp Asp Ser Gly Ile
245 250 255

<210> 56

<211> 1023

<212> ADN

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 56

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa	60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat	120
accgatttgc acgttgcagc aggtgattat ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat	180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttca agttggtgat	240
cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt	300
aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaaat gcaggatatt cagttgatgg cggaatggct	360
gaagaagcaa ttgttggtgc cgattatgct gtcaaagtgc ctgacggact tgaccaat	420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga	480
gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaat ttagcaatt	540
caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa	600
ttaaatttag ctaaaaaat tggagctgat gtgattatca attctggtga tgtaaatacca	660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct	720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaatgggt	780
gctgtggcac ttccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga	840
gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt	900
ggagcagaag gtaaggtaaa accaattggt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat	960

ES 2 739 894 T3

attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020

taa 1023

<210> 57

<211> 340

5 <212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 57

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50 55 60

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

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100 105 110

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

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

10

ES 2 739 894 T3

Ala	Asp	Val	Ile	Ile	Asn	Ser	Gly	Asp	Val	Asn	Pro	Val	Asp	Glu	Ile
210						215					220				
Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	Gln	Ser	Ala	Ile	Val	Cys	Ala
225					230					235					240
Val	Ala	Arg	Ile	Ala	Phe	Glu	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Lys	Pro	Met
				245					250					255	
Gly	Lys	Met	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Pro	Asn	Thr	Glu	Met	Thr	Leu	Ser
			260					265					270		
Val	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Asp	Gly	Val	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Leu	Val
		275					280					285			
Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Gln	Phe	Gly	Ala	Glu	Gly
	290					295					300				
Lys	Val	Lys	Pro	Ile	Val	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp
305					310					315					320
Ile	Ile	Asp	Glu	Met	Lys	Ala	Gly	Lys	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Val	Ile
				325					330					335	
Asp	Phe	Thr	Lys												
			340												

<210> 58
 <211> 1041
 <212> ADN
 <213> *Lactococcus lactis*

<400> 58

atgaaggctg	cagttgtccg	tcacaatcct	gatgggtacg	ctgatcttgt	agaaaaagag	60
ttgagggcca	ttaagccaaa	tgaggcattg	ttggatatgg	aatactgcgg	tgtctgtcac	120
actgacctac	atgttgctgc	cggagattac	ggcaacaagg	cagggacagt	tttaggacat	180
gaaggtatag	gtattgtgaa	agagattggt	gccgatgtta	gttctctcca	agtaggtgat	240
agagtgagtg	ttgcttggtt	tttcgaaggg	tgtggacatt	gcgaatactg	tgtgtcaggt	300
aacgagacat	tttgccgaga	agtcaaaaac	gctggttata	gcgttgatgg	tggaatggca	360
gaggaagcaa	tcgtgggtgc	agattatgcc	gtcaaagtcc	cagatggcct	agatccaata	420
gaagcatcat	ctataacttg	tgcaggcgtc	accacttaca	aagctatcaa	ggtgtctggc	480
gttaagccag	gagactggca	agttatcttc	ggagctgggtg	gcctgggcaa	cttagctatc	540
cagtacgcca	aaaacgtatt	tggtgcgaag	gtgatcgctg	tagatatcaa	tcaagataag	600
ctcaatcttg	ccaaaaagat	aggtgctgat	gtcatcatta	actctggtga	cgtaaaccct	660
gtagacgaaa	tcaaaaagat	cactggcggt	ttaggtgttc	aatccgcgat	tgtatgtgcc	720

gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780
gccgttgctt tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840
gttgaagtag caggtagtct tgttgggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900
ggtgcagaag ggaagggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020
caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 59
<211> 346
<212> PRT
<213> *Lactococcus lactis*
<400> 59

5

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

10

ES 2 739 894 T3

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

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

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 60
<211> 1041
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 60

ES 2 739 894 T3

```

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag      60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgctg tgtctgtcac      120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat      180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat      240
agagtgagtg ttgcttggtt ttctgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt      300
aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca      360
gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata      420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc      480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc      540
cagtacgcca aaaacgtatt tgggtcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag      600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct      660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggg ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc      720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta      780
gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga      840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc      900
ggtgcagaag ggaagggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac      960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag     1020
caccaccacc accaccacta a                                     1041

```

5 <210> 61
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*

10 <400> 61

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
 1          5          10          15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
 35          40          45

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

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

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
 85          90          95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
 100         105         110

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

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
 130         135         140

```

ES 2 739 894 T3

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145 150 155 160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

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

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 62
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador oGV698

<400> 62
actcgccgat agtggaacc gacg

5	<210> 63 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador OGV1965 <400> 63 caaactgtga tggacgacac c	21
15	<210> 64 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador OGV2631 <400> 64 caatacgtta tgccgtaatg aag	23
25	<210> 65 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador OGV2632 <400> 65 gctttttacc cattattgat atagtgttta agcgaatg	38
35	<210> 66 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador OGV2633 <400> 66 cactatatca ataatgggta aaaagcctga actcac	36
45	<210> 67 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador OGV2634 <400> 67 ttatttccttt gccctcggac g	21
55	<210> 68 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador OGV2680 <400> 68	

	tgcactgctg tcttcacttc	20
5	<210> 69 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador OGV2796 <400> 69 tgtcagcgct tcagactc	18
15	<210> 70 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador OGV2797 <400> 70 aagtattttt aaggattcgc tc	22
25	<210> 71 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador OGV2798 <400> 71 cttcattacg gcataacgta ttgaagtatt tttaaggatt cgctc	45
35	<210> 72 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador OGV2800 <400> 72 cgtccgagggg caaaggaata agatagttat cattatgtaa gtgcg	45
45	<210> 73 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador OGV2801 <400> 73 gggagtttag caatcagc	18
55	<210> 74 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

	<223> cebador OGV2802	
	<400> 74	
5	tggttgaccc gcaaacttc	19
	<210> 75	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2803	
	<400> 75	
15	acaatctccc tgtctcctcc c	21
	<210> 76	
	<211> 24	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2804	
25	<400> 76	
	aaggtgattt ggcacaaatt ttac	24
	<210> 77	
	<211> 25	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador OGV2805	
	<400> 77	
	ggtacaattc tgcctgaat tgtag	25
	<210> 78	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador OGV2806	
	<400> 78	
	aggtcctaga aatcccttaa g	21
	<210> 79	
50	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> cebador OGV2808	
	<400> 79	
60	cttcattacg gcataacgta ttgcgatatc agtatacaag gtaggc	46
	<210> 80	
	<211> 44	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2810	
5	<400> 80	
	cgtccgaggg caaaggaata aggatttaag atgagtggta ttgg	44
10	<210> 81	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador OGV2811	
	<400> 81	
	tgttcgtaac ttttgtcatc ac	22
20	<210> 82	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador OGV2812	
	<400> 82	
	tcagcatgcg gaacaattg	19
30	<210> 83	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador OGV2813	
	<400> 83	
	tccacacggt atcatacgat c	21
40	<210> 84	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2814	
50	<400> 84	
	gcggtcgaca agttcaatat g	21
	<210> 85	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2815	
60	<400> 85	
	tactgagccg ccaaccttag ta	22

	<210> 86	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador OGV2816	
	<400> 86	
10	cataactata cccgtacgca g	21
	<210> 87	
	<211> 45	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2818	
	<400> 87	
20	cttcattacg gcataacgta ttgagcgtag atctactgaa catgc	45
	<210> 88	
	<211> 40	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2820	
30	<400> 88	
	cgtccgaggg caaaggaata acatgagatt gtcaaagagg	40
	<210> 89	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador OGV2821	
	<400> 89	
	caccaggctt attgatgacc	20
45	<210> 90	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> cebador OGV2822	
	<400> 90	
	cattaccggc agttgctc	18
55	<210> 91	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador OGV2824	
	<400> 91	

	tatgacagtg cctatcaagc	20
5	<210> 92 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador OGV2825 <400> 92 aatgggttct accagtatc	19
15	<210> 93 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador OGV2826 <400> 93 aagccgggaa cgtgcgtaac	20
25	<210> 94 <211> 43 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador OGV2827 <400> 94 cttcattacg gcataacgta ttgggaacgc gtaatggtgc ttg	43
35	<210> 95 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador OGV2828 <400> 95 cgtccgaggg caaaggaata acccgagttg actgctcatt g	41
45	<210> 96 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador OGV2829 <400> 96 aataactcgcc gaggcgtagg	20
55	<210> 97 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

	<223> cebador OGV2830	
	<400> 97	
5	ttggagctgg gaggtaaatc	20
	<210> 98	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2831	
	<400> 98	
15	tgcgggctaac ccatattgag	20
	<210> 99	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2832	
25	<400> 99	
	tacgctgagc gtagtacaac	20
	<210> 100	
	<211> 22	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2833	
35	<400> 100	
	taaagcgctg ggtggacaac cg	22
	<210> 101	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador OGV2834	
	<400> 101	
	gcaccgagac gtcattgttg	20
50	<210> 102	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> cebador OGV2835	
	<400> 102	
60	cttcattacg gcataacgta ttgtaaacac gccaggcttg acc	43
	<210> 103	
	<211> 41	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2836	
5	<400> 103	
	cgtccgaggg caaaggaata atccattcgg tgggtgtaag c	41
10	<210> 104	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador OGV2837	
	<400> 104	
	atggcgaaat ggcagtactc	20
20	<210> 105	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador OGV2838	
	<400> 105	
	accaacgacc caagaatc	18
30	<210> 106	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador OGV2839	
	<400> 106	
40	ctttgcgaca gtgacaac	18
	<210> 107	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2840	
50	<400> 107	
	cctcacgtaa gggcatgata g	21
	<210> 108	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV2841	
60	<400> 108	
	gcattgcagc ggtattgtca gg	22
	<210> 109	

	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> cebador OGV2842		
	<400> 109		
	cagcagccac atagtataacc	20	
10	<210> 110		
	<211> 43		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> cebador OGV2843		
	<400> 110		
	cttcattacg gcataacgta ttgagccgtc gtttgacatg ttg	43	
20	<210> 111		
	<211> 41		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador OGV2844		
	<400> 111		
	cgtccgaggg caaaggaata acgctccatt tggagggatc g	41	
	<210> 112		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> cebador OGV2845		
	<400> 112		
	gaatgcgctt gctgctaggg	20	
40	<210> 113		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> cebador OGV2846		
	<400> 113		
	cagctcttgc tgcaggtaac ac	22	
50	<210> 114		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> cebador OGV2847		
	<400> 114		
60			

	ggcacaatct tggagccgtt ag	22
5	<210> 115 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador OGV2848 <400> 115 accaagccat caaggttgtc	20
15	<210> 116 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador OGV2849 <400> 116 tgggtgatgg tttggcgaat gc	22
25	<210> 117 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador OGV2896 <400> 117 gaaatgatga catgtggaaa tataacag	28
35	<210> 118 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador 893 <400> 118 ggatgtgaag tcgttgacac ag	22
45	<210> 119 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador 2231 <400> 119 ttgaaacgtt ggggccatac	20
55	<210> 120 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

	<223> cebador 2232	
	<400> 120	
5	ttcaccgtgt gctagagaac	20
	<210> 121	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 2862	
	<400> 121	
15	ttatacagga aacttaatag aacaaatc	28
	<210> 122	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 2867	
25	<400> 122	
	tgaaacagca tggcgcataag	20
	<210> 123	
30	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador 2869	
	<400> 123	
	ctgtgtcaac gacttcacat ccgaggtaac gaggaacaag cc	42
40	<210> 124	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador 2870	
	<400> 124	
	tttcgccggt atattccgta g	21
50	<210> 125	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> cebador 2891	
	<400> 125	
	gttctattaa gtttcctgta taacggcatt gttcaccaga atgtc	45
60	<210> 126	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 2902	
5	<400> 126	
	tcccgacggc tgctagaatg	20
10	<210> 127	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador 2904	
	<400> 127	
	cgctcccccatt taattatata	20
20	<210> 128	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador 2913	
	<400> 128	
	gaaaggctct tggcagtgac	20
30	<210> 129	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador 2914	
	<400> 129	
	gccctggtgc aattagaatg	20
40	<210> 130	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 2915	
50	<400> 130	
	tcagaggggt gatgagtaag	20
55	<210> 131	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 2916	
60	<400> 131	
	ggccaaagggt aaggagaacg	20

5	<210> 132 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador 821	
10	<400> 132 cgggtaatta acgacaccct agagg	25
15	<210> 133 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador 2320	
20	<400> 133 ggctgtgtag aagtactcgc cgatag	26
25	<210> 134 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador 3065	
	<400> 134 aaaaaggagt agaaacattt tgaagctatg cgttgataag ggcaacaacg ttagtatc	58
35	<210> 135 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador 3066	
	<400> 135 atactaacgt tggtgccctt atcaacgcat agcttcaaaa tgtttctact ccttttttac	60
45	<210> 136 <211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador 3067	
55	<400> 136 tcaaattttt cttttttttc tgtacagtta cccaagctgt tttgcctatt ttcaaagc	58
60	<210> 137 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador 3068	
	<400> 137	

	gctttgaaaa taggcaaaac agcttgggta actgtacaga aaaaaaagaa aaatttg	57
5	<210> 138 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador 3069 <400> 138 agttcaaatac agttcgagga taattttaag	29
15	<210> 139 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador 3070 <400> 139 ttaataaatg ctcaaaagaa aaaaggctgg cg	32
25	<210> 140 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador 3103 <400> 140 accggtgctt ctgcaggtat tg	22
35	<210> 141 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador 3106 <400> 141 atgcttggtt ggaagcaaat ac	22
45	<210> 142 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador 3498 <400> 142 atgtctcaag gtagaagagc tg	22
55	<210> 143 <211> 52 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

	<223> cebador 3137	
	<400> 143	
5	ggagtagaaa cattttgaag ctatgtatat cttctgaatc aattgcaccg ac	52
	<210> 144	
	<211> 55	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 3140	
	<400> 144	
15	caaatttttc ttttttttct gtacagagag gtatgattaa taccaatgtc ttggg	55
	<210> 145	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 3499	
25	<400> 145	
	tcattcacca cggtaaatgt gg	22
	<210> 146	
	<211> 52	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador 3138	
	<400> 146	
	gtcggtgcaa ttgattcaga agatatacat agcttcaaaa tgtttctact cc	52
	<210> 147	
40	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador 3139	
	<400> 147	
	gtattaatca tacctctctg tacagaaaa aaagaaaaat ttgaaatata aataacg	57
50	<210> 148	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> cebador 3501	
	<400> 148	
	gaaggaaatt ccagtctcct agttcctttg aacac	35
60	<210> 149	
	<211> 26	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 2320	
5	<400> 149	
	ggctgtgtag aagtactcgc cgatag	26
10	<210> 150	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador 3500	
	<400> 150	
	cagaacaatc aatcaacgaa cgaacgaccc accc	34
20	<210> 151	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador 821	
	<400> 151	
	cgggtaatta acgacaccct agagg	25
30	<210> 152	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador 3141	
	<400> 152	
40	aaggagatgc ttggtttgta gcaaacacc	29
	<210> 153	
	<211> 58	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV3065	
50	<400> 153	
	aaaaaggagt agaaacatctt tgaagctatg cgttgataag ggcaacaacg ttagtatc	58
	<210> 154	
	<211> 60	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador OGV3066	
60	<400> 154	
	atactaacgt tgttgccctt atcaacgcat agcttcaaaa tgtttctact ccttttttac	60
	<210> 155	

	<211> 58 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador OGV3067	
	<400> 155 tcaaaatTTTT cTTTTTTTTtC tGtAcAgTtA cccaagctgt tttgcctatt ttcaaagc	58
10	<210> 156 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador OGV3068	
	<400> 156 gctttgaaaa taggcAAAac agcttgggta actgtacaga aaaaaaagaa aaatttg	57
20	<210> 157 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador OGV3103	
30	<400> 157 accggtgctt ctgcaggtat tg	22
	<210> 158 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador OGV3106	
40	<400> 158 atgcttgggtt ggaagcaaAT ac	22
45	<210> 159 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador OGV1321	
	<400> 159 aatcatatcg aacacgatgc	20
55	<210> 160 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador OGV1324	
	<400> 160	

	agctggtctg gtgattctac	20
5	<210> 161 <211> 780 <212> ADN <213> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <400> 161	
	atgagccgtt tggatggaaa aacgatttta atcactggtg cctcttctgg aattggaaaa	60
	agcactgctt ttgaaattgc caaagttgcc aaagtaaaac ttattttggc tgctcgcaga	120
	ttttctaccg ttgaagaaat tgcaaaggag ttagaatcga aatatgaagt atcggttctt	180
	cctcttaaat tggatgtttc tgatttgaag tctattcctg gggtaattga gtcattgcc	240
	aaggaatttg ctgatatcga tgtcttgatt aataatgctg gacttgctct aggtaccgat	300
	aaagtcattg atcttaatat tgatgacgcc gttaccatga ttactaccaa tgttcttgg	360
	atgatggcta tgactcgtgc ggttcttcct atattctaca gcaaaaacaa gggatgatt	420
	ttgaacgttg gcagtattgc cggcagagaa tcatacgtag gcggctccgt ttactgctct	480
	accaagtctg cccttgctca attcacttcc gctttgcgta aggagactat tgacactcgc	540
	attcgtatta tggagggttg tcctggcttg gtcgaaaccg aattcagcgt tgtgagattc	600
	cacggagaca aacaaaaggc tgataatgtt tacaaaaata gtgagccttt gacacccgaa	660
	gacattgctg aggtgattct ttttgccctc actcgcagag aaaacgtcgt tattgccgat	720
10	acacttgttt tcccatccca tcaagggtgt gccaatcatg tgtacagaaa gcaagcgtag	780
15	<210> 162 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OGV3490	
20	<400> 162 gtcaagattg ttgaacaaaa gcc	23
25	<210> 163 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OGV3492	
30	<400> 163 gagtaaaaaa ggagtagaaa cattttgaag ctatggttta gtggggttgg ggaagctggc	60
35	<210> 164 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 739 894 T3

	<220>		
	<223> cebador OGV3493		
	<400> 164		
5	caaatttttc ttttttttct gtacaggcca acatcaagaa gactattcca aacttggtc	59	
	<210> 165		
	<211> 25		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador OGV3495		
15	<400> 165		
	tgtatgattc gaaagcttct tcacc	25	
	<210> 166		
	<211> 60		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador OGV3491		
25	<400> 166		
	gccagcttcc ccaaccccac taaaccatag cttcaaaatg tttctactcc ttttttactc	60	
	<210> 167		
30	<211> 59		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> cebador OGV3494		
	<400> 167		
	gaccaagttt ggaatagtct tcttgatggtt ggcctgtaca gaaaaaaaag aaaaatttg	59	
40	<210> 168		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> cebador OGV3497		
	<400> 168		
50	ttactcgagc ttgattctga c	21	
	<210> 169		
	<211> 26		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador OGV2320		
	<400> 169		
60	ggctgtgtag aagtactcgc cgatag	26	
	<210> 170		
	<211> 21		

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> cebador OGV3496		
	<400> 170		
	atgtcttcat cactagcaga g	21	
10	<210> 171		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> cebador OGV0821		
	<400> 171		
	cgggtaatta acgacaccct agagg	25	
20	<210> 172		
	<211> 23		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> cebador OGV0706		
	<400> 172		
30	ggttggtatt ccagctggtg tcg	23	
	<210> 173		
	<211> 24		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador OGV3502		
40	<400> 173		
	gaaacacagt ggattagtgc tgtc	24	
	<210> 174		
	<211> 60		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador OGV3504		
50	<400> 174		
	gaagagtaaa aaaggagtag aaacattttg aagctatgct ctttgtaatt gttgttggtg	60	
	<210> 175		
55	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
60	<223> cebador OGV3505		
	<400> 175		
	caaatttttc ttttttttct gtacaaacag agtccatccg tttgaaactg attgcatgct	60	

5	<210> 176 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OGV3507	
10	<400> 176 tcaaattcta ttatcgcgcg gg	22
15	<210> 177 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OGV3503	
20	<400> 177 caccaacaac aattacaaag agcatagctt caaaatgttt ctactccttt tttactcttc	60
25	<210> 178 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OGV3506	
30	<400> 178 gacatgcaat cagtttcaaa cggatggact ctgtttgtac agaaaaaaaa gaaaaatttg	60
35	<210> 179 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OGV3509	
40	<400> 179 ctcctccgtt gcagaacaag gctttg	26
45	<210> 180 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OGV2320	
50	<400> 180 ggctgtgtag aagtactcgc cgatag	26
55	<210> 181 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador OGV3508	
60		

	<400> 181	
	cggtgttaag tgccagaaat tggttg	26
5	<210> 182 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador OGV0821	
	<400> 182	
	cgggtaatta acgacaccct agagg	25
15	<210> 183 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador OGV3510	
	<400> 183	
25	cggcgtactc gacgtcttga gaagtag	27
30	<210> 184 <211> 1023 <212> ADN <213> <i>Lactococcus lactis</i>	
	<400> 184	
	atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatgggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa	60
	cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat	120
	accgatttgc acgttgcagc aggtgattat ggcaacaaaag cagggactgt tcttggtcat	180
	gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttca agttggtgat	240
	cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt	300
	aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatatt cagttgatgg cggaatggct	360
	gaagaagcaa ttgttggtgc cgattatgct gtcaaagtgc ctgacggact tgaccaatt	420
	gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga	480
	gtaaaacctg gtgattggca agtaatTTTT ggtgctggag gacttgaaa tttagcaatt	540

ES 2 739 894 T3

```

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa      600
ttaaathtag ctaaaaaaat tggagctgat gtgattatca attctggtga tgtaaatacca      660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct      720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaaatgggt      780
gctgtggcac ttccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga      840
gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt      900
ggagcagaag gtaaggtaaa accaattggt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat      960
attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa     1020
taa                                                                    1023

```

<210> 185
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*
 <400> 185

5

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
 1                    5                      10                15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
    35                    40                45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
    50                    55                60

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

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
    85                    90                95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
    100                   105                110

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

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
    130                   135                140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
 145                   150                155                160

```

10

ES 2 739 894 T3

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Ile Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Leu Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

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

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 186

<211> 1041

<212> ADN

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 186

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag	60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac	120
actgacctac atgttgctgc cggagattac ggcaacaagg cagggacagt ttaggacat	180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat	240
agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt	300

ES 2 739 894 T3

```

aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca      360
gaggaagcaa tcgtggttgc agattatgcc gtcaaagtcc cagatggcct agatccaata      420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc      480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc      540
cagtacgcca aaaacgtatt tggcgcaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag      600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcatcatta actctggtga cgtaaacct      660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggg ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc      720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta      780
gccgttgctt tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga      840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc      900
ggtgcagaag ggaagggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac      960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag     1020
caccaccacc accaccacta a                                             1041

```

<210> 187

<211> 346

5 <212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 187

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1              5              10              15

```

```

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

```

```

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
              35              40              45

```

```

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
50              55              60

```

```

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

```

```

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
              85              90              95

```

```

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100              105              110

```

```

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

```

10

ES 2 739 894 T3

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

<210> 188
 <211> 1041
 <212> ADN
 <213> *Lactococcus lactis*
 <400> 188

ES 2 739 894 T3

```

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag      60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgctg tgtctgtcac      120
actgacctac atgttgctgc cggagattac ggcaacaagg caggacaggt tttaggacat      180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat      240
agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt      300
aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctgggtata gcgttgatgg tggaatggca      360
gaggaagcga tcgtgggtgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata      420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc      480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctgggtg gcctgggcaa cttagctatc      540
cagtacgcca aaaacgtatt tgggtgcaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag      600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcatacatta actctgggtga cgtttaccct      660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggg ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc      720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta      780
gccgttgctg tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga      840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc      900
ggtgcagaag ggaagggtta gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac      960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag     1020
caccaccacc accaccacta a                                         1041

```

5 <210> 189
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*

10 <400> 189

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
 1                    5                      10              15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
    35                      40              45

Asp Tyr Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
    50                      55              60

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

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
    85                      90              95

```

ES 2 739 894 T3

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

<210> 190
 <211> 1041

<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 190

5
atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag 60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac 120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat 180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat 240
agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300
aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctggttata gcgttgatgg tggaatggca 360
gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc 540
cagtacgcca aaaacgtatt tggcgcaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgtaaacct 660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggg ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780
gccgttgctc tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900
ggtgcagaag ggaagggtta gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020
caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 191
<211> 346
<212> PRT
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 191

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35 40 45

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

ES 2 739 894 T3

Ile	Val	Lys	Glu	Ile	Gly	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Val	Gly	Asp	65	70	75	80
Arg	Val	Ser	Val	Ala	Trp	Phe	Phe	Glu	Gly	Cys	Gly	His	Cys	Glu	Tyr	85	90	95	
Cys	Val	Ser	Gly	Asn	Glu	Thr	Phe	Cys	Arg	Glu	Val	Lys	Asn	Ala	Gly	100	105	110	
Tyr	Ser	Val	Asp	Gly	Gly	Met	Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	Val	Val	Ala	Asp	115	120	125	
Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Pro	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ile	Glu	Ala	Ser	Ser	130	135	140	
Ile	Thr	Cys	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ile	Lys	Val	Ser	Gly	145	150	155	160
Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Trp	Gln	Val	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly	165	170	175	
Asn	Leu	Ala	Ile	Gln	Tyr	Ala	Lys	Asn	Val	Phe	Gly	Ala	Lys	Val	Ile	180	185	190	
Ala	Val	Asp	Ile	Asn	Gln	Asp	Lys	Leu	Asn	Leu	Ala	Lys	Lys	Ile	Gly	195	200	205	
Ala	Asp	Val	Thr	Ile	Asn	Ser	Gly	Asp	Val	Asn	Pro	Val	Asp	Glu	Ile	210	215	220	
Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	Gln	Ser	Ala	Ile	Val	Cys	Ala	225	230	235	240
Val	Ala	Arg	Ile	Ala	Phe	Glu	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Lys	Pro	Met	245	250	255	
Gly	Lys	Met	Val	Ala	Val	Ala	Leu	Pro	Asn	Thr	Glu	Met	Thr	Leu	Ser	260	265	270	
Val	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Asp	Gly	Val	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Leu	Val	275	280	285	
Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Gln	Phe	Gly	Ala	Glu	Gly	290	295	300	
Lys	Val	Lys	Pro	Ile	Val	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp	305	310	315	320

ES 2 739 894 T3

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

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 192
<211> 1041
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 192

atgaaggctg	cagttgtccg	tcacaatcct	gatgggtacg	ctgatcttgt	agaaaaagag	60
ttgagggcca	ttaagccaaa	tgaggcattg	ttggatatgg	aatactgcgg	tgtctgtcac	120
actgacctac	atgttgctgc	cggagatttc	ggcaacaagg	cagggacagt	tttaggacat	180
gaaggtatag	gtattgtgaa	agagattggg	gccgatgtta	gttctctcca	agtaggtgat	240
agagtgagtg	ttgcttggtt	tttcgaagg	tgtggacatt	gcgaatactg	tgtgtcaggt	300
aacgagacat	tttgccgaga	agtcaaaaac	gctgggtata	gcgttgatgg	tggaatggca	360
gaggaagcga	tcgtggttgc	agattatgcc	gttaaagtcc	cagatggcct	agatccaata	420
gaagcatcat	ctataacttg	tgcaggcgtc	accacttaca	aagctatcaa	ggtgtctggc	480
gttaagccag	gagactggca	agttatcttc	ggagctgggtg	gcctgggcaa	cttagctatc	540
cagtacgcca	aaaacgtatt	tggtgcgaag	gtgatcgctg	tagatatcaa	tcaagataag	600
ctcaatcttg	ccaaaaagat	aggtgctgat	gtcacaatta	actctggtga	cgtaaacctt	660
gtagacgaaa	tcaaaaagat	cactggcggt	ttaggtgttc	aatccgcgat	tgtatgtgcc	720
gttgcgagaa	ttgcattcga	gcaggctgta	gcctcactaa	agcctatggg	caaaatggta	780
gccgttgctg	taccaaacac	agaaatgaca	ttatctgtgc	caacagtcgt	gtttgatgga	840
gttgaagtag	caggtagtct	tgttggaa	agactcgatt	tggccgaagc	tttccaattc	900
ggtgcagaag	ggaagggtta	gcctattgtc	gctaccagaa	agttggagga	aatcaatgac	960
atcattgatg	agatgaaggc	ggggaagatt	gaaggtagaa	tggttataga	cttcacgaag	1020
caccaccacc	accaccacta	a				1041

<210> 193
<211> 346
<212> PRT
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 193

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

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

ES 2 739 894 T3

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

ES 2 739 894 T3

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 194

<211> 1041

<212> ADN

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 194

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag	60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac	120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg caggacagt ttaggacat	180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggg gccgatgtta gttctctccg agtaggtgat	240
agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt	300
aacgagacat tttgccgaga agccaaaaac gctgggtata gcgttgatgg tggaatggca	360
gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata	420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc	480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctgggt gcctgggcaa cttagctatc	540
cagtacgcca aaaacgtatt tggcgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag	600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctgggtga cgttaaccct	660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggg ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc	720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta	780
gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga	840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaac agactcgatt tggccgaagc tttccaattc	900
gggtgcagaag ggaagggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac	960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag	1020
caccaccacc accaccacta a	1041

<210> 195

<211> 346

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

ES 2 739 894 T3

<400> 195

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

ES 2 739 894 T3

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

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

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 196
<211> 1041
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 196

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag	60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac	120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt ttaggacat	180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat	240
agagtgagtg ttgcttggtt ttctgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt	300
aacgagacat ttgtccgaga attcaaaaac gctggtttta gcgttgatgg tggaatggca	360
gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata	420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc	480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc	540
cagtacgcca aaaacgtatt tgggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag	600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgtaaacct	660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggg ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc	720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta	780
gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga	840
gttgaagtag caggtagtct tggtggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc	900
ggtgcagaag ggaagggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac	960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag	1020
caccaccacc accaccacta a	1041

<210> 197

ES 2 739 894 T3

<211> 346
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*

5 <400> 197

```

Met  Lys  Ala  Ala  Val  Val  Arg  His  Asn  Pro  Asp  Gly  Tyr  Ala  Asp  Leu
1      5      10      15

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

Met  Glu  Tyr  Cys  Gly  Val  Cys  His  Thr  Asp  Leu  His  Val  Ala  Ala  Gly
35      40      45

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

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

Arg  Val  Ser  Val  Ala  Trp  Phe  Phe  Glu  Gly  Cys  Gly  His  Cys  Glu  Tyr
85      90      95

Cys  Val  Ser  Gly  Asn  Glu  Thr  Phe  Cys  Arg  Glu  Phe  Lys  Asn  Ala  Gly
100     105     110

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

Tyr  Ala  Val  Lys  Val  Pro  Asp  Gly  Leu  Asp  Pro  Ile  Glu  Ala  Ser  Ser
130     135     140

Ile  Thr  Cys  Ala  Gly  Val  Thr  Thr  Tyr  Lys  Ala  Ile  Lys  Val  Ser  Gly
145     150     155     160

Val  Lys  Pro  Gly  Asp  Trp  Gln  Val  Ile  Phe  Gly  Ala  Gly  Gly  Leu  Gly
165     170     175

Asn  Leu  Ala  Ile  Gln  Tyr  Ala  Lys  Asn  Val  Phe  Gly  Ala  Lys  Val  Ile
180     185     190

Ala  Val  Asp  Ile  Asn  Gln  Asp  Lys  Leu  Asn  Leu  Ala  Lys  Lys  Ile  Gly
195     200     205

Ala  Asp  Val  Thr  Ile  Asn  Ser  Gly  Asp  Val  Asn  Pro  Val  Asp  Glu  Ile
210     215     220
  
```

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

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

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys His His His His His His
340 345

<210> 198
<211> 1041
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 198

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa	60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat	120
accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttgggtcat	180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttca agttggtgat	240
cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggctact gtgaatactg tgtatctggt	300
aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct	360
gaagaagcaa ttgttggtgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgaccaat	420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga	480
gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaaa ttttagcaatt	540
caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa	600
ttaaatttag ctaaaaaat tggagctgat gtggcaatca attctggtga tgtaaatacca	660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgaat agtttgtgct	720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaatgggt	780

ES 2 739 894 T3

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840
 gtggagggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900
 ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960
 attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020
 caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 199

<211> 346

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 199

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

ES 2 739 894 T3

Ala	Val	Asp	Ile	Asn	Gln	Asp	Lys	Leu	Asn	Leu	Ala	Lys	Lys	Ile	Gly
		195					200					205			
Ala	Asp	Val	Ala	Ile	Asn	Ser	Gly	Asp	Val	Asn	Pro	Val	Asp	Glu	Ile
	210					215					220				
Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	Gln	Ser	Ala	Ile	Val	Cys	Ala
225					230					235					240
Val	Ala	Arg	Ile	Ala	Phe	Glu	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Lys	Pro	Met
				245					250					255	
Gly	Lys	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Pro	Asn	Thr	Glu	Met	Thr	Leu	Ser
			260					265					270		
Val	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Asp	Gly	Val	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Leu	Val
		275					280					285			
Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Gln	Phe	Gly	Ala	Glu	Gly
	290					295					300				
Lys	Val	Lys	Pro	Ile	Val	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp
305					310					315					320
Ile	Ile	Asp	Glu	Met	Lys	Ala	Gly	Lys	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Val	Ile
				325					330					335	
Asp	Phe	Thr	Lys	His	His	His	His	His	His						
			340						345						

<210> 200

<211> 1041

<212> ADN

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 200

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa	60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat	120
accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttgggtcat	180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgctttc tgttggtgat	240
cggttttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt	300
aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct	360
gaagaagcaa ttgttggtgc cgattatgct gtcaaagtgc ctgacggact tgaccaatt	420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga	480
gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt	540

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600
 ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtgacaatca attctggtga tgtaaatacca 660
 gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720
 gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaaatgggt 780
 gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840
 gtggaggttg caggttcact tgtcgggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900
 ggagcagaag gtaaggtaaa accaattggt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960
 attattgatg aatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020
 caccaccacc accaccacta a 1041

<210> 201

<211> 346

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 201

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
 1 5 10 15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
 35 40 45

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

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

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
 85 90 95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
 100 105 110

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

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
 130 135 140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
 145 150 155 160

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

<210> 202

<211> 1041

<212> ADN

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 202

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa	60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat	120
accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat	180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttcg agttgggtgat	240
cgggtttcag tggcttgggt ctttgaagga tgtggctcact gtgaatactg tgtatctggt	300

```

aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct      360
gaagaagcaa ttgttggtgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgaccaat      420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga      480
gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt      540
caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa      600
ttaaatntag ctaaaaaaat tggagctgat gtggcaatca attctggtga tgtaaatacca      660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct      720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaaatgggt      780
gctgtggcag taccacaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga      840
gtggagggtg caggttcact tgcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt      900
ggagcagaag gtaaggtaaa accaattggt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat      960
attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa     1020
caccaccacc accaccacta a                                           1041

```

<210> 203

<211> 346

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 203

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1              5              10              15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35              40              45

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

Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Arg Val Gly Asp
65              70              75

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85              90              95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100             105             110

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

```

ES 2 739 894 T3

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

<210> 204
 <211> 1041
 <212> ADN
 <213> *Lactococcus lactis*
 <400> 204

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatgggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60
 cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120
 accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat 180
 gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgctttc tgttggtgat 240
 cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggctcact gtgaatactg tgtatctggt 300
 aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360
 gaagaagcaa ttgttggttc cgattatgct gtcaaagtgc ctgacggact tgaccaatt 420
 gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480
 gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaat ttagcaatt 540
 caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600
 ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggtaatca attctggtga tgtaaattcca 660
 gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgaat agtttgtgct 720
 gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaatgggtt 780
 gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840
 gtggagggtg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900
 ggagcagaag gtaaggtaaa accaattggt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960
 attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020
 caccaccacc accaccacta a 1041

5 <210> 205
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*

10 <400> 205

Met	Lys	Ala	Ala	Val	Val	Arg	His	Asn	Pro	Asp	Gly	Tyr	Ala	Asp	Leu
1				5					10					15	
Val	Glu	Lys	Glu	Leu	Arg	Ala	Ile	Lys	Pro	Asn	Glu	Ala	Leu	Leu	Asp
			20					25					30		
Met	Glu	Tyr	Cys	Gly	Val	Cys	His	Thr	Asp	Leu	His	Val	Ala	Ala	Gly
		35					40					45			
Asp	Phe	Gly	Asn	Lys	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	Gly	His	Glu	Gly	Ile	Gly
50						55					60				
Ile	Val	Lys	Glu	Ile	Gly	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Gly	Asp
65					70					75					80
Arg	Val	Ser	Val	Ala	Trp	Phe	Phe	Glu	Gly	Cys	Gly	His	Cys	Glu	Tyr
				85					90					95	

ES 2 739 894 T3

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

<210> 206

<211> 1023
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

5 <400> 206

atgaaggctg	cagttgtccg	tcacaatcct	gatgggtacg	ctgatcttgt	agaaaaagag	60
ttgagggcca	ttaagccaaa	tgaggcattg	ttggatatgg	aatactgcgg	tgtctgtcac	120
actgacctac	atggttgcgc	cggagattac	ggcaacaagg	cagggacagt	tttaggacat	180
gaaggtatag	gtattgtgaa	agagattggg	gccgatgtta	gttctctcca	agtaggtgat	240
agagtgagtg	ttgcttggtt	tttcgaagg	tgtggacatt	gcgaatactg	tgtgtcaggt	300
aacgagacat	tttgccgaga	agtcaaaaac	gctggttata	gcgttgatgg	tggaatggca	360
gaggaagcaa	tcgtgggtgc	agattatgcc	gtcaaagtcc	cagatggcct	agatccaata	420
gaagcatcat	ctataacttg	tgcaggcgtc	accacttaca	aagctatcaa	ggtgtctggc	480
gttaagccag	gagactggca	agttatcttc	ggagctgggt	gcctgggcaa	cttagctatc	540
cagtacgcca	aaaacgtatt	tgggtgcgaag	gtgatcgctg	tagatatcaa	tcaagataag	600
ctcaatcttg	ccaaaaagat	aggtgctgat	gtcatcatta	actctgggtg	cgtaaacctt	660
gtagacgaaa	tcaaaaagat	cactggcggg	ttaggtgttc	aatccgcgat	tgtatgtgcc	720
gttgcgagaa	ttgcattcga	gcaggctgta	gcctcactaa	agcctatggg	caaatggta	780
gccgttgctt	tgccaaacac	agaaatgaca	ttatctgtgc	caacagtcgt	gtttgatgga	840
gttgaagtag	caggtagtct	tgttggaaca	agactcgatt	tggccgaagc	tttccaattc	900
ggtgcagaag	ggaagggtta	gcctattgtc	gctaccagaa	agttggagga	aatcaatgac	960
atcattgatg	agatgaaggc	ggggaagatt	gaaggtagaa	tggttataga	cttcacgaag	1020
taa						1023

10 <210> 207
<211> 1023
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

15 <400> 207

atgaaggctg	cagttgtccg	tcacaatcct	gatgggtacg	ctgatcttgt	agaaaaagag	60
ttgagggcca	ttaagccaaa	tgaggcattg	ttggatatgg	aatactgcgg	tgtctgtcac	120
actgacctac	atggttgcgc	cggagattac	ggcaacaagg	cagggacagt	tttaggacat	180
gaaggtatag	gtattgtgaa	agagattggg	gccgatgtta	gttctctcca	agtaggtgat	240
agagtgagtg	ttgcttggtt	tttcgaagg	tgtggacatt	gcgaatactg	tgtgtcaggt	300
aacgagacat	tttgccgaga	agtcaaaaac	gctggttata	gcgttgatgg	tggaatggca	360
gaggaagcga	tcgtgggtgc	agattatgcc	gttaaagtcc	cagatggcct	agatccaata	420
gaagcatcat	ctataacttg	tgcaggcgtc	accacttaca	aagctatcaa	ggtgtctggc	480

gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctgggtg gcctgggcaa cttagctatc 540
cagtacgcca aaaacgtatt tgggtgcgaag gtgacgctg tagatatcaa tcaagataag 600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacatta actctgggtga cgtttaccct 660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcgggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780
gccgttgctg tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900
ggtgcagaag ggaagggtta gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020
taa 1023

<210> 208

<211> 340

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 208

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

ES 2 739 894 T3

145		150		155		160
Val Lys Pro Gly	Asp Trp Gln Val	Ile Phe Gly Ala	Gly Gly Leu Gly			
	165		170			175
Asn Leu Ala Ile	Gln Tyr Ala Lys	Asn Val Phe Gly	Ala Lys Val Ile			
	180		185			190
Ala Val Asp Ile	Asn Gln Asp Lys	Leu Asn Leu Ala	Lys Lys Ile Gly			
	195		200			205
Ala Asp Val Ile	Ile Asn Ser Gly	Asp Val Tyr Pro	Val Asp Glu Ile			
	210		215			220
Lys Lys Ile Thr	Gly Gly Leu Gly	Val Gln Ser Ala	Ile Val Cys Ala			
	225		230			235
Val Ala Arg Ile	Ala Phe Glu Gln	Ala Val Ala Ser	Leu Lys Pro Met			
	245		250			255
Gly Lys Met Val	Ala Val Ala Val	Pro Asn Thr Glu	Met Thr Leu Ser			
	260		265			270
Val Pro Thr Val	Val Phe Asp Gly	Val Glu Val Ala	Gly Ser Leu Val			
	275		280			285
Gly Thr Arg Leu	Asp Leu Ala Glu	Ala Phe Gln Phe	Gly Ala Glu Gly			
	290		295			300
Lys Val Lys Pro	Ile Val Ala Thr	Arg Lys Leu Glu	Glu Ile Asn Asp			
	305		310			315
Ile Ile Asp Glu	Met Lys Ala Gly	Lys Ile Glu Gly	Arg Met Val Ile			
	325		330			335
Asp Phe Thr Lys						
	340					

<210> 209
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> *Lactococcus lactis*

<400> 209

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag	60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgctg tgtctgtcac	120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg caggacagt ttaggacat	180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat	240

agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt 300
aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctgggttata gcgttgatgg tggaatggca 360
gaggaagcga tcgtgggttc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata 420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgctc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc 480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctgggtg gcctgggcaa cttagctatc 540
cagtacgcca aaaacgtatt tggcgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag 600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctgggtga cgtaaacct 660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc 720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta 780
gccgttgctc tgccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga 840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc 900
ggtgcagaag ggaagggtta gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac 960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag 1020
taa 1023

<210> 210

<211> 340

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 210

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

ES 2 739 894 T3

[illegible]

<210> 211
<211> 1023
<212> ADN

ES 2 739 894 T3

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 211

```

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag      60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac      120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg cagggacagt tttaggacat      180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggg gccgatgtta gttctctcca agtaggtgat      240
agagtgagtg ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt      300
aacgagacat tttgccgaga agtcaaaaac gctgggtata gcgttgatgg tggaatggca      360
gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata      420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc      480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc      540
cagtacgcca aaaacgtatt tggcggaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag      600
ctcaatcttg ccaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgttaaccct      660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggt ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc      720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta      780
gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga      840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc      900
ggtgcagaag ggaagggttaa gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac      960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tgggtataga cttcacgaag     1020
taa                                                                1023

```

5

<210> 212

<211> 340

<212> PRT

10 <213> *Lactococcus lactis*

<400> 212

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
 1              5              10              15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
      35              40              45

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

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

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr

```

ES 2 739 894 T3

85								90				95			
Cys	Val	Ser	Gly	Asn	Glu	Thr	Phe	Cys	Arg	Glu	Val	Lys	Asn	Ala	Gly
			100					105					110		
Tyr	Ser	Val	Asp	Gly	Gly	Met	Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	Val	Val	Ala	Asp
		115					120					125			
Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Pro	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ile	Glu	Ala	Ser	Ser
	130					135					140				
Ile	Thr	Cys	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ile	Lys	Val	Ser	Gly
145					150					155					160
Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Trp	Gln	Val	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly
				165					170					175	
Asn	Leu	Ala	Ile	Gln	Tyr	Ala	Lys	Asn	Val	Phe	Gly	Ala	Lys	Val	Ile
			180					185					190		
Ala	Val	Asp	Ile	Asn	Gln	Asp	Lys	Leu	Asn	Leu	Ala	Lys	Lys	Ile	Gly
		195					200					205			
Ala	Asp	Val	Thr	Ile	Asn	Ser	Gly	Asp	Val	Asn	Pro	Val	Asp	Glu	Ile
	210					215					220				
Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	Gln	Ser	Ala	Ile	Val	Cys	Ala
225					230					235					240
Val	Ala	Arg	Ile	Ala	Phe	Glu	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Lys	Pro	Met
				245					250					255	
Gly	Lys	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Pro	Asn	Thr	Glu	Met	Thr	Leu	Ser
			260					265					270		
Val	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Asp	Gly	Val	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Leu	Val
		275					280					285			
Gly	Thr	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ala	Phe	Gln	Phe	Gly	Ala	Glu	Gly
	290					295					300				
Lys	Val	Lys	Pro	Ile	Val	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Glu	Glu	Ile	Asn	Asp
305					310					315					320
Ile	Ile	Asp	Glu	Met	Lys	Ala	Gly	Lys	Ile	Glu	Gly	Arg	Met	Val	Ile
				325					330					335	
Asp	Phe	Thr	Lys												
			340												

ES 2 739 894 T3

<210> 213
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> *Lactococcus lactis*

5 <400> 213

```

atgaaggctg cagttgtccg tcacaatcct gatgggtacg ctgatcttgt agaaaaagag      60
ttgagggcca ttaagccaaa tgaggcattg ttggatatgg aatactgcgg tgtctgtcac      120
actgacctac atgttgctgc cggagatttc ggcaacaagg caggacagt ttaggacat      180
gaaggtatag gtattgtgaa agagattggt gccgatgtta gttctctccg agtaggtgat      240
agagtgaagt ttgcttggtt tttcgaaggg tgtggacatt gcgaatactg tgtgtcaggt      300
aacgagacat tttgccgaga agccaaaaac gctgggttata gcgttgatgg tggaatggca      360
gaggaagcga tcgtggttgc agattatgcc gttaaagtcc cagatggcct agatccaata      420
gaagcatcat ctataacttg tgcaggcgtc accacttaca aagctatcaa ggtgtctggc      480
gttaagccag gagactggca agttatcttc ggagctggtg gcctgggcaa cttagctatc      540
cagtacgcca aaaacgtatt tgggtgcgaag gtgatcgctg tagatatcaa tcaagataag      600
ctcaatcttg caaaaaagat aggtgctgat gtcacaatta actctggtga cgtaaccct      660
gtagacgaaa tcaaaaagat cactggcggg ttaggtgttc aatccgcgat tgtatgtgcc      720
gttgcgagaa ttgcattcga gcaggctgta gcctcactaa agcctatggg caaaatggta      780
gccgttgctg taccaaacac agaaatgaca ttatctgtgc caacagtcgt gtttgatgga      840
gttgaagtag caggtagtct tgttggaaca agactcgatt tggccgaagc tttccaattc      900
ggtgcagaag ggaagggtta gcctattgtc gctaccagaa agttggagga aatcaatgac      960
atcattgatg agatgaaggc ggggaagatt gaaggtagaa tggttataga cttcacgaag     1020
taa                                                                1023
    
```

10 <210> 214
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*

15 <400> 214

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
 1              5              10              15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
          35              40              45

Asp Phe Gly Asn Lys Ala Gly Thr Val Leu Gly His Glu Gly Ile Gly
    
```

ES 2 739 894 T3

50	55	60
Ile Val Lys Glu Ile Gly Ala Asp Val Ser Ser Leu Arg Val Gly Asp 65 70 75 80		
Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr 85 90 95		
Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Ala Lys Asn Ala Gly 100 105 110		
Tyr Ser Val Asp Gly Gly Met Ala Glu Glu Ala Ile Val Val Ala Asp 115 120 125		
Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser 130 135 140		
Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly 145 150 155 160		
Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly 165 170 175		
Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile 180 185 190		
Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly 195 200 205		
Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile 210 215 220		
Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala 225 230 235 240		
Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met 245 250 255		
Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser 260 265 270		
Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val 275 280 285		
Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly 290 295 300		
Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp 305 310 315 320		

ES 2 739 894 T3

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

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 215
<211> 1023
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 215

atgaaggctg	cagttgtccg	tcacaatcct	gatgggtacg	ctgatcttgt	agaaaaagag	60
ttgagggcca	ttaagccaaa	tgaggcattg	ttggatatgg	aatactgcgg	tgtctgtcac	120
actgacctac	atgttgctgc	cggagatttc	ggcaacaagg	cagggacagt	tttaggacat	180
gaaggtatag	gtattgtgaa	agagattggt	gccgatgtta	gttctctcca	agtaggtgat	240
agagtgagtg	ttgcttggtt	tttcgaaggg	tgtggacatt	gcgaatactg	tgtgtcaggt	300
aacgagacat	tttgccgaga	attcaaaaac	gctgggttta	gcgttgatgg	tggaatggca	360
gaggaagcga	tcgtgggtgc	agattatgcc	gttaaagtcc	cagatggcct	agatccaata	420
gaagcatcat	ctataacttg	tgcaggcgtc	accacttaca	aagctatcaa	gggtgtctggc	480
gttaagccag	gagactggca	agttatcttc	ggagctgggt	gcctgggcaa	cttagctatc	540
cagtacgcca	aaaacgtatt	tgggtgcgaag	gtgatcgctg	tagatatcaa	tcaagataag	600
ctcaatcttg	ccaaaaagat	aggtgctgat	gtcacaatta	actctgggtga	cgttaaccct	660
gtagacgaaa	tcaaaaagat	cactggcggt	ttaggtgttc	aatccgcgat	tgtatgtgcc	720
gttgcgagaa	ttgcattcga	gcaggctgta	gcctcactaa	agcctatggg	caaaatggta	780
gccgttgctg	taccaaacac	agaaatgaca	ttatctgtgc	caacagtcgt	gtttgatgga	840
gttgaagtag	caggtagtct	tgttggaaca	agactcgatt	tggccgaagc	tttccaattc	900
gggtgcagaag	ggaagggtta	gcctattgtc	gctaccagaa	agttggagga	aatcaatgac	960
atcattgatg	agatgaaggc	ggggaagatt	gaaggtagaa	tggttataga	cttcacgaag	1020
taa						1023

<210> 216
<211> 340
<212> PRT
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 216

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1 5 10 15

Val Glu Lys Glu Leu Arg Ala Ile Lys Pro Asn Glu Ala Leu Leu Asp

ES 2 739 894 T3

20					25					30					
Met	Glu	Tyr	Cys	Gly	Val	Cys	His	Thr	Asp	Leu	His	Val	Ala	Ala	Gly
		35					40					45			
Asp	Phe	Gly	Asn	Lys	Ala	Gly	Thr	Val	Leu	Gly	His	Glu	Gly	Ile	Gly
	50					55					60				
Ile	Val	Lys	Glu	Ile	Gly	Ala	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Gln	Val	Gly	Asp
65					70					75					80
Arg	Val	Ser	Val	Ala	Trp	Phe	Phe	Glu	Gly	Cys	Gly	His	Cys	Glu	Tyr
				85					90					95	
Cys	Val	Ser	Gly	Asn	Glu	Thr	Phe	Cys	Arg	Glu	Phe	Lys	Asn	Ala	Gly
			100					105					110		
Phe	Ser	Val	Asp	Gly	Gly	Met	Ala	Glu	Glu	Ala	Ile	Val	Val	Ala	Asp
		115					120					125			
Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Pro	Asp	Gly	Leu	Asp	Pro	Ile	Glu	Ala	Ser	Ser
	130					135					140				
Ile	Thr	Cys	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ile	Lys	Val	Ser	Gly
145					150					155					160
Val	Lys	Pro	Gly	Asp	Trp	Gln	Val	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Gly
				165					170					175	
Asn	Leu	Ala	Ile	Gln	Tyr	Ala	Lys	Asn	Val	Phe	Gly	Ala	Lys	Val	Ile
			180					185					190		
Ala	Val	Asp	Ile	Asn	Gln	Asp	Lys	Leu	Asn	Leu	Ala	Lys	Lys	Ile	Gly
		195					200					205			
Ala	Asp	Val	Thr	Ile	Asn	Ser	Gly	Asp	Val	Asn	Pro	Val	Asp	Glu	Ile
	210					215					220				
Lys	Lys	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Val	Gln	Ser	Ala	Ile	Val	Cys	Ala
225					230					235					240
Val	Ala	Arg	Ile	Ala	Phe	Glu	Gln	Ala	Val	Ala	Ser	Leu	Lys	Pro	Met
				245					250					255	
Gly	Lys	Met	Val	Ala	Val	Ala	Val	Pro	Asn	Thr	Glu	Met	Thr	Leu	Ser
			260					265					270		
Val	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Asp	Gly	Val	Glu	Val	Ala	Gly	Ser	Leu	Val
		275					280					285			

ES 2 739 894 T3

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 217
<211> 1023
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 217

```

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa      60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat      120
accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat      180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttca agttggtgat      240
cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt      300
aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct      360
gaagaagcaa ttgttggtgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgaccaat      420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga      480
gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaat ttagcaatt      540
caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa      600
ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggcaatca attctggtga tgtaaatcca      660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct      720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaaatgggt      780
gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga      840
gtggagggtg caggttcact tgcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt      900
ggagcagaag gtaaggtaaa accaattggt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat      960
attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa     1020
taa                                                                    1023

```

<210> 218
<211> 340
<212> PRT

ES 2 739 894 T3

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 218

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

ES 2 739 894 T3

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

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

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 219
<211> 1041
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 219

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa	60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat	120
accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat	180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgctttc tgttggtgat	240
cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggtcact gtgaatactg tgtatctggt	300
aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct	360
gaagaagcaa ttgttggtgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgaccaatt	420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga	480
gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaaa tttagcaatt	540
caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa	600
ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtgacaatca attctggtga tgtaaatacca	660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct	720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaaatgggt	780
gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga	840
gtggagggtg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt	900
ggagcagaag gtaaggtaaa accaattggt ggcacacgca aactggaaga aatcaatgat	960
attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa	1020
caccaccacc accaccacta a	1041

ES 2 739 894 T3

<210> 220
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Lactococcus lactis*

5

<400> 220

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
 1              5              10              15

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

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
      35              40              45

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

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

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
      85              90              95

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
      100             105             110

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

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
      130             135             140

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145             150             155             160

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
      165             170             175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
      180             185             190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
      195             200             205

Ala Asp Val Thr Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
      210             215             220
  
```

ES 2 739 894 T3

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
 225 230 235 240
 Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
 245 250 255
 Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
 260 265 270
 Val Pro Thr Val Val Phe Asp Gly Val Glu Val Ala Gly Ser Leu Val
 275 280 285
 Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
 290 295 300
 Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
 305 310 315 320
 Ile Ile Asp Glu Met Lys Ala Gly Lys Ile Glu Gly Arg Met Val Ile
 325 330 335
 Asp Phe Thr Lys
 340

<210> 221
 <211> 1023
 <212> ADN
 <213> *Lactococcus lactis*

<400> 221

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa 60
 cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat 120
 accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttgggtcat 180
 gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgcttcg agttgggtgat 240
 cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtggctcact gtgaatactg tgtatctggg 300
 aatgaaactt tttgtcgaga agttaaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct 360
 gaagaagcaa ttgttggttc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgaccaatt 420
 gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga 480
 gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttggaat ttagcaatt 540
 caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa 600
 ttaaatttag ctaaaaaaat tggagctgat gtggcaatca attctgggtga tgtaaatacca 660
 gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct 720
 gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaaatgggt 780

gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga 840
 gtggagggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt 900
 ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat 960
 attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa 1020
 taa 1023

<210> 222

<211> 340

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 222

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

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Ala Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

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

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 223
<211> 1023
<212> ADN
<213> *Lactococcus lactis*

<400> 223

atgaaagcag cagtagtaag acacaatcca gatgggttatg cggaccttgt tgaaaaggaa	60
cttcgagcaa tcaaacctaa tgaagctttg cttgacatgg agtattgtgg agtctgtcat	120
accgatttgc acgttgcagc aggtgatttt ggcaacaaag cagggactgt tcttggtcat	180
gaaggaattg gaattgtcaa agaaattgga gctgatgtaa gctcgctttc tgttggtgat	240
cgggtttcag tggcttggtt ctttgaagga tgtgggtcact gtgaatactg tgtatctggt	300
aatgaaaactt tttgtcgaga agttaaaaaat gcaggatttt cagttgatgg cggaatggct	360
gaagaagcaa ttgttgttgc cgattatgct gtcaaagttc ctgacggact tgaccaatt	420
gaagctagct caattacttg tgctggagta acaacttaca aagcaatcaa agtatcagga	480
gtaaaacctg gtgattggca agtaattttt ggtgctggag gacttgaaa tttagcaatt	540

ES 2 739 894 T3

```

caatatgcta aaaatgtttt tggagcaaaa gtaattgctg ttgatattaa tcaagataaa      600
ttaaathtag ctaaaaaaat tggagctgat gtgtaatca attctggtga tgtaaatacca      660
gttgatgaaa ttaaaaaaat aactggcggc ttaggggtgc aaagtgcaat agtttgtgct      720
gttgcaagga ttgcttttga acaagcgggt gcttctttga aacctatggg caaaatgggt      780
gctgtggcag tacccaatac tgagatgact ttatcagttc caacagttgt ttttgacgga      840
gtggaggttg caggttcact tgtcggaaca agacttgact tggcagaagc ttttcaattt      900
ggagcagaag gtaaggtaaa accaattgtt gcgacacgca aactggaaga aatcaatgat      960
attattgatg aaatgaaggc aggaaaaatt gaaggccgaa tggtcattga ttttactaaa     1020
taa                                                                    1023

```

<210> 224

<211> 340

<212> PRT

<213> *Lactococcus lactis*

<400> 224

```

Met Lys Ala Ala Val Val Arg His Asn Pro Asp Gly Tyr Ala Asp Leu
1          5          10          15

```

```

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

```

```

Met Glu Tyr Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Val Ala Ala Gly
35          40          45

```

```

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

```

```

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

```

```

Arg Val Ser Val Ala Trp Phe Phe Glu Gly Cys Gly His Cys Glu Tyr
85          90          95

```

```

Cys Val Ser Gly Asn Glu Thr Phe Cys Arg Glu Val Lys Asn Ala Gly
100         105         110

```

```

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

```

```

Tyr Ala Val Lys Val Pro Asp Gly Leu Asp Pro Ile Glu Ala Ser Ser
130         135         140

```

```

Ile Thr Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Ile Lys Val Ser Gly
145         150         155         160

```

ES 2 739 894 T3

Val Lys Pro Gly Asp Trp Gln Val Ile Phe Gly Ala Gly Gly Leu Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Ile Gln Tyr Ala Lys Asn Val Phe Gly Ala Lys Val Ile
180 185 190

Ala Val Asp Ile Asn Gln Asp Lys Leu Asn Leu Ala Lys Lys Ile Gly
195 200 205

Ala Asp Val Val Ile Asn Ser Gly Asp Val Asn Pro Val Asp Glu Ile
210 215 220

Lys Lys Ile Thr Gly Gly Leu Gly Val Gln Ser Ala Ile Val Cys Ala
225 230 235 240

Val Ala Arg Ile Ala Phe Glu Gln Ala Val Ala Ser Leu Lys Pro Met
245 250 255

Gly Lys Met Val Ala Val Ala Val Pro Asn Thr Glu Met Thr Leu Ser
260 265 270

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

Gly Thr Arg Leu Asp Leu Ala Glu Ala Phe Gln Phe Gly Ala Glu Gly
290 295 300

Lys Val Lys Pro Ile Val Ala Thr Arg Lys Leu Glu Glu Ile Asn Asp
305 310 315 320

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

Asp Phe Thr Lys
340

<210> 225
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador XX7

<400> 225
ggagaaaacc catatgtcgt ttac

<210> 226
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

24

	<220>		
	<223> cebador XX9		
5	<400> 226		
	gcagccgaac gctcgagggc ggccg		25
	<210> 227		
	<211> 48		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador His_NotI_1947_rev		
15	<400> 227		
	ctcgagcggc cgcttagtg tgggtgggt ggtgttagt aaaatcaa		48
	<210> 228		
20	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
25	<223> cebador Sall_for		
	<400> 228		
	gaaagcatag caatctaatac taagtt		26
30	<210> 229		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> cebador adhAcoSc_Sallin_for		
	<400> 229		
	gtttgtcgac atgaaggctg cagttgtccg t		31
40	<210> 230		
	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> cebador adhAcoSC_Notlin_his_rev		
	<400> 230		
50	tcgagcggcc gcttagtggt ggtgggtgtg gtgcttcgtg aagtctataa ccattctacc		60
	<210> 231		
	<211> 51		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador pGV1994ep_for		
60	<400> 231		
	cgggtcttcaa tttctcaagt ttcagtttca tttttcttgt tctattacaa c		51
	<210> 232		

	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador pGV1994ep_rev	
	<400> 232	
	ctaactcctt ccttttcggt tagagcggat gtggg	35
10	<210> 233	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador RecombADHY50_for	
	<400> 233	
20	tgctgccgga gattwcggca acaaggcagg	30
	<210> 234	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador RecombADHY50_rev	
30	<400> 234	
	cctgccttgt tgccgwaatc tccggcagca	30
	<210> 235	
	<211> 30	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador RecombADHL264_for	
40	<400> 235	
	atggtagccg ttgctktacc aaacacagaa	30
	<210> 236	
45	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> cebador RecombADHL264_rev	
	<400> 236	
	ttctgtgttt ggtamagcaa cggctaccat	30
55	<210> 237	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> cebador RecombADHI212_Y219_for	
	<400> 237	
	gctgatgtca yaattaactc tggtgacgtt waccctgtag	40

5	<210> 238 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador RecombADHI212_Y219_rev <400> 238 ctacaggggtw aacgtcacca gagttaattr tgacatcagc	40
15	<210> 239 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador NNKADHF50_for	
25	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(15) <223> n es a, c, g o t <400> 239 tgctgccgga gatnnkggca acaag	25
30	<210> 240 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador NNKADHF50_rev	
40	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n es a, c, g o t <400> 240 gccttggttc cmnnatctcc ggcag	25
45	<210> 241 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador NNKADHR77_for	
55	<220> <221> misc_feature <222> (13)..(14) <223> n es a, c, g o t	
60	<400> 241 gttagttctc tcnnkgtagg tgatag <210> 242 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	26

	<220> <223> cebador NNKADHR77_rev	
5	<220> <221> misc_feature <222> (17)..(18) <223> n es a, c, g o t	
10	<400> 242 cactctatca cctacmnga gagaac	26
15	<210> 243 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador NNKADHA108_for	
25	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(17) <223> n es a, c, g o t	
	<400> 243 acattttgcc gagaannkaa aaacgc	26
30	<210> 244 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador NNKADHA108_rev	
40	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(15) <223> n es a, c, g o t	
	<400> 244 accagcgttt ttmnnttctc ggcaaa	26
45	<210> 245 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador NNKADHF113_for	
55	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(17) <223> n es a, c, g o t	
60	<400> 245 gtcaaaaacg ctggtnnkag cgttga	26
	<210> 246 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> cebador NNKADHF113_rev	
5	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(15) <223> n es a, c, g o t	
10	<400> 246 accatcaacg ctmnaccag cgtttt	26
15	<210> 247 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador NNKADHT212_for	
25	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(19) <223> n es a, c, g o t	
	<400> 247 agataggtgc tgatgtcnnk attaac	26
30	<210> 248 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador NNKADHT212_rev	
40	<220> <221> misc_feature <222> (12)..(13) <223> n es a, c, g o t	
	<400> 248 cagagttaat mnngacatca gcacct	26
45	<210> 249 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador NNKADHV264_for	
55	<220> <221> misc_feature <222> (14)..(15) <223> n es a, c, g o t	
60	<400> 249 ggtagccgtt gctnnkccaa acacag	26
	<210> 250 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> cebador NNKADHV264_rev	
5	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(17) <223> n es a, c, g o t	
10	<400> 250 at t t c t g t g t t t g g m n n a g c a a c g g c	26
15	<210> 251 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador Recomb2F50Minilib_for	
	<400> 251 g t t g c a g c a g g t g a t t d k g g c a a c a a a g c a	30
25	<210> 252 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador Recomb2F50Minilib_rev	
	<400> 252 t g c t t t g t t g c c m h a a t c a c c t g c t g c a a c	30
35	<210> 253 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador Recomb2Q77Gen5_for3	
	<400> 253 t g a t g t a a g c t c g c t t c a a g t t g g t g a t c g	30
45	<210> 254 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador Recomb2Q77Gen5_rev4	
	<400> 254 c g a t c a c c a a c t t g a a g c g a g c t t a c a t c a	30
55	<210> 255 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador Recomb2R77Gen5_for5	

	<400> 255 tgatgtaagc tcgcttcgag ttggtgatcg	30
5	<210> 256 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador Recomb2R77Gen5_rev6	
	<400> 256 cgatcaccaa ctcgaagcga gcttacatca	30
15	<210> 257 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador Recomb2S77Gen5_for7	
	<400> 257 tgatgtaagc tcgctttctg ttggtgatcg	30
25	<210> 258 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador Recomb2S77Gen5_rev8	
	<400> 258 cgatcaccaa cagaaagcga gcttacatca	30
35	<210> 259 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador Recomb2Y113 Gen5_for9	
45	<400> 259 ttaaaaatgc aggatattca gttgatggcg	30
	<210> 260 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador Recomb2Y113 Gen5_rev10	
55	<400> 260 cgccatcaac tgaatatcct gcatttttaa	30
60	<210> 261 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> cebador Recomb2F113 Gen5_forI	
	<400> 261	
5	ttaaaaatgc aggattttca gttgatggcg	30
	<210> 262	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador Recomb2F113 Gen5_revI2	
	<400> 262	
15	cgccatcaac tgaaaatcct gcatttttaa	30
	<210> 263	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador Recomb2G113 Gen5_forI3	
25	<400> 263	
	ttaaaaatgc aggagggtca gttgatggcg	30
	<210> 264	
	<211> 30	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador Recomb2G113 Gen5_revI4	
35	<400> 264	
	cgccatcaac tgaccctcct gcatttttaa	30
	<210> 265	
40	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador Recomb2T212 Mini_forI5	
	<400> 265	
	gagctgatgt gryaatcaat tctggtgatg	30
50	<210> 266	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> cebador Recomb2T212 Mini_revI6	
	<400> 266	
	catcaccaga attgattryc acatcagctc	30
60	<210> 267	
	<211> 30	
	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador Recomb2V264 Mini_for17
 5
 <400> 267
 tggttgctgt ggcaktaccc aatactgaga 30
 <210> 268
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador Recomb2V264 Mini_rev18
 <400> 268
 tctcagtatt gggtaamtgcc acagcaacca 30
 20

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo recombinante que es un microorganismo de levadura que comprende una vía biosintética que usa el acetolactato como producto intermedio, estando dicho microorganismo recombinante modificado mediante ingeniería genética para delecionar o alterar un gen codificante de una enzima que cataliza la conversión del acetolactato en ácido 2,3-dihidroxi-2-metilbutanoico (DH2MB) para reducir o eliminar la expresión o la actividad de dicha enzima, y en el que la delección o la alteración de dicho gen reduce la producción de DM2MB, microorganismo que expresa además una acetolactato sintasa exógena para convertir el piruvato en acetolactato; en donde dicho gen se selecciona entre el gen YMR226 de *S. cerevisiae* con SEQ ID NO: 1 o entre SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23; o es una de sus variantes u homólogos que tiene al menos un 85 % de identidad con las mismas.
2. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, produciendo dicho microorganismo recombinante un producto derivado de acetolactato seleccionado entre isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoína, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, isobutileno, 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol y coenzima A.
3. El microorganismo recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, estando dicho microorganismo recombinante modificado mediante ingeniería genética para reducir o eliminar
 - (a) la actividad de piruvato descarboxilasa (PDC); y/o
 - (b) la actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD).
4. Un método para producir un metabolito beneficioso derivado de un 3-ceto-ácido intermedio, que comprende:
 - (a) proporcionar un microorganismo recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
 - (b) cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono, hasta que se produce una cantidad recuperable del metabolito beneficioso; y
 - (c) recuperar el metabolito beneficioso.
5. El método de la reivindicación 4, método que es un método para producir un metabolito beneficioso derivado de un 3-ceto-ácido intermedio, en donde el metabolito beneficioso se selecciona entre isobutanol, 2-butanol, 1-butanol, 2-butanona, 2,3-butanodiol, acetoína, diacetilo, valina, leucina, ácido pantoténico, 3-metil-1-butanol, 4-metil-1-pentanol y coenzima A.
6. El microorganismo recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una vía metabólica productora de isobutanol.
7. Un método para producir isobutanol, que comprende:
 - (a) proporcionar un microorganismo recombinante de acuerdo con la reivindicación 6;
 - (b) cultivar el microorganismo recombinante en un medio de cultivo que contiene una materia prima que proporciona la fuente de carbono, hasta que se produce una cantidad recuperable de isobutanol; y
 - (c) recuperar el isobutanol.

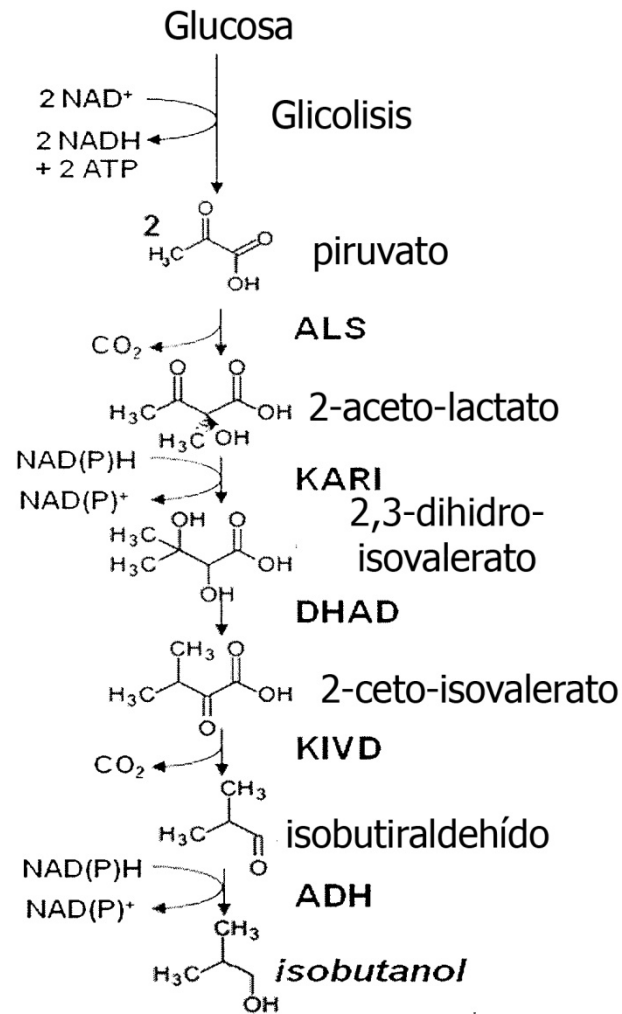


FIGURA 1

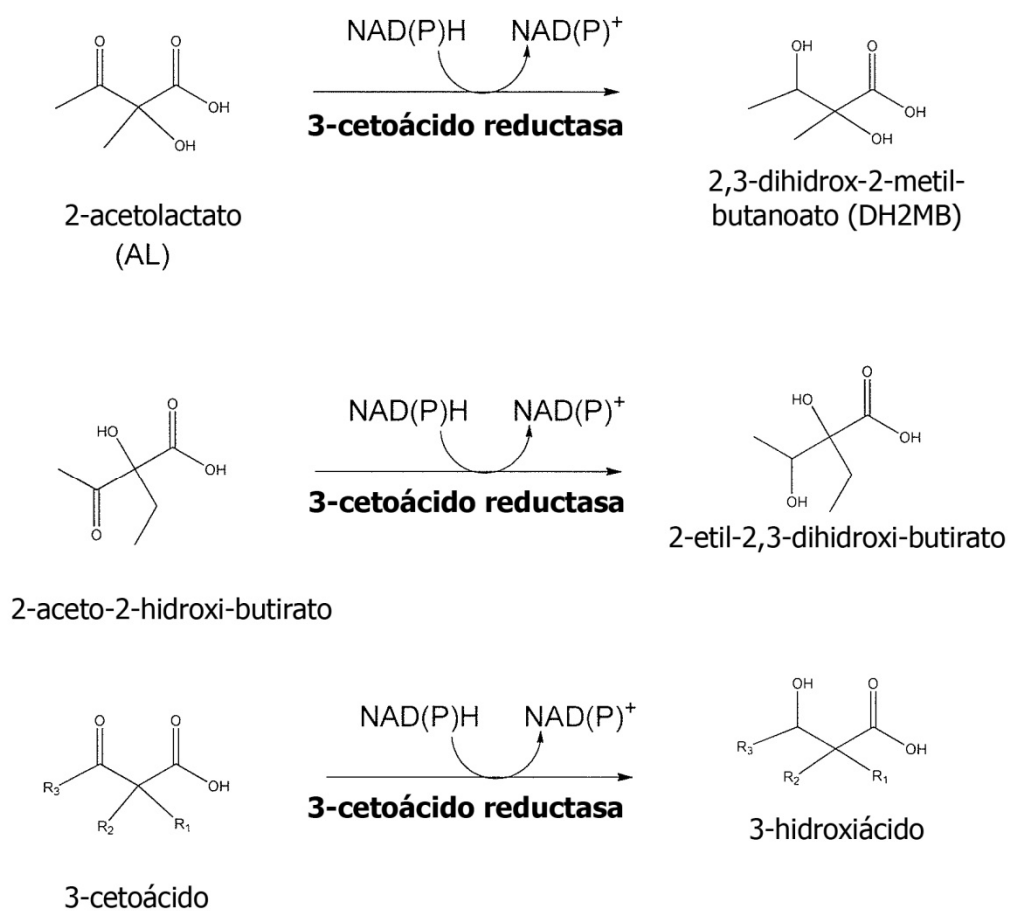
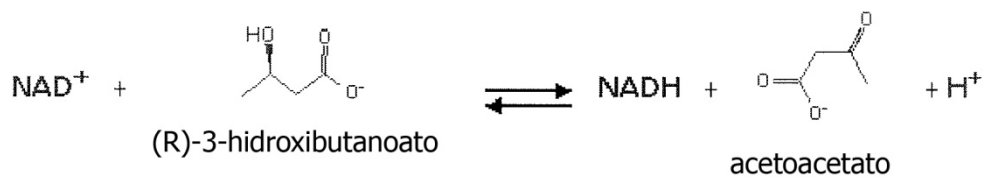
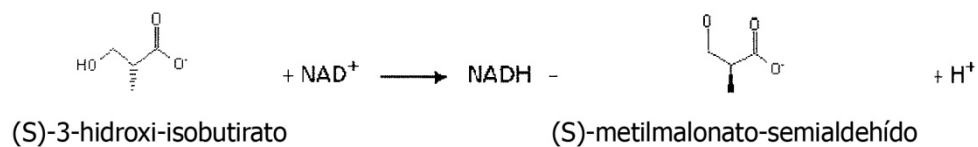


FIGURA 2

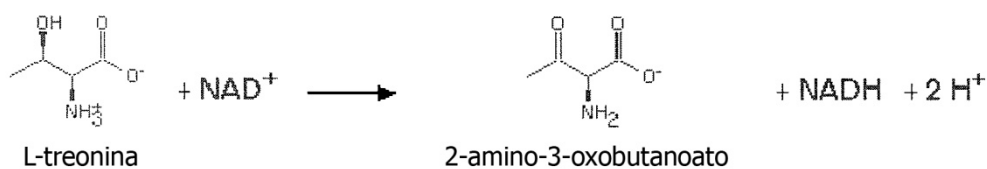
EC 1.1.1.30



EC 1.1.1.31



EC 1.1.1.103



EC 1.1.1.217

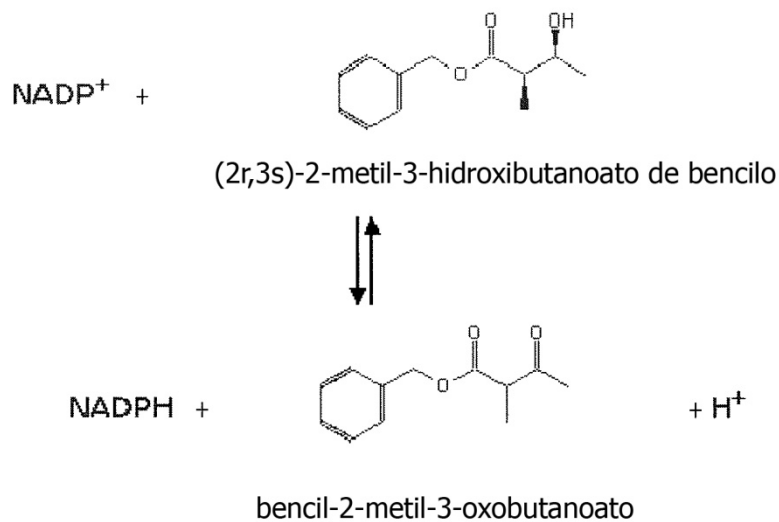


FIGURA 3

EC1.1.1.298

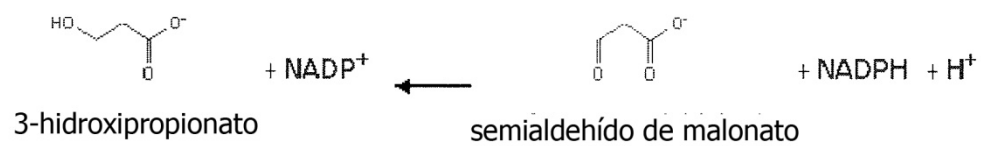


FIGURA 3 (CONT.)

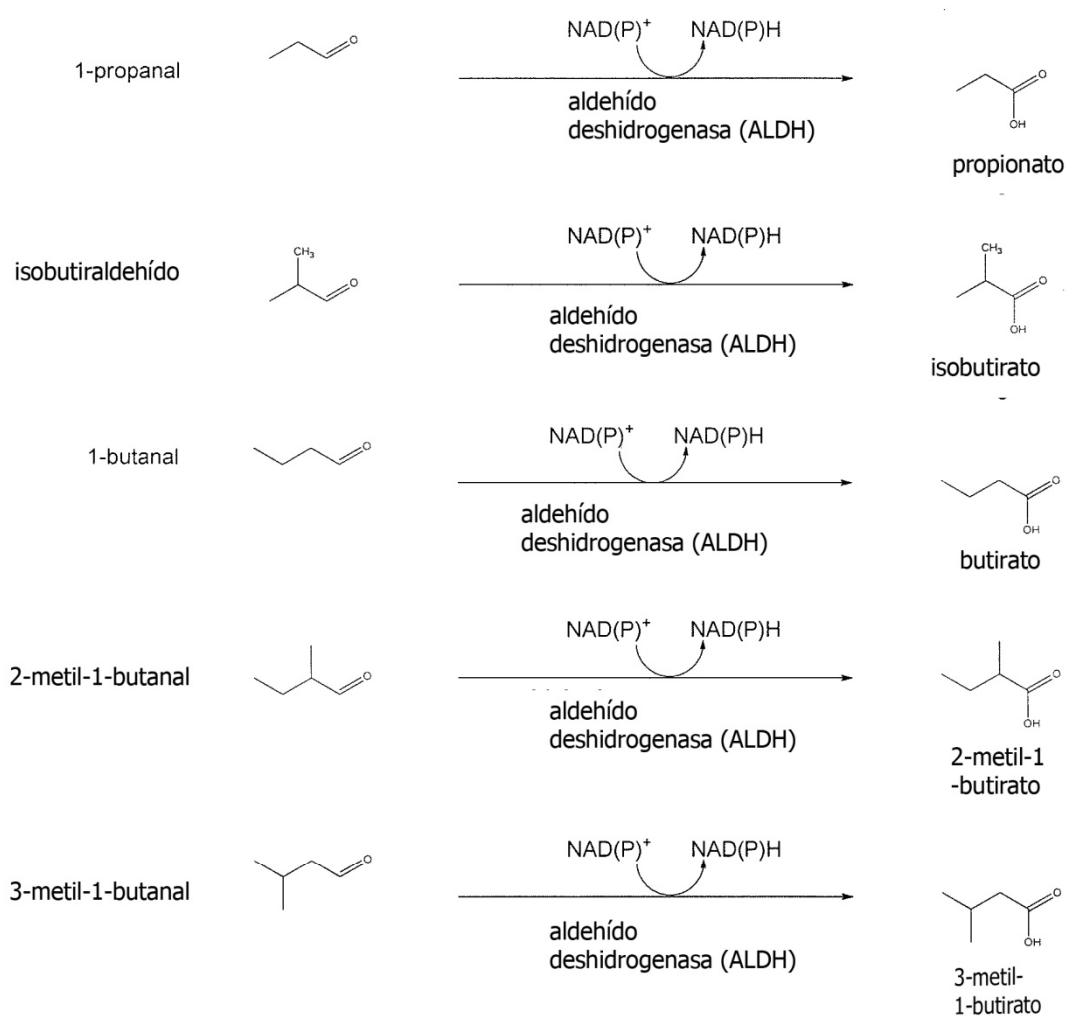


FIGURA 4

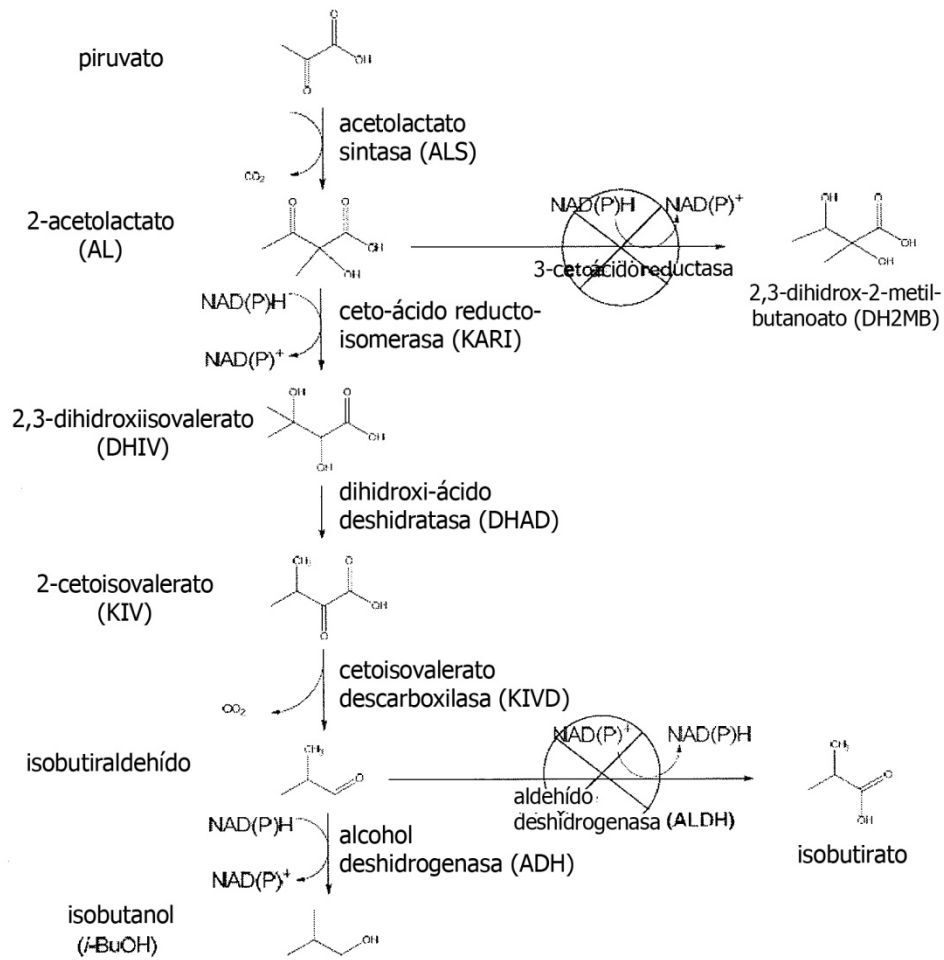


FIGURA 5

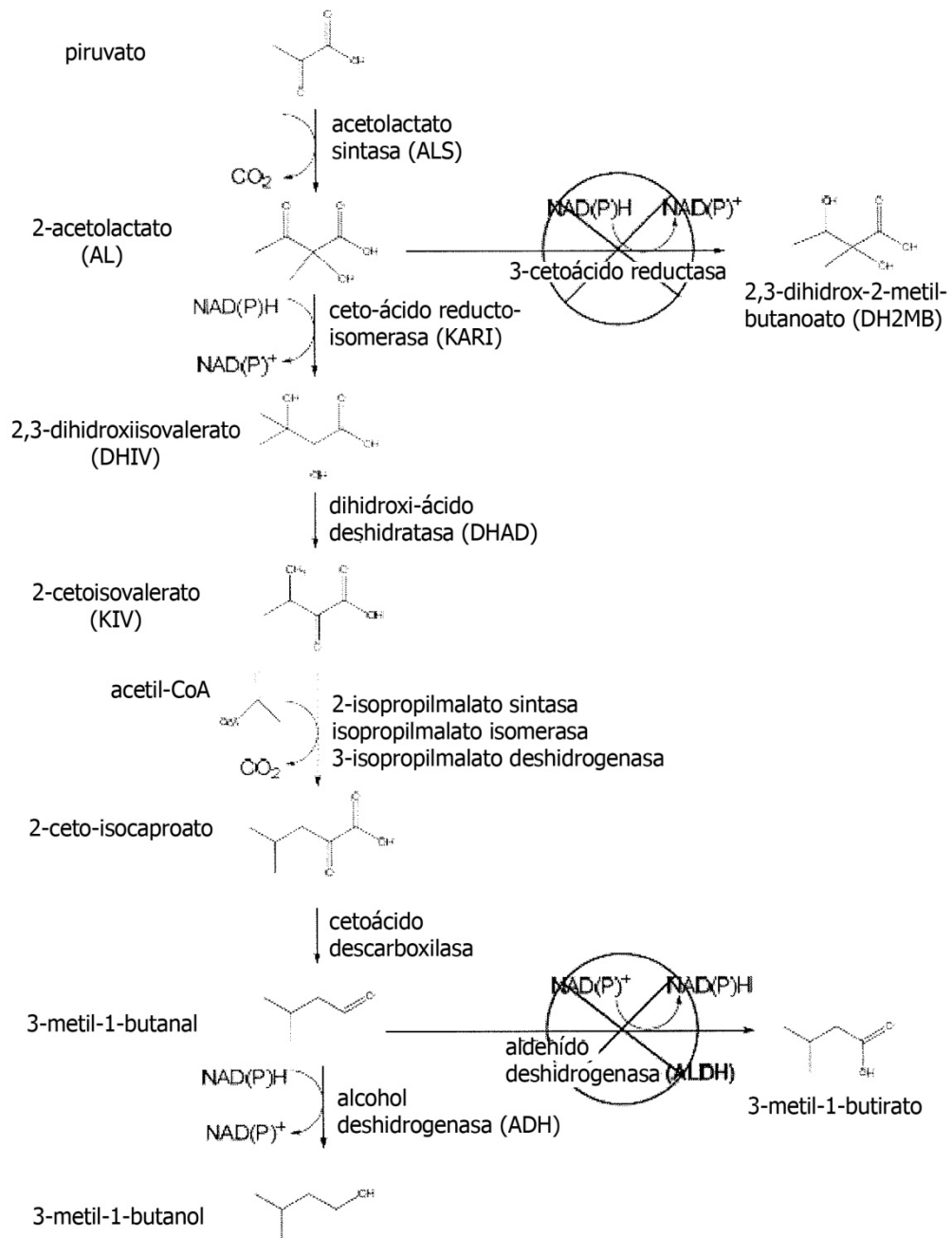


FIGURA 6

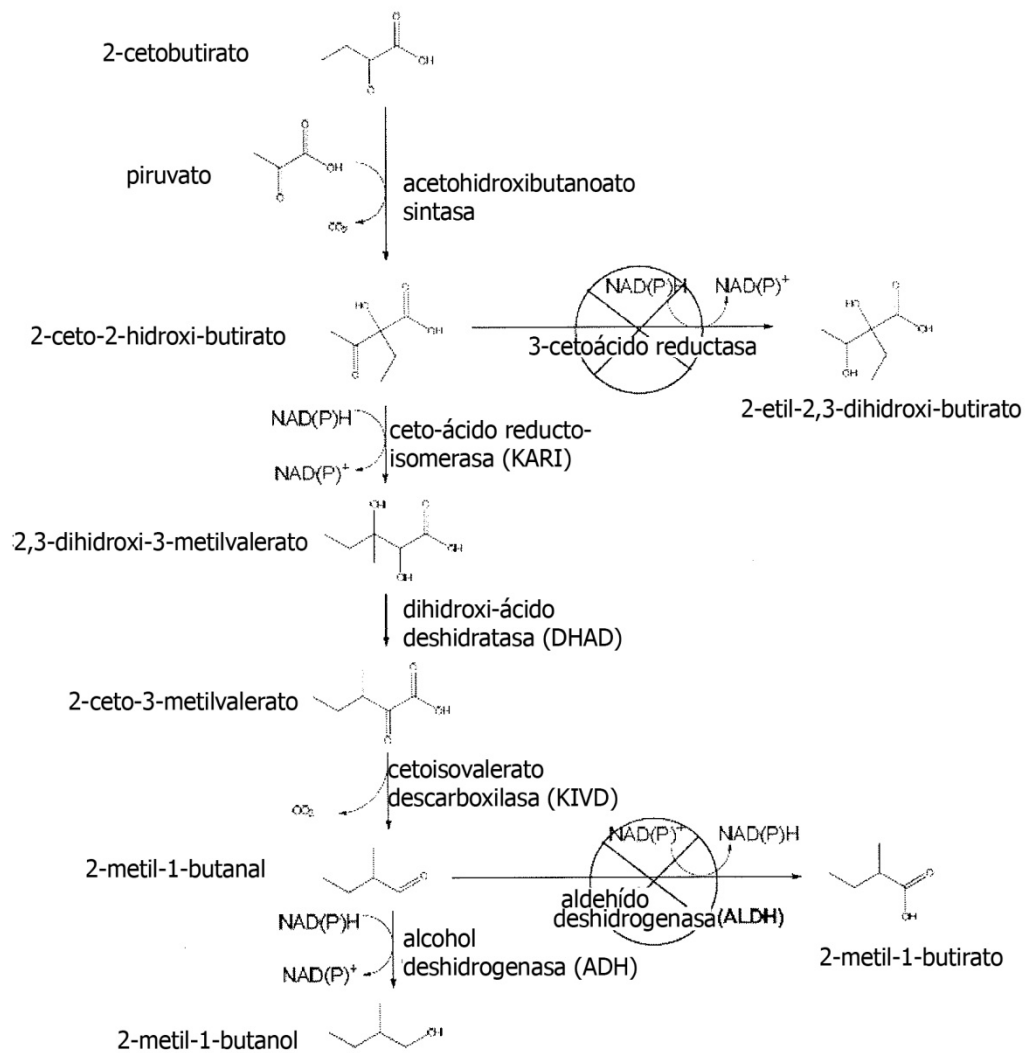


FIGURA 7

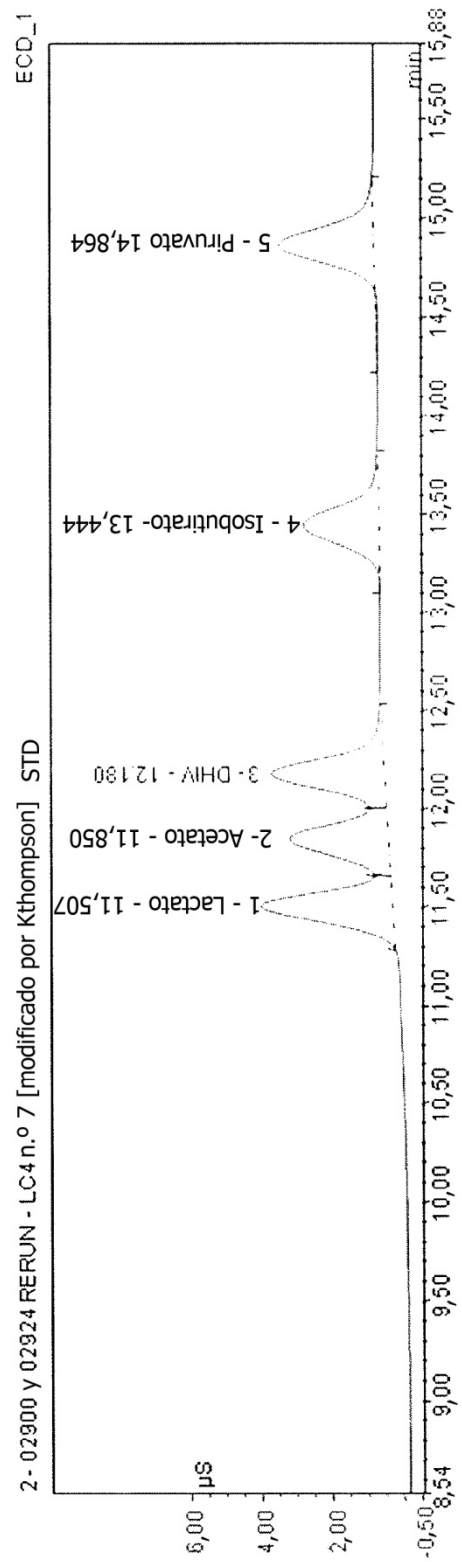
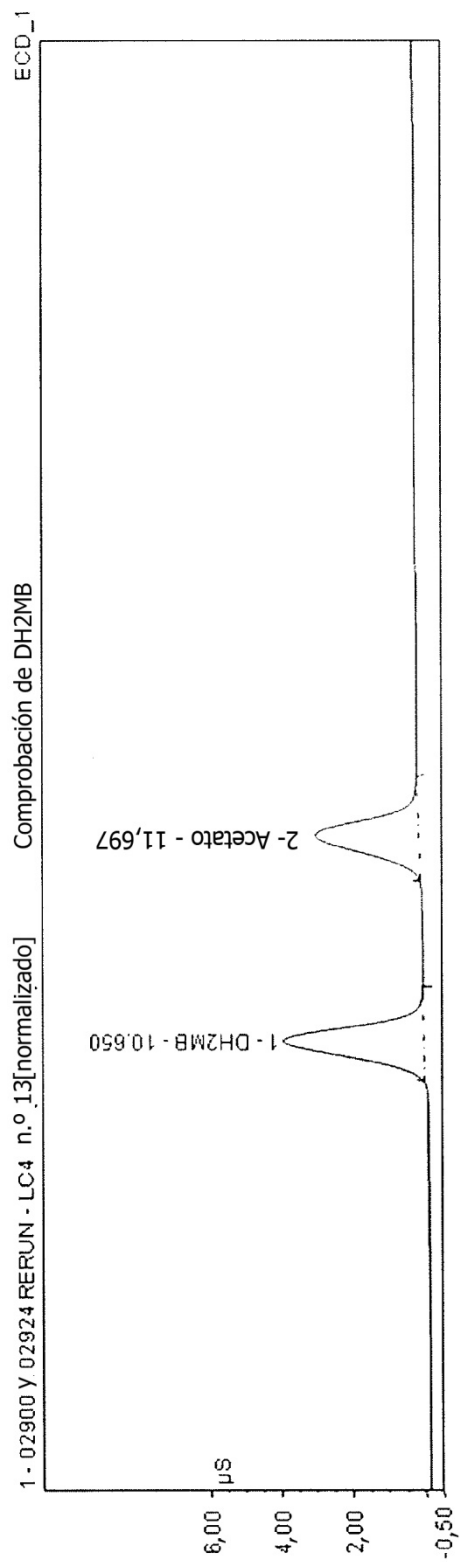


FIGURA 8

1 - 091215 - Arin oxoácido n.º 40 [modificado por dionex] STD
 2 - 091215 - Arin oxoácido n.º 41 A1-139 h (pocillo A9/seq 1820) --- MÁXIMO DE DHIV
 3 - 091215 - Arin oxoácido n.º 43 [1 máximo asignado manualmente] Acetolactato, 54,2 ppm
 4 - 091215 - Arin oxoácido n.º 45 [modificado por dionex, 1 máximo asignado manualmente] Lactato 100 ppm
 5 - 091215 - Arin oxoácido n.º 46 [1 máximo asignado manualmente] Formiato, 42,9 ppm
 6 - 091215 - Arin oxoácido n.º 48 [modificado por dionex, 1 máximo asignado manualmente] Piruvato 34,2 ppm
 7 - 091215 - Arin oxoácido n.º 50 [modificado por dionex, 2 máximos asignados manualmente] Acetato 100 ppm +
 Isobutirato 100 ppm [inyección de 4 ul]

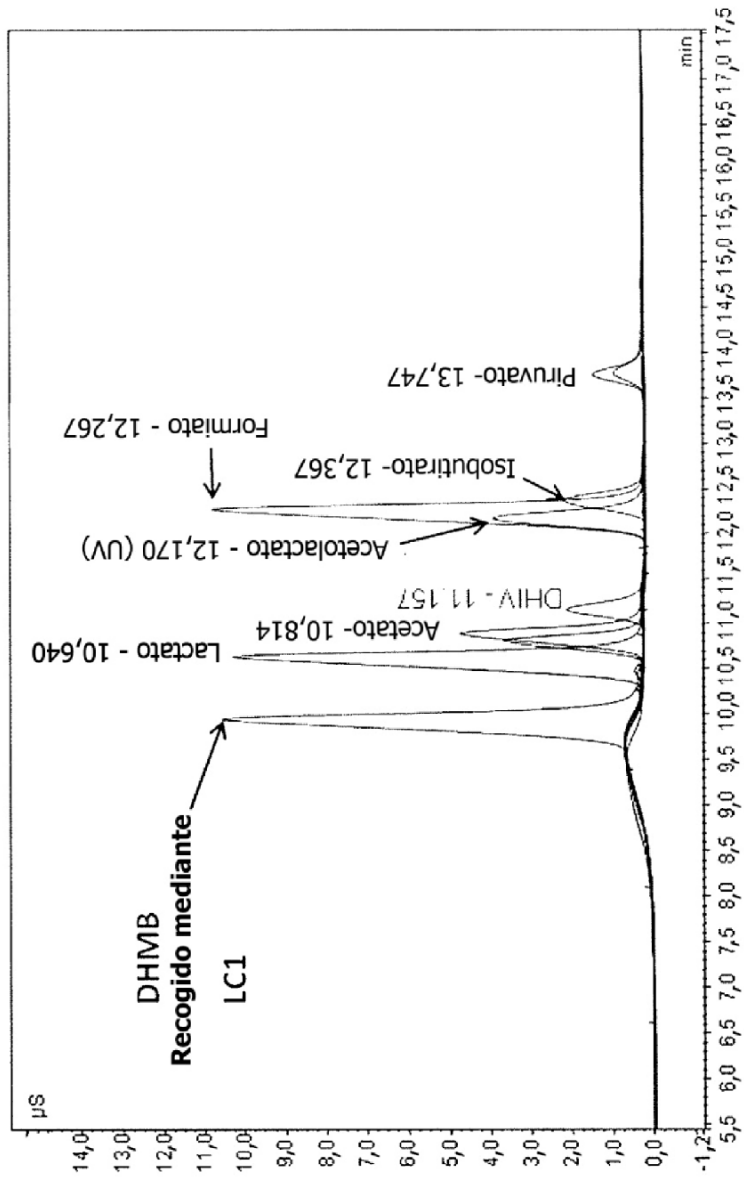


FIGURA 9

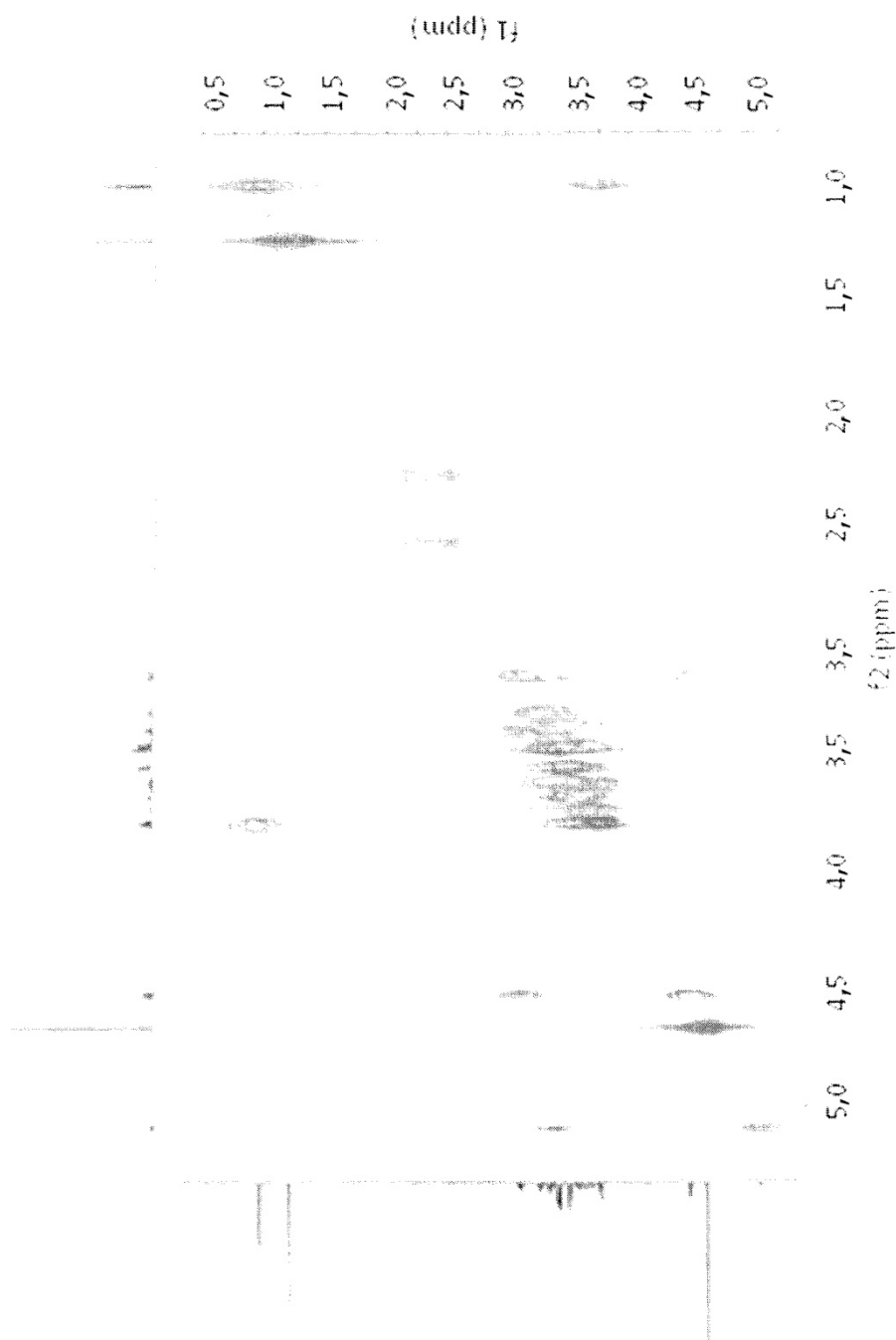


FIGURA 10

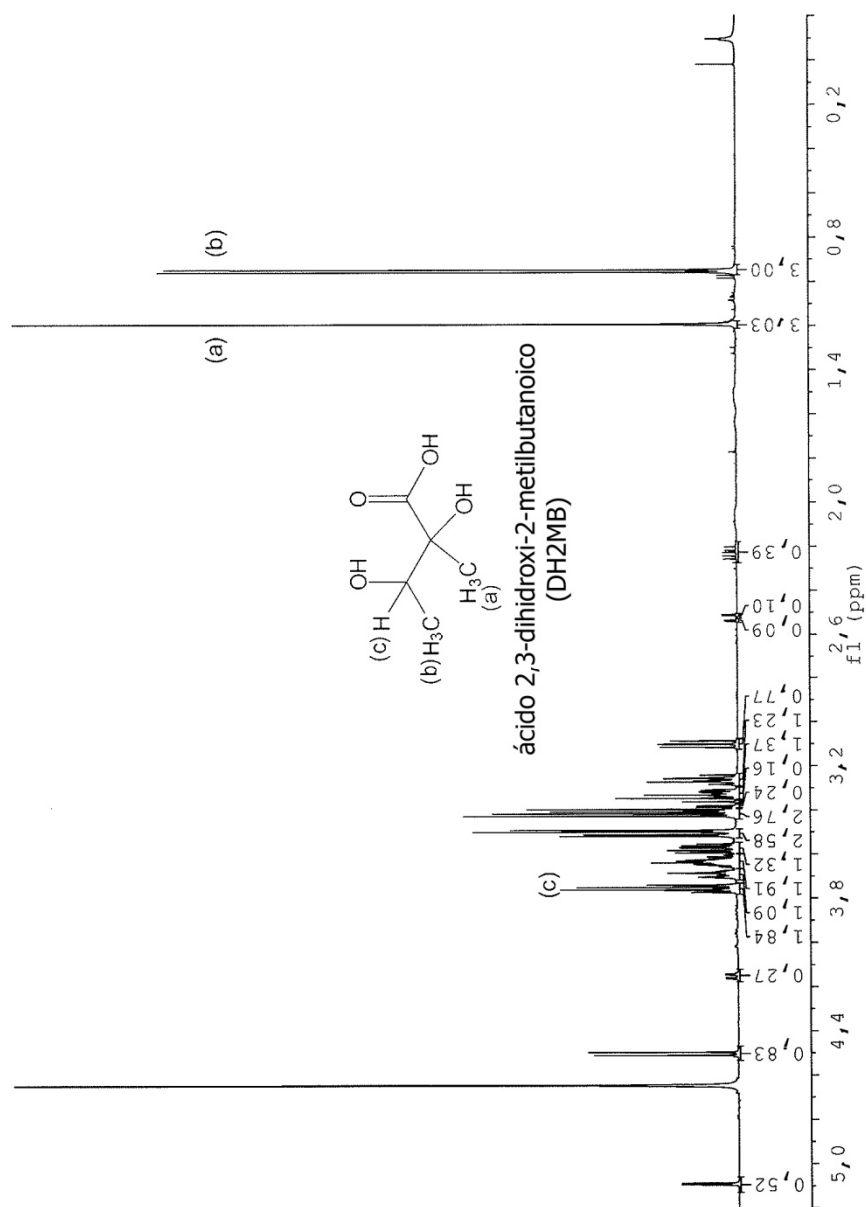


FIGURA 11

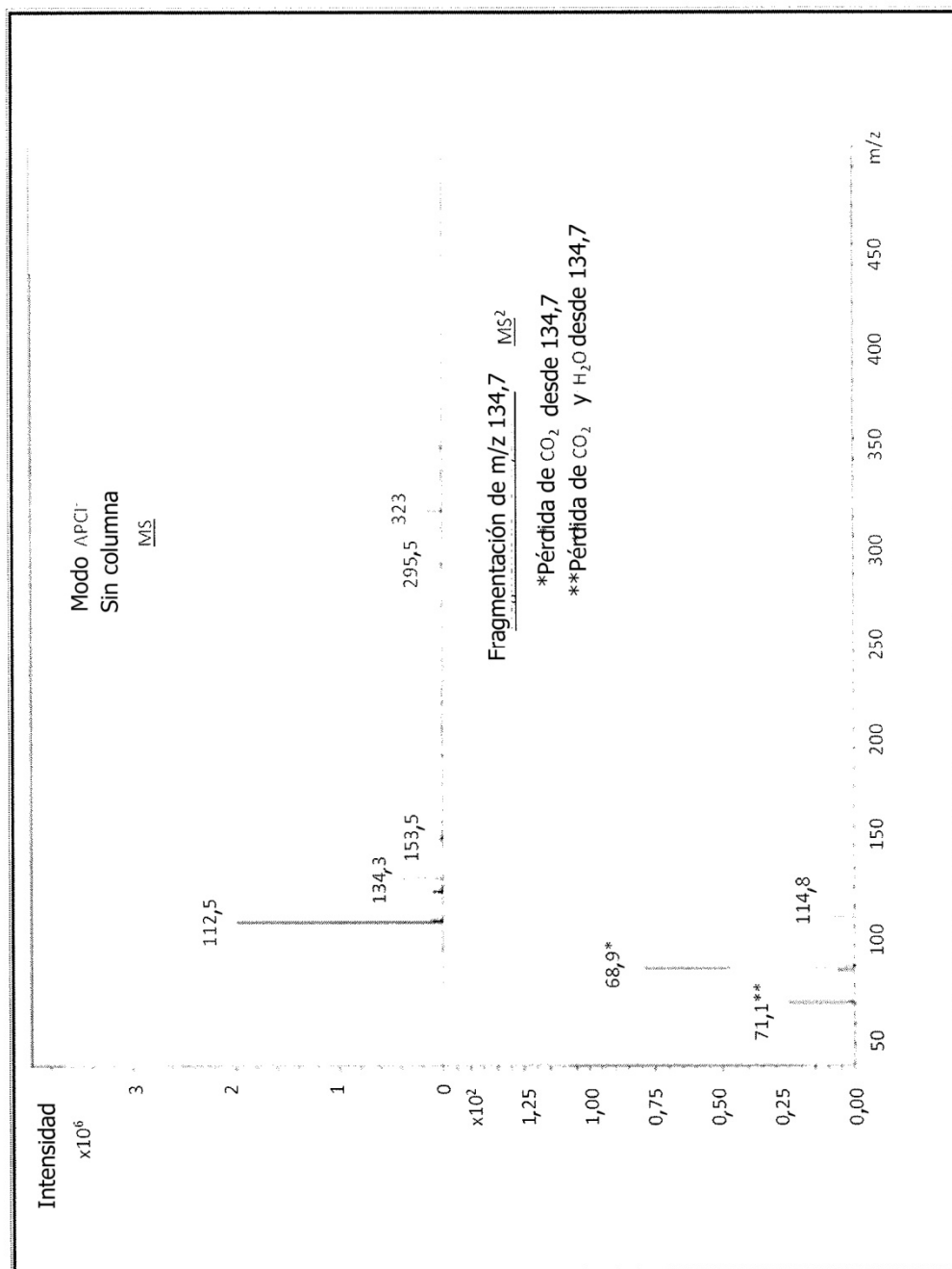
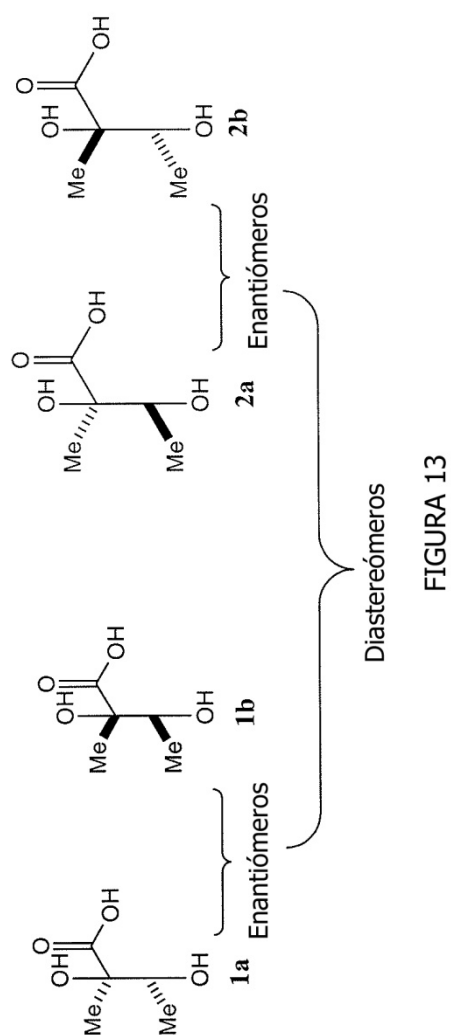


FIGURA 12



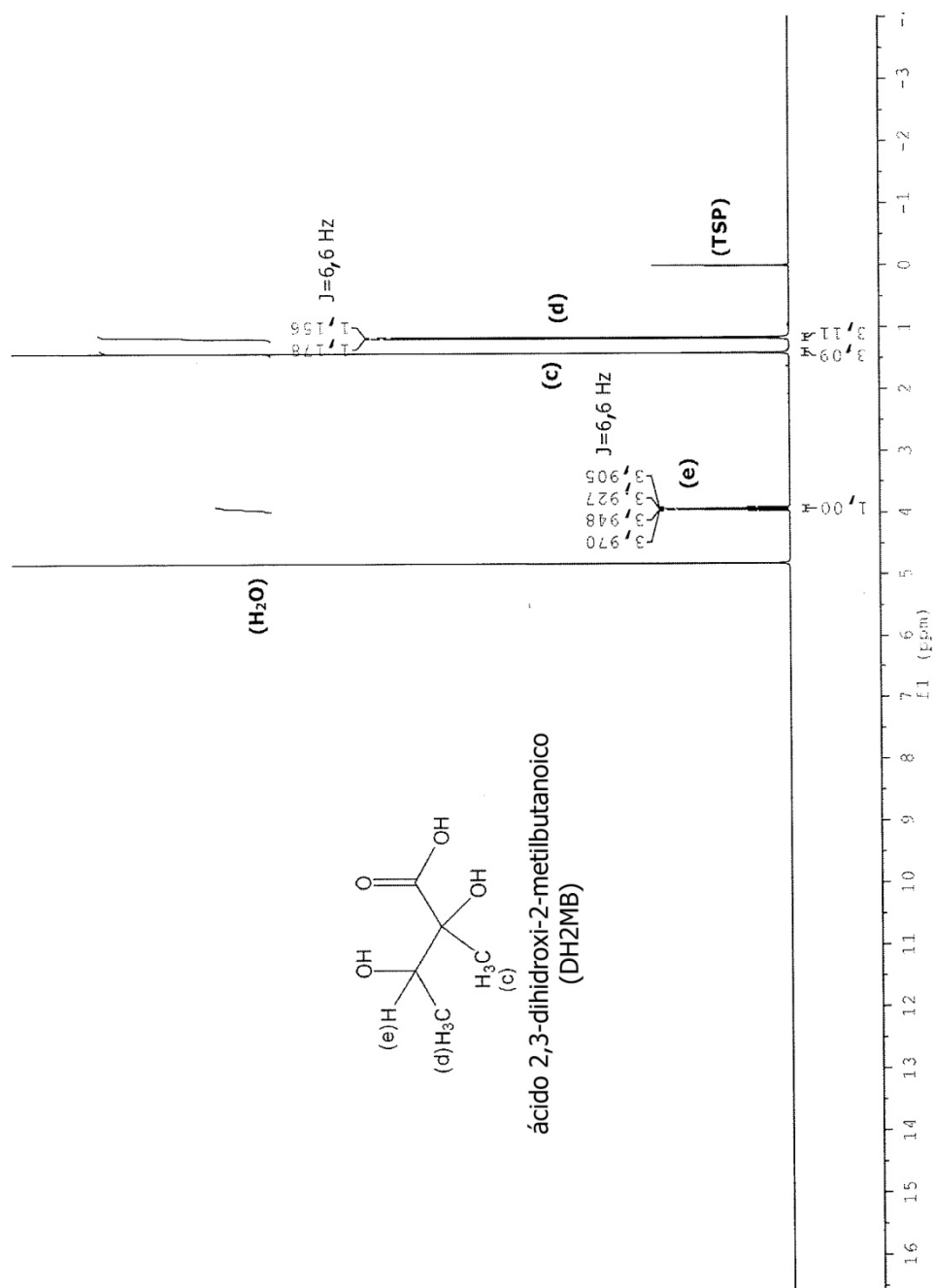


FIGURA 14

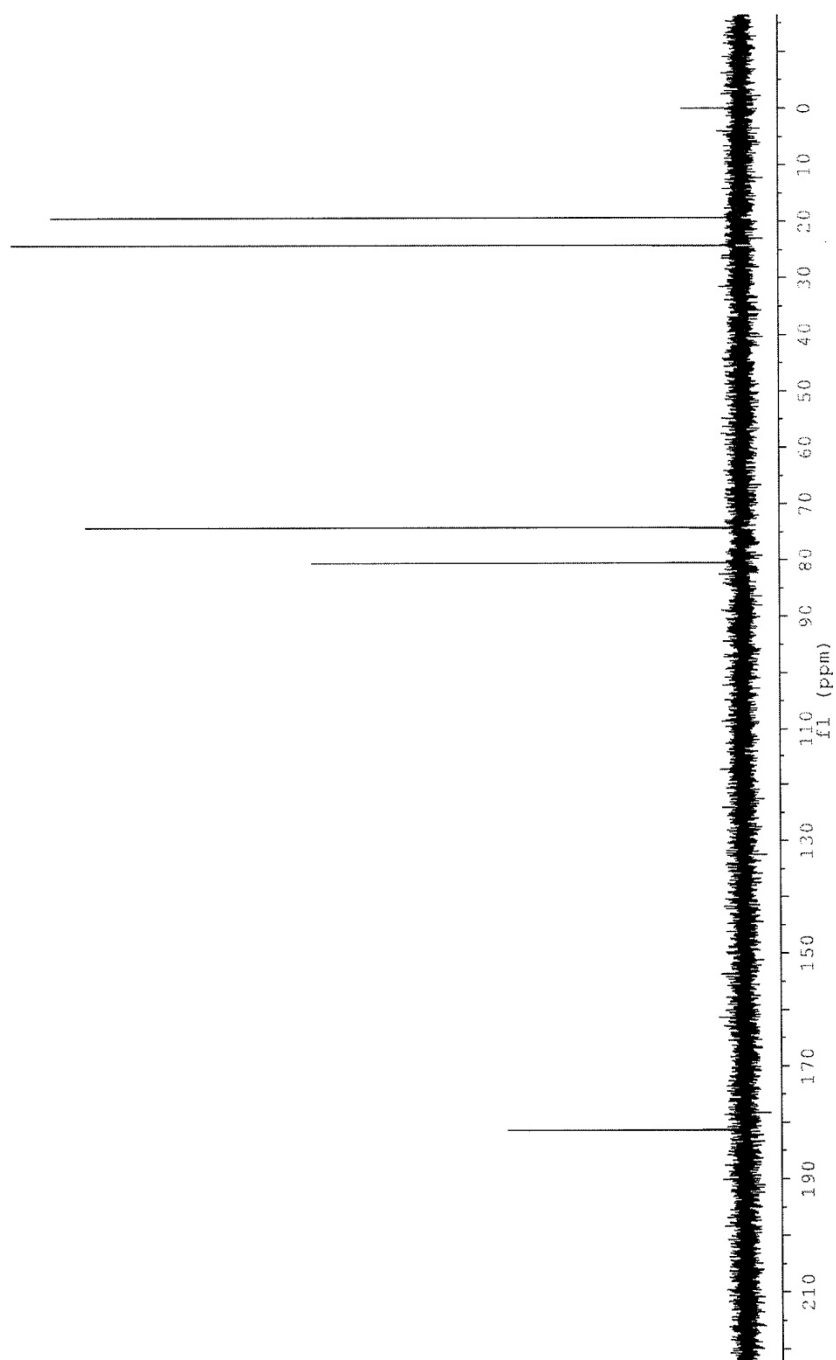


FIGURA 15

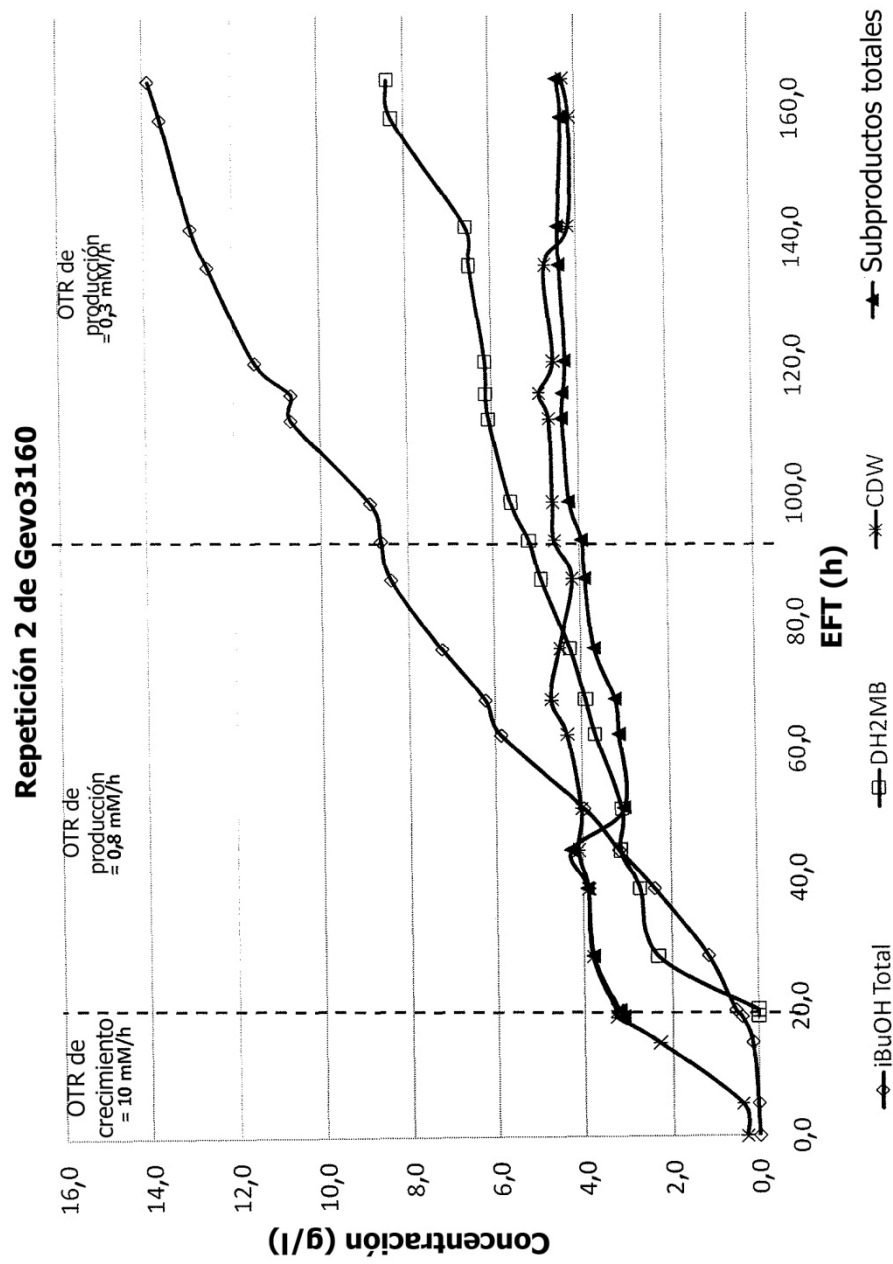


FIGURA 16

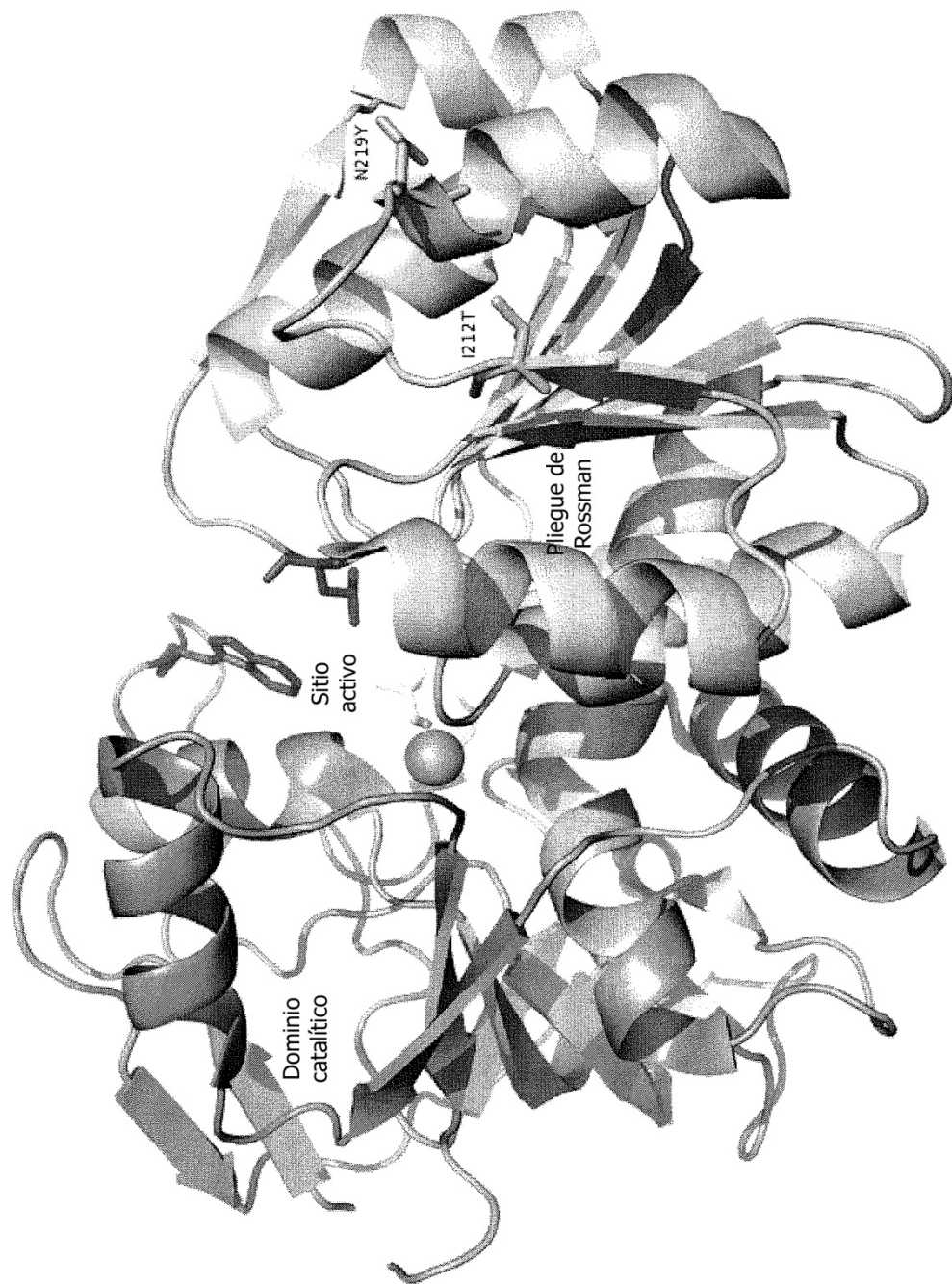


FIGURA 17

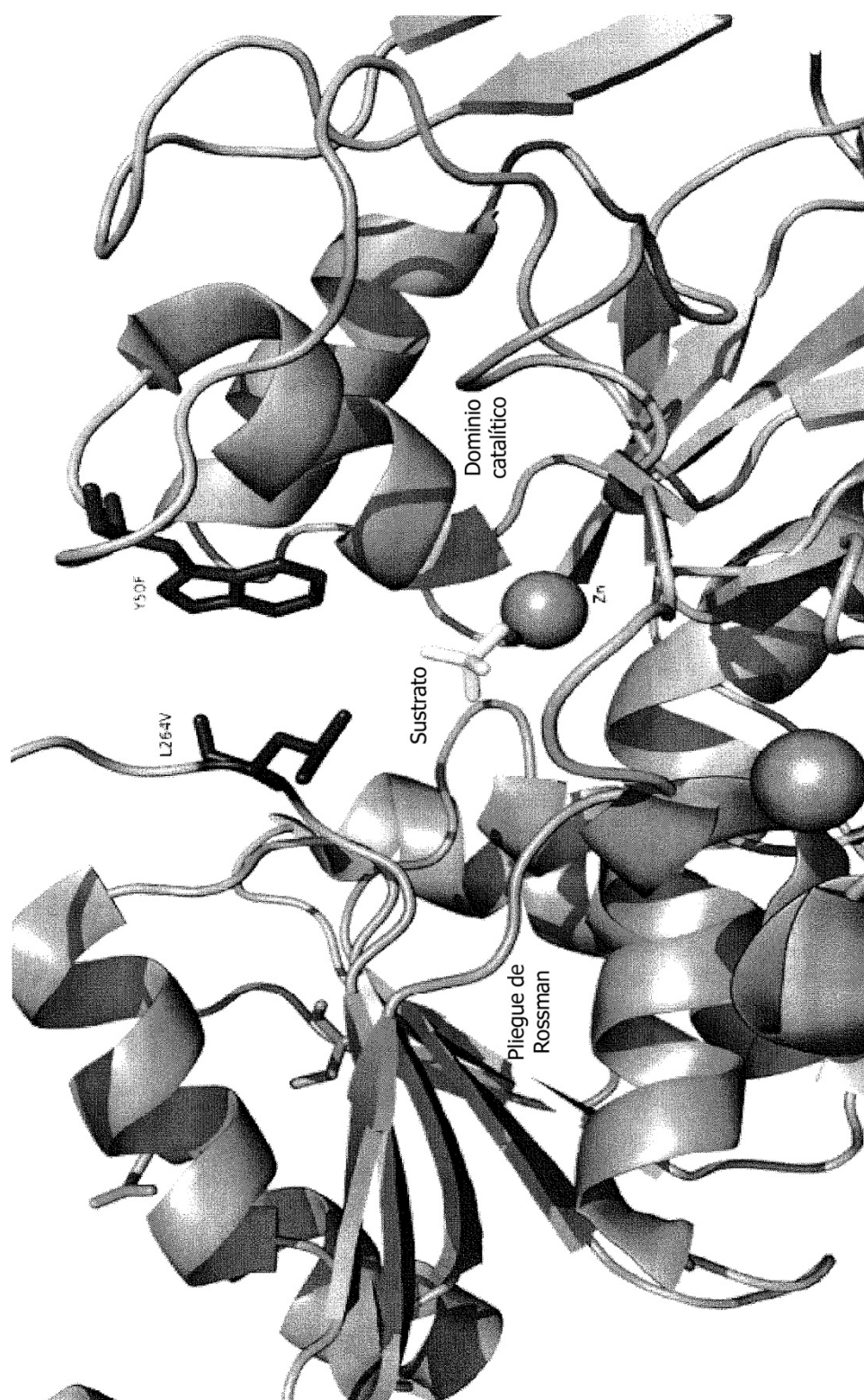


FIGURA 17 (CONT.)

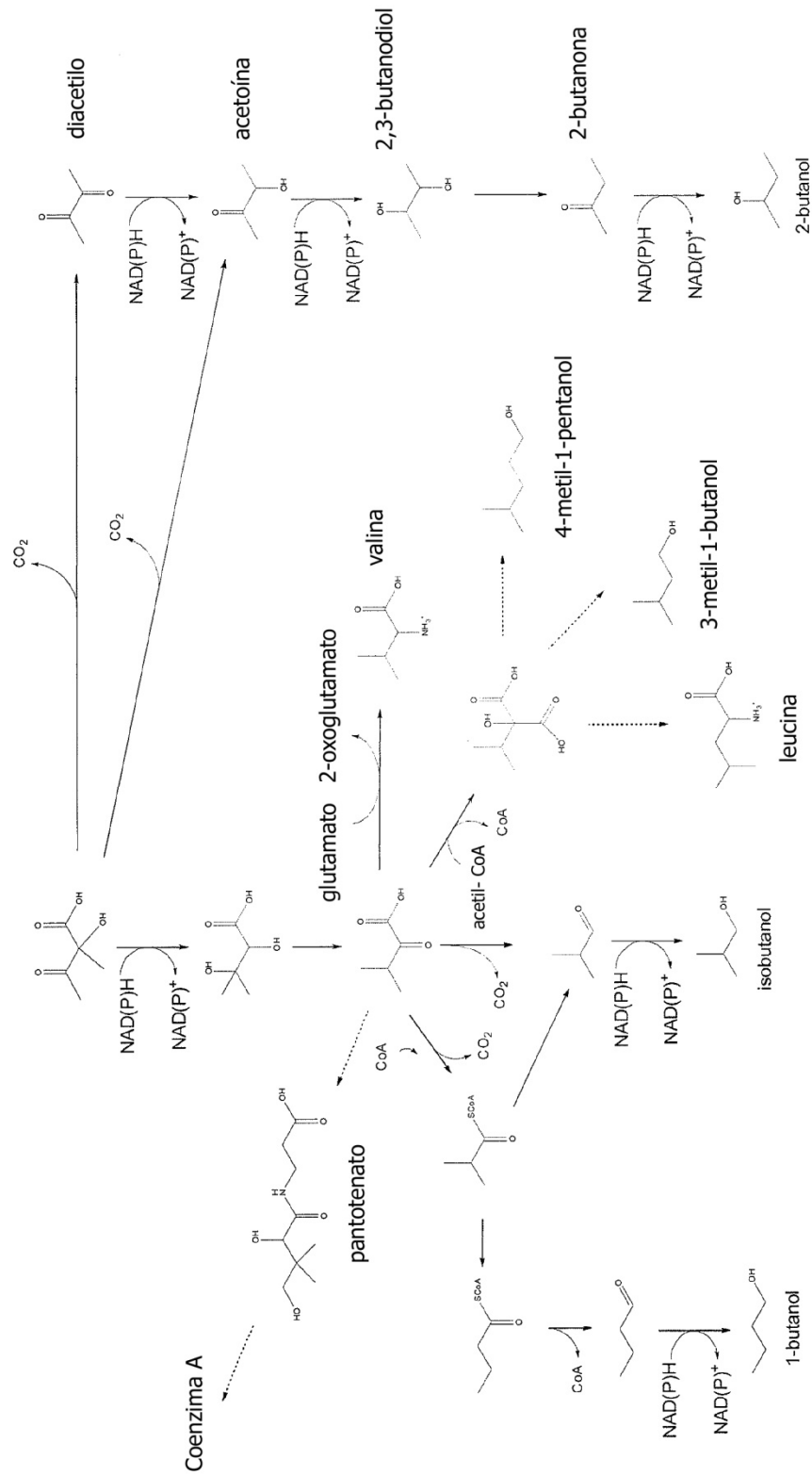


FIGURA 18

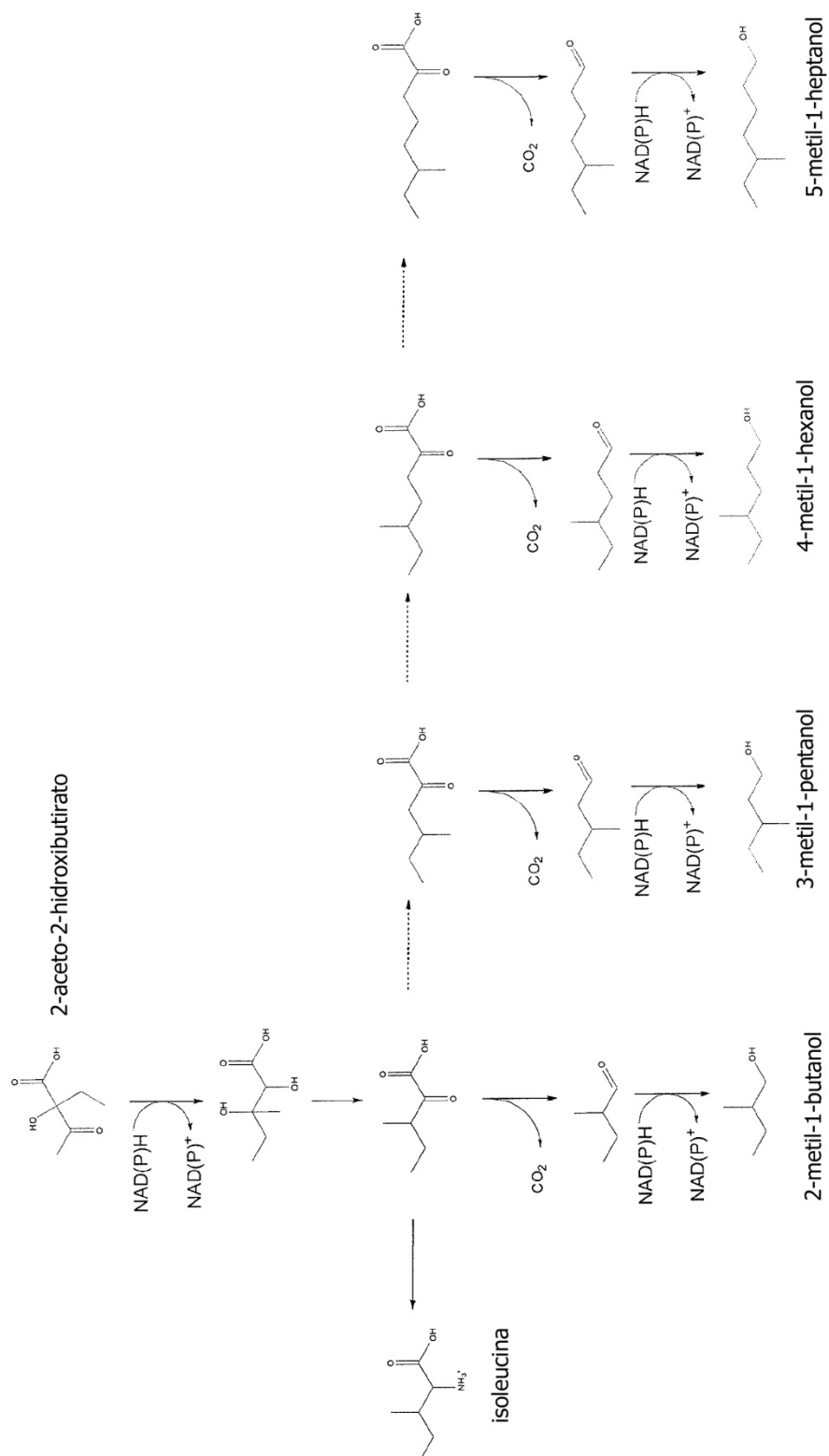


FIGURA 19

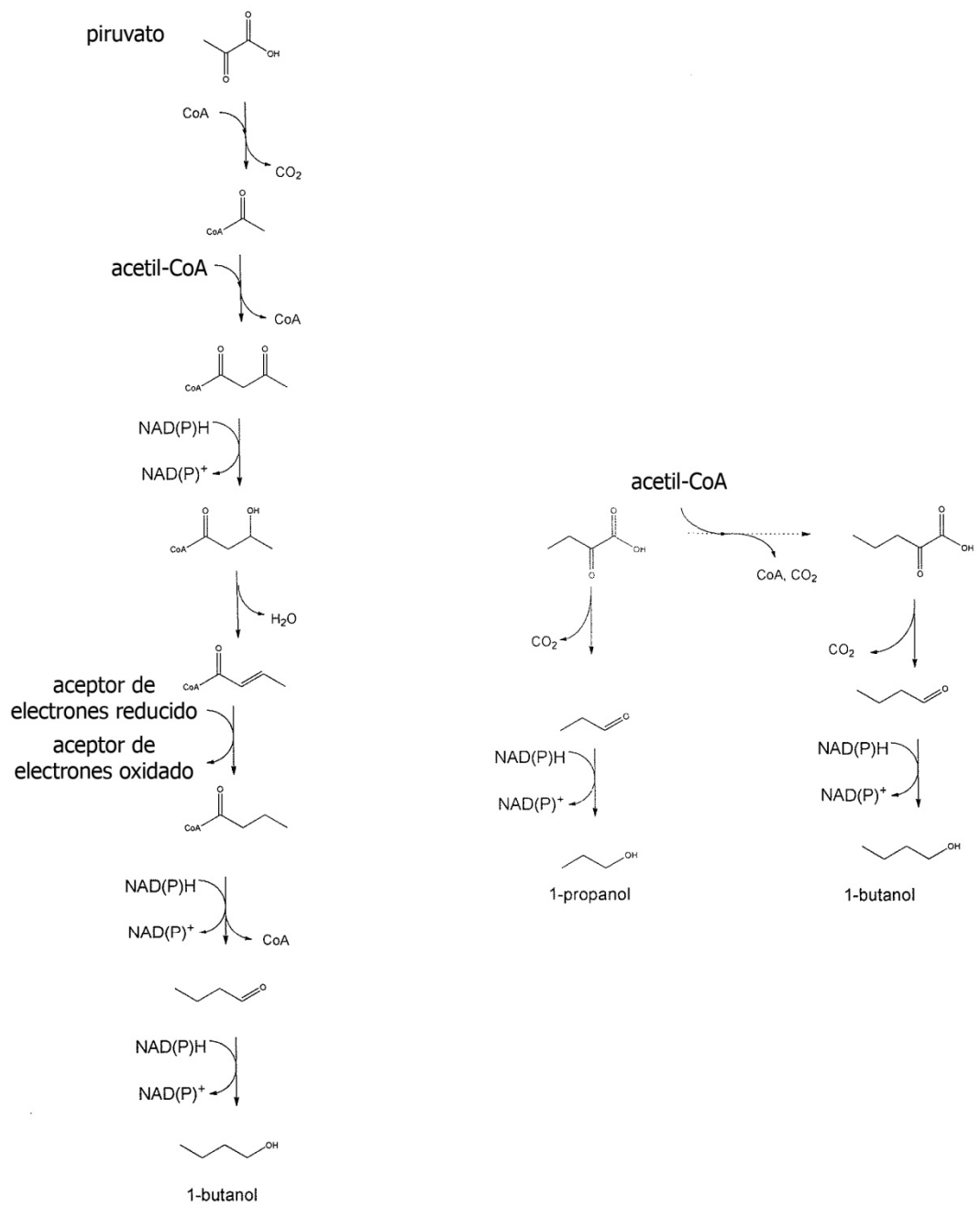


FIGURA 20