(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 757 913**

(51) Int. CI.:

C12N 9/04 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2014 PCT/US2014/043053**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14205146**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2014 E 14737468 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3011017**

(54) Título: **Composiciones y métodos para la producción biológica de lactato a partir de compuestos de C1 mediante el uso de transformantes de deshidrogenasa láctica**

(30) Prioridad:

18.06.2013 US 201361836609 P
16.01.2014 US 201461928390 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2020

(73) Titular/es:

CALYSTA, INC. (100.0%)
1140 O'Brien Drive, Suite B
Menlo Park, California 94025, US

(72) Inventor/es:

SAVILLE, RENEE, M.;
LEE, SUNGWON;
REGITSKY, DREW, D.;
RESNICK, SOL, M. y
SILVERMAN, JOSHUA

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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

Composiciones y métodos para la producción biológica de lactato a partir de compuestos de C1 mediante el uso de transformantes de deshidrogenasa láctica

ANTECEDENTES

[0001] El ácido láctico, que se puede producir químicamente o biológicamente, es un compuesto químico ampliamente usado que varía deñ uso en la industria cosmética para uso en la industria alimentaria para las industrias farmacéutica y química. Dado que el ácido láctico contiene dos grupos funcionales reactivos, un grupo carboxílico y un grupo hidroxilo, puede experimentar una variedad de conversiones químicas en productos químicos potencialmente útiles, como óxido de propileno, acetaldehído, ácido acrílico, ácido propanoico, 2,3-pentanodiona y lactida (Varadarajan y Miller, Biotechnol. Progr. 15: 845, 1999). Recientemente, se ha prestado mayor atención al uso de ácido láctico para producir ácido poliláctico (PLA), que es una materia prima renovable utilizada en el fabricación de bioplásticos que ofrece una alternativa más sostenible a los recursos petroquímicos. El ácido láctico ópticamente puro se puede polimerizar en un PLA de alta masa molecular a través de las reacciones en serie de policondensación, despolimerización y polimerización de apertura de anillo (Södergård y Stolt, Prog. Polym. Sci. 27: 1123, 2002). El polímero PLA resultante tiene varios usos en una amplia gama de aplicaciones, que incluyen ropa protectora, empaque de alimentos, película de mantillo, bolsas de basura, recipientes rígidos, envoltura retráctil y bandejas de corta duración (Drumright et al., Adv. Mater. 12: 1841, 2000; Vink et al., Polym. Degrad. Stabil. 80: 403, 2003).

[0002] Las materias primas de carbohidratos actualmente utilizadas en la producción biológica de lactato son relativamente caras. Otras materias primas, como el metano, están disponibles a bajo precio en grandes cantidades. La conversión de metano potencialmente representa una ruta para reducir significativamente el costo de producción de ácido láctico. Sin embargo, aún no se ha desarrollado una forma práctica de lograr esto.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0003] La invención proporciona bacterias metanotróficas obligadas que comprenden un ácido nucleico heterólogo que codifica una deshidrogenasa de lactato (LDH), en donde las bacterias metanotróficas es capaz de convertir el metano en lactato.

[0004] La invención también proporciona un método de producción de lactato, que comprende cultivar bacterias metanotróficas de la invención en presencia de una materia prima de carbono que comprende metano en condiciones suficientes para la producción de lactato, en donde las bacterias metanotróficas convierten metano a lactato.

BREVE SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

[0005] Se describe aquí bacterias metabolizadoras C_1 de origen no natural que comprenden un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato (LDH).

[0006] También se describe un microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 es un metanótrofo.

[0007] En este documento se describe un microorganismo metabolizador C_1 que no se produce de forma natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 es capaz de convertir una materia prima de carbono en lactato, y en la que la materia prima de carbono se selecciona del grupo compuesto por metano, dióxido de carbono, monóxido de carbono, gas natural y gas de síntesis.

[0008] También se describe aquí un microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 no es una levadura.

[0009] Se describe además un microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural es capaz de producir más de lactato en comparación con la del microorganismo metabolizador de referencia correspondiente C_1 cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 en al menos un conjunto de condiciones de cultivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0010]

La Figura 1 representa el nivel de producción de lactato para cierto Metilococcus capsulatus (Bath) recombinante que expresa un ácido nucleico de deshidrogenasa de lactato (*ldh)* heterólogo en comparación con la OD_{600} después de 72 horas de crecimiento.

La Figura 2 representa la distribución $\delta^{13}C$ de varias fuentes de carbono.

La Figura 3 representa el vector pMS3 que comprende secuencias que codifican una proteína de iniciación de replicación (trfA) y un promotor (Pbla), un origen de replicación (oriV), un origen de transferencia (oriT), sitios de clonación múltiple (MCS), gen de resistencia a la kanamicina (KanR) y promotor (KanR_promoter) y origen de replicación para *E. coli* (pUC_Ori_rc).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0011] La presente descripción proporciona microorganismos metabolizadores de origen no natural C_1, y composiciones y métodos relacionados para la biosíntesis de lactato a partir de una materia prima de carbono. Típicamente, el material de alimentación de carbono comprende un sustrato C_1. En una realización específica, la descripción proporciona bacterias metabolizadoras de origen no natural C_1 que comprenden un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato (LDH). También se describe un microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 es un metanótrofo. En una realización específica, la presente descripción proporciona un microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizante C_1 es capaz de convertir una materia prima de carbono en lactato. Típicamente, la materia prima de carbono se selecciona del grupo que consiste en metano, dióxido de carbono, monóxido de carbono, gas de síntesis y gas natural. La presente divulgación proporciona además un microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 no es una levadura. En una realización todavía adicional, la presente descripción proporciona un Microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural es capaz de producir más de lactato en comparación con el de un microorganismo metabolizador C_1 de referencia correspondiente cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 en al menos un conjunto de condiciones de cultivo. En una realización adicional, la presente descripción proporciona un microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 no natural es capaz de producir más lactato en comparación con el de un microorganismo metabolizador C_1 de referencia correspondiente cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 en al menos un conjunto de condiciones de cultivo.

[0012] Antes de exponer esta descripción con más detalle, puede ser útil para la comprensión del mismo proporcionar definiciones de ciertos términos que se usan en este documento. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de esta descripción.

[0013] En la presente descripción, la descripción de cualquier rango en el presente documento pretende ser una divulgación de cualquier número dentro de la gama, y una divulgación de cualquier intervalo formado por cualquier número dentro del intervalo, incluyendo los puntos finales. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa 6 20% del rango, valor o estructura indicados, a menos que se indique lo contrario. El término "que consiste esencialmente en 'limita el alcance de una reivindicación a los materiales o pasos especificados, o a aquellos que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Debe entenderse que los términos "un" y "una" como se usan en el presente documento se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados. El uso de la alternativa "o" debe entenderse como uno, ambos o cualquier combinación de los mismos. Como se usa en el presente documento, los términos "incluir", "tener" y "comprender" no excluyen la presencia de otros elementos no de otra manera específicamente excluidos.

[0014] Cuando se utiliza en conexión con un polipéptido, los términos "deshidrogenasa de lactato" y "LDH" se usan indistintamente en este documento para referirse a un polipéptido que tiene actividad de deshidrogenasa de lactato, es decir, es capaz de catalizar la reducción de piruvato a lactato. En algunas realizaciones, la deshidrogenasa de lactato es una L-deshidrogenasa de lactato, que cataliza la reducción de piruvato a L-lactato (EC 1,1,1. 27) En otras realizaciones, la deshidrogenasa de lactato es una deshidrogenasa de D-lactato, que cataliza la reducción de piruvato a D-lactato (EC 1,1,1,28).

[0015] El término "materia prima de carbono" se refiere aquí a cualquier compuesto de carbono capaz de ser metabolizado por el microorganismos metabolizador C_1 de origen no natural de la presente descripción, tales como, p. ej., un sustrato C_1.

[0016] Como se usa en este documento, el término “Sustrato C_1" se refiere a cualquier molécula que contiene carbono que carece de un enlace carbono-carbono. Los sustratos C_1 se pueden encontrar en el gas natural, el gas natural no convencional, el gas de síntesis, e incluyen moléculas como, p. ej., metano, metanol, formaldehído, ácido fórmico (formiato), monóxido de carbono, dióxido de carbono, aminas metiladas (p. ej., metilamina), dimetilamina, trimetilamina, etc.), tioles metilados, halógenos de metilo (p. ej., bromometano, clorometano, yodometano, diclorometano, etc.), cianuro y similares.

[0017] Como se usa en este documento, el término "metano" se refiere al compuesto alcano (C_1) más simple con la fórmula química CH_4, que es un gas incoloro y inodoro a temperatura y presión ambiente.

[0018] Como se usa en este documento, el término "gas natural" se refiere a mezclas de origen natural de gas subterráneas que contienen metano. El gas natural puede ser accesible desde depósitos porosos mediante procesos convencionales (p. ej., perforación, inundación de agua). Aunque está compuesto principalmente de metano, el gas natural también puede comprender otros gases alcalinos ligeros (*p. ej.,* etano, propano, butano, pentano), dióxido de carbono, nitrógeno, sulfuro de hidrógeno o similares, o cualquier combinación de los mismos.

[0019] El término, "gas natural no convencional", se refiere aquí a mezclas de gases que ocurren naturalmente creadas en formaciones de baja permeabilidad a las que se debe acceder por métodos convencionales, tales como fracturación hidráulica, perforación horizontal o la perforación direccional. Los depósitos de gas natural no convencionales ejemplares incluyen arenas de gas apretadas formadas en piedra arenisca o carbonato, metano de lecho de carbón formado en depósitos de carbón y adsorbido en partículas de carbón, gas de esquisto formado en roca de esquisto de grano fino y adsorbido en partículas de arcilla o mantenido dentro de poros pequeños o microfracturas, hidratos de metano que son una combinación cristalina de gas natural y agua formada a baja temperatura y alta presión en lugares como debajo de los océanos y el permafrost. El gas natural no convencional tiende a tener una composición más variable, que incluye tener niveles potencialmente más altos de etano, propano, butano, CO_2 o cualquier combinación de los mismos, en comparación al gas natural convencional.

[0020] Como se usa en este documento, los términos "gas de síntesis" o "syngas" se refiere a una mezcla de gas producido sintéticamente que contiene principalmente monóxido de carbono (CO) e hidrógeno (H2). El gas de síntesis puede producirse, p. ej., mediante reformado con vapor de gas natural o hidrocarburos líquidos, o mediante gasificación de carbón, biomasa o desechos. El gas de síntesis también puede incluir metano, CO_2, H_2S y otros gases en cantidades más pequeñas en relación con CO y H_2.

[0021] Como se usa en el presente documento, “microorganismo metabolizador C_1" se refiere a cualquier microorganismo que tiene la capacidad de uso (es decir, a metabolizar) un sustrato C_1 como una fuente de energía, la biomasa, y puede o no puede usar otros sustratos de carbono (tales como azúcares y carbohidratos complejos) para energía y biomasa. Los microorganismos metabolizadores de C_1 incluyen bacterias (como metanotrofos y metilotrofos) y levaduras. En ciertas realizaciones, un microorganismo metabolizador C_1 no incluye un microorganismo fotosintético, como las algas. En ciertas realizaciones, un microorganismo metabolizador C_1 será un " microorganismo metabolizador C_1 obligado”, lo que significa que requiere sustratos de C_1 como fuente de energía. En realizaciones adicionales, se cultivará un microorganismo metabolizador C_1 (p. ej., metanotrofo) en presencia de un sustrato de C_1 (es decir, usando el sustrato de C_1 como fuente de energía).

[0022] Como se usa en este documento, los términos "metanótrofo", "bacteria metanotrófica" o "bacterias metanotróficas" se refieren indistintamente en este documento a bacterias metilotróficas capaces de utilizar metano. Por ejemplo, el metano del gas natural puede usarse como fuente de carbono y energía para el crecimiento. Como se usa en este documento, el término "bacterias metanotróficas" incluye "bacterias metanotróficas obligatorias" que solo pueden utilizar metano (p. ej., a partir de gas natural) para fuentes de carbono y energía y "bacterias metanotróficas facultativas" que son naturalmente capaces de usar sustratos de múltiples carbonos, tales como acetato, piruvato, succinato, malato o etanol, además del metano como fuente de carbono y energía.

[0023] Como se usa en este documento, el término "metilotrofo" o "bacterias metilotróficas" se refiere a cualquier bacteria capaces de utilizar compuestos de un carbono (es decir, compuestos que no contienen enlaces carbono-carbono). En ciertas realizaciones, una bacteria metilotrófica puede ser un metanotrófico. Por ejemplo, "bacteria metanotrófica" se refiere a cualquier bacteria metilotrófica que tenga la capacidad de utilizar metano como fuente primaria de carbono y energía. Las bacterias metanotróficas ejemplares incluyen Metilomonas, Metilobacter, Metilococcus, Metilosinus, Metilocystis, Metilomicrobium o Metanomonas. En ciertas otras realizaciones, la bacteria metilotrófica es una "bacteria metilotrófica obligada", que se refiere a bacterias que están limitadas al uso de sustratos de C_1 para la generación de energía.

[0024] Como se usa en este documento, el término "huésped" se refiere a una célula o microorganismo (*p. ej.,* Metanótrofo) que puede ser genéticamente modificado con un ácido nucleico exógeno para producir un polipéptido de interés (p. ej., deshidrogenasa de lactato). En ciertas realizaciones, una célula huésped puede poseer o modificarse opcionalmente para incluir otras modificaciones genéticas que confieren propiedades deseadas que están relacionadas o no relacionadas con la LDH exógena codificada por el ácido nucleico exógeno (*p. ej.,* piruvato descarboxilasa eliminada). Por ejemplo, una célula huésped puede poseer modificaciones genéticas que: minimizan o reducen la utilización del producto de lactato que se produce, minimizan o reducen la producción de inhibidores del crecimiento de la célula huésped, proporcionan un alto crecimiento, proporcionan tolerancia a contaminantes o condiciones de cultivo particulares (p. ej., tolerancia al ácido, resistencia a los biocidas), confieren la capacidad de metabolizar sustratos de carbono adicionales, o confieren la capacidad de sintetizar productos o productos intermedios deseables adicionales.

[0025] Como se usa en este documento, los términos "molécula de ácido nucleico" y "ácido nucleico" se utilizan indistintamente para referirse a un compuesto polimérico que comprende subunidades unidas covalentemente de nucleótidos. La producción sintética de ácidos nucleicos incluye métodos químicos y biológicos de reproducción de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos incluyen ácido polirribonucleico (ARN), ácido polidesoxirribonucleico (ADN), que pueden ser monocatenarios o bicatenarios. El ADN incluye ADNc, ADN genómico, ADN sintético, ADN semisintético o similares. Los términos "ácido nucleico de LDH" y "ácido nucleico que codifica LDH" se usan indistintamente en la presente memoria para un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad LDH.

[0026] Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de aminoácidos.

[0027] Como se usa en este documento, los términos "recombinante" o "no natural" (o "no de origen natural") se refieren indistintamente a un organismo, microorganismo, célula, los ácidos nucleicos, o vector que incluye al menos una alteración genética o ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico exógeno, o se refiere a una célula que ha sido alterada de tal manera que la expresión de un ácido nucleico o gen endógeno puede controlarse, donde tales alteraciones o modificaciones son introducidas o inducidas por ingeniería genética. Las alteraciones genéticas incluyen, p. ej., modificaciones que introducen ácidos nucleicos expresables que codifican proteínas o enzimas, u otras adiciones, deleciones, sustituciones u otras alteraciones funcionales del material genético de una célula o modificaciones logradas mediante la evolución clásica de la cepa o métodos de evolución molecular dirigida que se conocen en el técnica. Dichas modificaciones incluyen, p. ej., modificaciones en regiones codificantes (y fragmentos funcionales de las mismas) y regiones reguladoras no codificantes en las que las modificaciones alteran la expresión de un gen u operón.

[0028] Como se usa en este documento, los términos "transformación" y "transformación" se refiere a la introducción de un ácido nucleico (*p. ej.,* El ácido nucleico exógeno o heterólogo) en una célula huésped. La célula huésped transformada puede transportar el ácido nucleico exógeno o heterólogo extracromosómicamente o integrado en el cromosoma. La integración en un genoma de la célula huésped y los vectores autorreplicantes generalmente dan como resultado una herencia genéticamente estable de la molécula de ácido nucleico transformada. Las células huésped que contienen los ácidos nucleicos transformados se denominan indistintamente como células "recombinantes" o "de origen no natural" o "genéticamente modificadas" o "transformadas" o "transgénicas" (*p. ej.,* bacterias).

[0029] Tal como se utiliza aquí, el término "microorganismo metabolizador C_1 de referencia correspondiente" se refiere al microorganismo metabolizador C_1 correspondiente sin el ácido nucleico exógeno que codifica LDH.

[0030] Cuando se utiliza en conexión con un ácido nucleico, polipéptido, compuesto, o actividad, los términos "endógeno" o "nativo" se usan indistintamente para referirse a un ácido nucleico, polipéptido, compuesto o actividad que está presente en la célula huésped de tipo silvestre. Cuando se usa en conexión con una célula, el término "nativo" se refiere a la célula de tipo salvaje.

[0031] Como se usa en el presente documento, ácido nucleico "heterólogo" o "exógeno", constructo o secuencia se usan de forma intercambiable aquí para referirse a una molécula de ácido nucleico o parte de una molécula de ácido nucleico que no es nativo de una célula huésped. Además, los términos "heterólogo" y "exógeno" pueden referirse a una actividad biológica que es diferente o alterada de la que se encuentra endógena a una célula huésped, o que no es nativa de una célula huésped sino que está codificada por una molécula de ácido nucleico introducida en la célula huésped.

[0032] El "porcentaje de identidad" entre dos o más secuencias de ácido nucleico o dos o más secuencias de amino ácido es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/total de número de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de espacios y la longitud de cada espacio que debe introducirse para optimizar la alineación de dos o más secuencias. Dos secuencias se alinean de manera óptima cuando se alinean usando parámetros definidos, es decir, una matriz de sustitución de aminoácidos definida, una penalización por existencia de huecos (también denominada penalización por hueco abierto) y penalización por extensión de huecos, para llegar al puntaje de similitud más alto posible para ese par de secuencias.

[0033] La "alineación óptima" para la determinación del porcentaje de identidad entre dos o más secuencias se logra usando un algoritmo matemático, tal como el algoritmo BLAST *(p. ej.,* Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403, 1990; vea también BLASTN en la red mundial ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Para secuencias de aminoácidos, la matriz BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89 (22): 10916-10919) se usa como una matriz de sustitución de puntuación predeterminada en algoritmos de alineación de secuencias de aminoácidos, tales como BLASTP. La penalización de existencia de hueco se impone para la introducción de un único hueco de aminoácidos en una de las secuencias alineadas, y la penalización de extensión de hueco se impone para cada posición de residuo en el hueco. La alineación óptima de las secuencias de aminoácidos se lleva a cabo utilizando BLASTP con los siguientes parámetros de alineación: matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por existencia de brecha = 11 y penalización

por extensión de brecha = 1. Para una alineación óptima de las secuencias de ácido nucleico, BLASTN se utiliza con los siguientes parámetros de alineación: Puntajes de coincidencia/falta de coincidencia = 1/-3, y penalización por existencia de brecha = 5, y penalización de extensión de brecha = 2. El puntaje de similitud se define por las posiciones de aminoácidos o nucleótidos de cada secuencia en la que comienza y termina la alineación (p. ej., la ventana de alineación), y opcionalmente por la inserción de una brecha o brechas múltiples en una o ambas secuencias para llegar con el puntaje de similitud más alto posible.

[0034] Una "sustitución conservadora" se reconoce en la técnica como una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares. Las sustituciones conservadoras ejemplares son bien conocidas en la técnica *(véase, p. ej.,* WO 97/09433, página 10, publicado el 13 de marzo de 1997; Lehninger, Biochemistry, Segunda edición; Worth Publishers, Inc. NY: NY (1975), pp,71 -77; Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY y Cell Press, Cambridge, MA (1990), p. 8).

[0035] Como se usa en este documento, "sobreexpresado" cuando se usa en referencia a un ácido nucleico o una proteína se refiere a un aumento en la expresión o actividad del ácido nucleico o proteína. El aumento de la expresión o actividad incluye la expresión o actividad de un ácido nucleico o proteína que se incrementa por encima del nivel de un microorganismo de control o de referencia de tipo salvaje (sin ingeniería genética). Un ácido nucleico o proteína se sobreexpresa si la expresión o actividad se encuentra en un microorganismo donde normalmente no se expresa o no es activo. Un ácido nucleico o proteína se sobreexpresa si la expresión o actividad se extiende o presenta más tiempo en el microorganismo recombinante que en un control de tipo salvaje o un microorganismo de referencia.

[0036] "Inhibir" o "inhibe", como se usa aquí, se refiere a una alteración, reducción, regulación a la baja, abrogación o deleción, directa o indirectamente, en la expresión de un gen diana o en la actividad de una molécula diana en relación con una molécula de control, endógena o de referencia, en la que la alteración, reducción, regulación negativa o abrogación es estadísticamente, biológicamente, industrialmente o clínicamente significativa.

[0037] Tal como se utiliza aquí, el término "derivado" se refiere a una modificación de un compuesto por medios químicos o biológicos (p. ej., con o sin una enzima), cuyo compuesto modificado es estructuralmente similar a un compuesto original y (en realidad o teóricamente) derivable de ese compuesto padre. Un derivado puede tener diferentes propiedades químicas, biológicas o físicas del compuesto original, como ser más hidrófilo o tener una reactividad alterada en comparación con el compuesto original. La derivación (es decir, modificación) puede implicar la sustitución de uno o más restos dentro de la molécula *(p. ej.,* un cambio en el grupo funcional). Por ejemplo, un hidrógeno puede estar sustituido con un halógeno, tal como flúor o cloro, o un grupo hidroxilo (-OH) puede reemplazarse con un resto de ácido carboxílico (-COOH). Otras derivaciones ejemplares incluyen polimerización, glicosilación, alquilación, acilación, acetilación, ubiqutinación, esterificación y amidación.

[0038] El término "derivado" se refiere también a todos los solvatos, p. ej., hidratos o aductos (*p. ej.,* aductos con alcoholes), metabolitos activos, y sales de un compuesto original. El tipo de sal depende de la naturaleza de los restos dentro del compuesto. Por ejemplo, los grupos ácidos, como los grupos de ácido carboxílico, pueden formar sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos (p. ej., sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de calcio y también sales con iones de amonio cuaternario fisiológicamente tolerables y adición de ácido sales con amoniaco y aminas orgánicas fisiológicamente tolerables como, p. ej., trietilamina, etanolamina o tris-(2-hidroxietilo) amina). Los grupos básicos pueden formar sales de adición de ácido con, p. ej., ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o con ácidos orgánicos carboxílicos o ácidos sulfónicos tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido benzoico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido metanosulfónico o ácido p-toluenosulfónico. Los compuestos que contienen simultáneamente un grupo básico y un grupo ácido, p. ej., un grupo carboxilo además de átomos de nitrógeno básicos, pueden estar presentes como zwitteriones. Las sales se pueden obtener por métodos habituales conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., combinando un compuesto con un ácido o base inorgánica u orgánica en un disolvente o diluyente, o de otras sales por intercambio catiónico o intercambio aniónico.

[0039] Como se usa en este documento, el término "lactato" se refiere a todas las formas de ácido láctico, incluyendo todas las formas de derivados tales como sal de ácido láctico, ion de ácido láctico, éster de ácido láctico, un solvato en ácido láctico, y/o un oligómero de ácido láctico o un éster de ácido láctico.

[0040] El término "secuencia de control de expresión" significa una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico del ácido al que está operativamente enlazado, tal como, p. ej., un promotor o un potenciador.

[0041] El término "unido operativamente" se refiere aquí a una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición relativa a la exógeno LDH que codifica ácido nucleico de tal manera que la secuencia de control influye en la expresión de la LDH codificada.

[0042] Como se usa en este documento, el término "deshidrogenasa de lactato parental correspondiente" se refiere a una deshidrogenasa de lactato de origen natural o conocido de otro modo de deshidrogenasa de lactato a partir del cual se basa la secuencia de aminoácidos de una secuencia de LDH variante.

Microorganismos metabolizadores de C_1 - células huesped

[0043] Los microorganismos metabolizadores C_1 de origen no natural, como se describe en el presente documento, se preparan introduciendo el ácido nucleico codificador de LDH exógeno deseado en la célula huesped deseada. El microorganismo metabolizador C_1 que se modificará genéticamente puede ser una cepa natural, adaptada a la cepa (*p. ej.,* realizando la fermentación para seleccionar cepas con utilización reducida de lactato, tasas de crecimiento mejoradas o aumento del rendimiento de biomasa total en comparación con la cepa original), o previamente modificado de forma recombinante para convertir alcanos o alquenos en lactato, para tener una actividad reducida o mínima de descarboxilasa de piruvato, para tener mayores tasas de crecimiento, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones preferidas, los microorganismos metabolizadores de C_1 no son microorganismos fotosintéticos, tales como algas o plantas. A menudo, el microorganismo metabolizador C_1 de la presente descripción no es levadura, y típicamente, no es un hongo. En algunas realizaciones, el microorganismo metabolizador C_1 de la presente descripción no es un microorganismo fotosintético o un hongo.

[0044] El microorganismo metabolizador C_1 de la presente descripción puede ser un procariota o bacterias, que es una célula modificada genéticamente a partir de uno o más de los géneros Metilomonas, Metilobacter, Metilococcus, Metilosinus, Metilocystis, Metilomicrobium, Metanomonas, Metilophilus, Metilobacillus, Metilobacterium, Hyphomicrobium, Xanthobacter, Bacillus, Paracoccus, Nocardia, Arthrobacter, Rhodopseudomonas o Pseudomonas.

[0045] En realizaciones adicionales de la divulgación, las bacterias metabolizadoras C_1 es una metanótrofo o un metilotrofo. El microorganismo metabolizador C_1 de la presente invención es un metanótrofo que puede ser una célula modificada genéticamente de uno o más de los géneros Metilomonas, Metilobacter, Metilococcus, Metilosinus, Metilocystis, Metilomicrobium, Metanomonas o Metilocella. En otras realizaciones, el microorganismo metabolizador C_1 de la presente descripción es un metilotrofo que es una célula genéticamente modificada de una o más de las especies *Metilobacterium extorquens, Metilobacterium radiotolerans, Metilobacterium populi, Metilobacterium clorometanicum* o *Metilobacterium nodulans.*

[0046] En algunas realizaciones preferidas, el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural de la presente invención es una bacteria metanotrófica modificada genéticamente, que tiene la capacidad de usar metano como carbono y energía de origen. Las bacterias metanotróficas se clasifican en tres grupos en función de sus vías de asimilación de carbono y la estructura interna de la membrana: tipo I (proteobacterias gamma), tipo II (proteobacterias alfa y tipo X (proteobacterias gamma). En algunas realizaciones, el microorganismo metabolizante C_1 no natural de la presente invención es un metanotrofo tipo I modificado genéticamente. En ciertas realizaciones específicas, el microorganismo metabolizador C_1 no natural de la presente invención es un metanotrofo tipo II modificado genéticamente. Los metanotrofos de tipo I usan la vía de monofosfato de ribulosa (RuMP) para la asimilación de carbono, mientras que los metanótrofos de tipo II usan la vía de la serina. El microorganismo metabolizador C_1 no natural de la presente invención puede ser un metanotrofo de tipo X modificado genéticamente. Los metanotróficos de tipo X usan la vía de RuMP pero también expresan bajos niveles de enzimas de la serina vía.

[0047] El microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural de la presente invención puede ser un metanotrofo facultativo modificado genéticamente o un metanotrofo obligado modificado genéticamente. Por ejemplo, el microorganismo metabolizador C_1 de la presente invención puede ser un metanotrófico facultativo que es una célula genéticamente modificada de uno o más de los géneros y/o especies: *Metilocella, Metilocystis* y *Metilocapsa* (p. ej., *Metilocella silvestris, Metilocella palustris, Metilocella tundrae, Metilocystis daltona* cepa SB2, *Metilocystis bryophila* y *Metilocapsa aurea* KYG), *Metilobacterium organophilum* (ATCC 27,886), *Metilibium petroleiphilum* o variantes de alto crecimiento de los mismos. Las bacterias metanotróficas obligatorias ejemplares incluyen Metilococcus capsulatus (Bath), *Metilomonas* 16a (ATCC PTA 2402), *Metilosinus trichosporium* OB3b (NRRL B-11,196), *Metilomicrobium buryatense* 5G (Taxonomy ID: 675511, Syst. Appl. Microbiol. 24 (2): 24) (2) (Julio de 2001)), *Metilosinus sporium* (NRRL B-11,197), *Metilocystis parvus* (NRRL B-11,198), *Metilomonas metanica* (NRRL B-11,199), *Metilomonas albus* (NRRL B-11,200), *Metilobacter capsulatus* (NRRL B-11,201), *Metilomonas flagellata* sp AJ-3670 (FERM P-2400), *Metilacidiphilum infernorum, Metilacidium, metilacroidcumthycumym, metilacromato de metilo alcaliphilum,* o variantes de alto crecimiento de los mismos.

[0048] El microorganismo metabolizante C_1 de origen no natural de la presente descripción puede ser una bacteria metabolizadora de gas de síntesis que es una célula modificada genéticamente de uno o más de los géneros: Clostridium, Moorella, Pyrococcus, Eubacterium, Desulfobacterium, Carboxydothermus, Acetogenium, Acetobacterium, Acetoanaerobium, Butyribaceterium, o Peptostreptococ. El microorganismo metabolizador C_1 de la presente descripción puede ser un gas de síntesis que metabolizan bacterias de una o más de las especies: *Clostridium autoethanogenum, Clostridium ljungdahli, Clostridium ragsdalei, Clostridium carboxydivorans, Butyribacterium metilotrophicum, Clostridium woodii, Clostridium neopropanologen,* o una combinación de los mismos.

[0049] El microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural de la presente descripción puede ser un eucariota tal como una levadura que es una célula modificada genéticamente a partir de uno o más de los géneros: *Candida, Yarrowia, Hansenula, Pichia, Torulopsis,* o *Rhodotorula.*

Sistemas de expresión y vectores; Métodos de Transformación.

[0050] Cualquiera de los microorganismos metabolizadores C_1 recombinantes descritos en este documento pueden ser transformados para comprender al menos un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato para proporcionar el anfitrión con una nueva deshidrogenasa de lactato o actividad mejorada de deshidrogenasa de lactato o puede ser modificada genéticamente para eliminar o reducir sustancialmente una función genética endógena usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

[0051] Un número de sistemas de expresión y vectores de expresión útiles para la expresión de ácidos nucleicos heterólogos en microorganismos metabolizadores C_1 son conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico exógena que codifica una deshidrogenasa láctica está operativamente unida a una secuencia de control de la expresión, tal como, p. ej., un promotor.

[0052] Los promotores adecuados para su uso en la práctica de la presente invención pueden ser constitutivos, permeables o inducibles, y nativos o no nativos de la célula huésped empleada. Los promotores ejemplares incluyen una descarboxilasa de piruvato (PDC), un promotor, un promotor de la desoxi-xilulosa fosfato sintasa, un promotor de deshidrogenasa de metanol (MDH) (como, p. ej., el promotor en la región intergénica aguas arriba del gen *mxaF* del Metilococcus capsulatus (Bath) (Acc. No. MCA0779) o el promotor MDH de *M. extorquens* (Ver Springer et al., FEMS Microbiol. Lett. 160: 119 (1998)), un promotor de 6-fosfato sintasa de hexulosa, un promotor de proteína ribosómica S16, un promotor de serina hidroximetilo transferasa, un promotor de serina-glioxilato aminotransferasa, un promotor de fosfoenolpiruvato carboxilasa, un promotor T5, promotor Trc, un promotor para la síntesis de PHA (Foellner et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 284, 1993), un promotor de descarboxilato de piruvasa (Tokuhiro et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 131: 795, 2006), el promotor lac operon Plac (Toyama et al., Microbiol. 143: 595, 1997), un promotor híbrido como Ptrc (Brosius et al.., Gene 27: 161, 1984), promotores identificados a partir de pl nativos asmid en metilotrofos (EP 296484), metanotrofos y similares.

[0053] Además, los promotores homólogos o heterólogos adecuados para la alta expresión de moléculas de ácido nucleico exógeno pueden ser utilizados. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 7,098,005 describe el uso de promotores para alta expresión en la presencia de metano o metanol de un ácido nucleico de codificación heteróloga en bacterias metabolizantes C_1.

[0054] En ciertas realizaciones, la expresión regulada de los ácidos nucleico exógenos que codifica una o más enzimas de biosíntesis de lactato puede ser deseable para optimizar la tasa de crecimiento de las bacterias metanotróficas de origen no natural y puede mejorar el crecimiento bacteriano en una variedad de condiciones de la fuente de carbono. Esto puede lograrse mediante el uso de un sistema promotor inducible.

[0055] En ciertas realizaciones, una codificación de LDH de ácido nucleico está unida operativamente a un promotor inducible. Los sistemas promotores inducibles empleados en la práctica de la presente invención incluyen los conocidos en la técnica e incluyen el sistema promotor inducible por tetraciclina; sistema promotor inducible por operón IPTG/lac, sistema promotor inducible por choque térmico; sistemas promotores sensibles al metal; sistema promotor inducible por nitrato; sistema promotor inducible por luz; sistema promotor inducible por ecdisona, el sistema inducible/regulable descrito para uso en bacterias metilotróficas y metanotróficas (véase, p. ej., la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº US 2010/0221813), y similares. Por ejemplo, en una realización, el microorganismo metabolizador C_1 no natural (*p. ej.*, metanotrofo, metilotrofo) comprende: (1) un ácido nucleico exógeno que codifica LDH, unido operativamente a un promotor flanqueado por secuencias de operador lacO, y (2) un ácido nucleico exógeno que codifica una proteína represora lacI unida operativamente a un promotor constitutivo (p. ej., promotor de hexulosa-6-fosfato sintasa). La inducción se inicia cuando la proteína represora LacI se une a las secuencias del operador lacO que flanquean al LDH u otro promotor, evitando la transcripción. IPTG se une al represor lacI y lo libera de las secuencias lacO, lo que permite la transcripción. Mediante el uso de un sistema promotor inducible, la síntesis de lactato puede controlarse mediante la adición de un inductor.

[0056] Los sistemas de expresión y vectores de expresión empleados en la práctica de la presente invención opcionalmente contienen elementos genéticos, tales como, p. ej., uno o más sitios para inicio de la traducción y una unión al ribosoma sitio de terminación de la transcripción, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción, múltiples sitios de clonación, otros segmentos de codificación, y similares.

[0057] Los sistemas y vectores de expresión empleados en la práctica de la presente invención pueden contener además elementos genéticos que facilitan la integración por recombinación homóloga o no homóloga. Los elementos genéticos que facilitan la integración por recombinación homóloga tienen homología de secuencia con sitios de integración dirigidos en la secuencia genómica de la célula huésped deseada. Los elementos o técnicas genéticas que facilitan la integración por recombinación no homóloga incluyen la integración mediada por enzimas de restricción (REMI) (ver Manivasakam et al., Mol. Cell Biol. (1998) 18 (3): 1736-1745), integración mediada por transposón, y otros elementos y métodos que son bien conocidos en la técnica.

[0058] Los procedimientos recombinantes para la expresión de ácidos nucleicos exógenos o heterólogos en organismos microbianos son bien conocidos en la técnica. Tales métodos se pueden encontrar descritos, p. ej., en

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (2001); y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

[0059] En ciertas realizaciones, la fuerza y el momento de la expresión de las deshidrogenasas lácticas pueden ser modulados utilizando métodos conocidos en la técnica para mejorar la producción de lactato. Por ejemplo, se puede usar la fuerza del promotor variable o el número de copias de ácido nucleico para modular los niveles de expresión. En otro ejemplo, el tiempo de expresión puede modularse usando sistemas promotores inducibles u operones policistrónicos. Por ejemplo, la expresión de LDH puede ocurrir durante la fase de crecimiento y la fase estacionaria del cultivo o solo durante la fase estacionaria. En otro ejemplo, LDH puede sufrir una coexpresión ordenada con otros genes de interés.

[0060] La introducción del ácido nucleico codificador de LDH exógeno en la célula huésped se puede lograr de una variedad de formas que se conocen en la técnica. Por ejemplo, la electroporación de bacterias metabolizadoras C_1 se ha descrito previamente en, p. ej., Toyama et al., FEMS Microbiol. Letón. 166: 1, 1998; Kim y Wood, Appl. Microbiol Biotecnología 48: 105, 1997; Yoshida y col., Biotechnol. Letón. 23: 787, 2001, y la solicitud de patente de EE. Pub. No. 2008/0026005.

[0061] La conjugación bacteriana, que se refiere a un tipo particular de transformación que implica el contacto directo de los donantes y las células receptoras, se utiliza más frecuentemente para la transferencia de ácidos nucleicos en microorganismos metabolizadores C_1. La conjugación bacteriana implica mezclar las células "donante" y "receptor" juntas en estrecho contacto entre sí. La conjugación se produce mediante la formación de conexiones citoplasmáticas entre las bacterias donantes y receptoras, con transferencia unidireccional de moléculas de ácido nucleico donante recién sintetizadas en las células receptoras. Un receptor en una reacción de conjugación es cualquier célula que puede aceptar ácidos nucleicos mediante transferencia horizontal desde una bacteria donante. Un donante en una reacción de conjugación es una bacteria que contiene un plásmido conjugativo, un transposón conjugativo o un plásmido movilizado. La transferencia física del plásmido donante puede ocurrir a través de un plásmido auto transmisible o con la ayuda de un plásmido "auxiliar". Conjugaciones que implican bacterias metabolizadoras C_1 se han descrito previamente en Stolyar et al, Mikrobiologiya. 64: 686, 1995; Motoyama y col., Appl. Micro. Biotecnología 42:67, 1994; Lloyd y col., Arch. Microbiol 171: 364, 1999; Publicación PCT Nº WO 02/18617; y Ali y col., Microbiol. 152: 2931, 2006.

[0062] La expresión de ácidos nucleicos heterólogos en bacterias metabolizadoras C_1 se conoce en la técnica *(véase, p. ej.,* la Patente de EE.UU. Nº 6,818,424, Patente de EE.UU. Appl Pub Nº 2003/0003528). Se ha descrito la transformación basada en transposón Mu de bacterias metilotróficas (Akhverdyan et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 91: 857, 2011). Se ha descrito un sistema de transposón mini-Tn7 para la expresión simple y multicopia de ácidos nucleicos heterólogos sin inactivación por inserción de genes del huésped en *Metilobacterium* (Patente de EE.UU. Pub. Nº 2008/0026005).

[0063] Otras modificaciones genéticas a la C_1 pueden desearse metabolización microorganismo tal como se describe en el presente documento, que se pueden impartir usando métodos conocidos. Por ejemplo, varios métodos para inactivar, golpeando-out, o eliminación de la función del gen endógeno en C_1 se pueden usar bacterias que metabolizan. El intercambio alélico usando vectores suicidas para construir mutantes de deleción/inserción en bacterias metabolizadoras de C_1 de crecimiento lento también se ha descrito en, p. ej., Toyama y Lidstrom, Microbiol. 144: 183, 1998; Stolyar y col., Microbiol. 145: 1235, 1999; Ali y col., Microbiol. 152: 2931, 2006; Van Dien y col., Microbiol. 149: 601, 2003.

Microorganismos metabolizadores C_1 – recombinantes

[0064] Como se ha descrito anteriormente en este documento, los microorganismos metabolizadores C_1 de la presente divulgación se modifican de forma recombinante para incluir ácidos nucleicos exógenos que expresan o sobre expresan la deshidrogenasa de lactato(s) de interés, dando como resultado microorganismos recombinantes útiles para producir lactato. En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona bacterias metanotróficas de origen no natural que comprenden un ácido nucleico exógeno que codifica una deshidrogenasa de lactato (LDH), en donde las bacterias metanotróficas son capaces de convertir una materia prima de carbono en lactato. Típicamente, la materia prima de carbono es metano. Los ácidos nucleicos exógenos empleados en la práctica de la presente invención pueden codificar una deshidrogenasa de lactato natural o conocida de otro modo, o una variante de secuencia o truncamiento de dicha deshidrogenasa de lactato parental correspondiente. Dichas variantes de deshidrogenasa de lactato codificadas pueden exhibir solubilidad, expresión, estabilidad, actividad catalítica, tasa de renovación o cualquier combinación de las mismas o pueden ser variantes modificadas de forma conservadora de secuencias conocidas de deshidrogenasa de lactato y las secuencias de deshidrogenasa de lactato descritas en el presente documento.

[0066] Ácidos nucleicos exógenos que codifican una deshidrogenasa de lactato adecuada para uso en la práctica de la presente invención incluyen secuencias de ácidos nucleicos de tipo salvaje que codifican genes de LDH, así como variantes de los mismos. El término "variante de ácido nucleico" se refiere aquí a un ácido nucleico que puede contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones, inserciones, o puede ser o comprender fragmentos de un ácido

nucleico de referencia. Un ácido nucleico de referencia se refiere a un tipo salvaje seleccionado (ácido nucleico original) que codifica una enzima LDH particular (p. ej., LdhA). Debido a la redundancia en el código genético, las variantes de ácido nucleico pueden o no afectar la secuencia de aminoácidos.

[0067] Típicamente, ácidos nucleicos exógenos que codifican LDH a ser introducidos en un huésped tal como se describe en el presente documento se someten a codón de optimización antes de la introducción en el huésped para asegurar que la expresión de la proteína es eficaz o mejorada. La optimización de codones se refiere a la alteración de codones en ácidos nucleicos o regiones codificantes de ácidos nucleicos antes de la transformación para reflejar el uso típico de codones del huésped sin alterar el polipéptido codificado por la molécula de ADN no natural. Los métodos de optimización de codones para la expresión óptima de ácido nucleico en huéspedes heterólogos se han descrito previamente *(ver, p. ej.,* Welch et al., PLoS One 4: e7002, 2009; Gustafsson et al., Trends Biotechnol. 22: 346, 2004; Wu et al.., Nucl. Acids Res. 35: D76, 2007; Villalobos et al., BMC Bioinformatics 7: 285, 2006; Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos Núms. 2011/0111413 y 2008/0292918).

[0068] Una variante de ácido nucleico puede codificar un LDH de secuencia de aminoácidos que comprende una o más sustituciones conservadoras en comparación con una secuencia de aminoácidos de LDH parental correspondiente. Puede producirse una sustitución conservadora de forma natural en el polipéptido (p. ej., variantes genéticas de origen natural) o puede introducirse cuando el polipéptido se produce de forma recombinante.

[0069] Los ácidos nucleicos exógenos adecuados que codifican un LDH que se puede emplear en la práctica de la presente invención incluyen ácidos nucleicos que codifican una LDH de otros organismos (es decir, deshidrogenasa de lactatos y/o ácidos nucleicos que codifican deshidrogenasa de lactato que no son nativos para el microorganismo huésped C_1). Tal ácido nucleico exógeno puede codificar cualquiera de una serie de secuencias de aminoácidos de LDH que se conocen en la técnica. Además, los ácidos nucleicos que codifican LDH correspondientes que se han aislado y clonado de varios de estos organismos, tales como, p. ej., de bacterias, plantas, levaduras, hongos y animales, pueden ser adecuados para su uso en la práctica de presente invención Con la secuencia completa del genoma disponible para cientos de organismos, la identificación de ácidos nucleicos que codifican la deshidrogenasa de lactato en especies relacionadas o distantes, que incluyen, p. ej., registros homogéneos, ortólogos, parálogos, etc., es bien conocida en la técnica. Estos pueden ser codones optimizados para una expresión óptima del microorganismo metabolizador C_1 deseado utilizando métodos conocidos.

[0070] En ciertas realizaciones, la molécula de ácido nucleico exógeno que codifica una D- o L- LDH de *Actinomyces viscosus, Acinonyx jubatus, Archilochus colubris, Bacillus anthracis, Bacillus caldolyticus, Bacillus coagulans, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus* (Q9p4b6) (también conocida como *Geobacillus stearothermophilus)*, *Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, Bacteroides pectinophilus, Bifidobacterium longum, Bos taurus, Canis familiaris, Canis lupus, Deinococcus radiodurans, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Equusferus, Felis catus, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces maxxianus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Lactobacillus coryniformis sp. torquens, Lactobacillus delbrueckii* (incluyendo *subsp. bulgaricus)*, *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus plantarum, Lactobaillus plantaum, Lactobacillus rhamnosus, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides, Listeria monocytogenes, Listeria marthii, Plasmodium falciparum, Plasmodium ovale, Thermus thermophilus, Mus musculus, Oryctolagus cuniculus, Pediococcus acidilactici, guttata de Taeniopygia, Rattus norvegicus, Rhizopus oryzae, Staphylococcus aureus, Streptococcus bovis, Streptococcus pasteurianus, pares de Ruminococcus, Staphylococcus simiae, Staphylococcus vitulinus, Staphylococcus lentus, Macrococcus caseolyticus, Bacillus* thuringiensis seovar konkukian str. 97-27, *Bacillus thuringiensis* serovar chinensis CT-43, *Bacillus mycoides* y similares.

[0071] En algunas realizaciones, el ácido nucleico exógeno codifica una deshidrogenasa D-lactato. Las secuencias de muchas deshidrogenasa de D-lactato son conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos exógenos ilustrativos empleados en la práctica de la presente invención que codifican una deshidrogenasa de D-lactato incluyen aquellos que codifican una D-LDH de *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus plantaum, Lactobacillus johnsonii, Leuconostoc mesenteroides* (*ver, p. ej.,* JP 2002-136263A y US 2007)./0105202 (SEQ ID NO: 2)); y *Lactobacillus helveticus* (*véase, p. ej.,* WO 2003/102201). Típicamente, el ácido nucleico que codifica LDH exógeno es un codón optimizado para una expresión óptima de la célula huésped específica empleada.

[0072] En algunos casos, el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural comprende un ácido nucleico exógeno que codifica una D-LDH que tiene al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, a al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos de referencia ("LDH parental") seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 64 y 66, o una variante truncada en N o C terminalmente del mismo, en donde la LDH codificada

comprende actividad D-LDH, o en donde el microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende dicho ácido nucleico exógeno produce D-lactato (como se determina, p. ej., usando el método del Ejemplo 1 y sustituyendo el EnzyFluo™ D-Lactate Assay Kit (Catálogo Nº EFDLC- 100, BioAssay Systems, Hayward, CA 94545) por el EnzyFluo™ L -Kit de ensayo de lactato en el método). En algunas realizaciones, la D-LDH codificada retiene al menos el 50% de la actividad de D-LDH en comparación con la LDH parental. Típicamente, el microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica D-LDH es capaz de producir más lactato en comparación con el correspondiente microorganismo metabolizador C_1 de referencia, cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 bajo al menos un conjunto de condiciones de cultivo. El microorganismo metabolizador C_1 no natural puede comprender un ácido nucleico exógeno que codifica una D-LDH que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 65 y 67, o una variante truncada en el extremo N o C del mismo. En realizaciones específicas, el ácido nucleico exógeno codifica una D-LDH que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID N: 64 o SEQ ID NO: 66.

[0073] El microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural puede comprender un ácido nucleico exógeno que codifica una D-LDH, en donde el ácido nucleico exógeno tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 64 y 66, en donde la LDH codificada comprende actividad D-LDH, o en donde - el microorganismo metabolizador C_1 que ocurre naturalmente que comprende dicho ácido nucleico exógeno produce D-lactato (como se determina, p. ej., usando el método del Ejemplo 1 y sustituyendo el Kit de Ensayo de D-Lactato EnzyFluo™ (Catálogo Nº EFDLC-100, BioAssay Systems, Hayward, CA 94545) para el Kit de Ensayo de L-Lactato EnzyFluo™ en el método). En algunas realizaciones, la D-LDH codificada retiene al menos el 50% de la actividad de D-LDH en comparación con la LDH parental. Típicamente, el microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica D-LDH es capaz de producir más lactato en comparación con el correspondiente microorganismo metabolizador C_1 de referencia, cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 bajo al menos un conjunto de condiciones de cultivo.

[0074] En ciertas realizaciones, el ácido nucleico exógeno tiene una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 64 o SEQ ID NO: 66. El microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende dicho ácido nucleico exógeno puede ser capaz de producir más lactato en comparación con el microorganismo C_1 de referencia correspondiente, cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 en al menos un conjunto de condiciones de cultivo.

[0075] El microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural puede comprender un ácido nucleico exógeno que codifica un L-LDH. Los ejemplos de ácidos nucleicos de L-LDH incluyen los correspondientes a los números de acceso AEEL01000014,1 (región 176996 a 177985) (*Streptococcus bovis)*, NC_010080,1 (región 957682 a 958608) (*Lactobacillus helveticusi)*, BC146210,1 (*Bos taurus*), AB776697,1 (*Pediococcus acidilactici)*, EF152288,1 (*Rhizopus oryzae)*, NC_013198,1 (región 619708 a 620646) (*Lactobacillus rhamnosus)*, NC_010610,1 (región 417799 a 418740) (*Lactobacillus fermentum)*, NC_008054 (NC_008054 (NC_008054) 100828) (*Lactobacillus delbrueckii)*, NC_002662,1 (región 1369224 a 1370201) (*Lactococcus lactis)* y NC_004668,1 (región 231275 a 232258) (*Enterococcus faecalis)*. Por ejemplo, los ácidos nucleicos exógenos empleados en la práctica de la presente invención pueden codificar cualquiera de las siguientes secuencias de polipéptidos ejemplares de L-LDH: Nº de acceso EFM27433,1 (*Streptococcus bovis)*, YP_001577351,1 (*Lactobacillus helveticus)*, AAI46211. 1 (*Bos taurus)*, BAM76361,1 (*Pediococcus acidilactici)*, ABL84845,1 (*Rhizopus oryzae)*, YP_003170352,1 (*Lactobacillus rhamnosus)*, YP001843164,1 (*Lactobacillus fermentum)*, YP_618317,1 (*Lactobacillus delbrueckii)*, NP_267487,1 (*Lactococcus lactis)*, NP_814049,1 (*Enterococcusfaecalis)*; SEQ ID NOs: 52 (*Staphylococcus simiae* CCM 7213), 53 (*Staphylococcus vitulinus* F1028), 54 (*Staphylococcus lentus* F1142), 55 (*Macrococcus caseolyticus* JCSC5402), 56 (*Bacillus thuringiensis.* Serovar konkukian str 97-27), 57 (*Bacillus thuringiensis* serovar chinensis CT- 43) y 58 (*Bacillus mycoides* DSM 2048).

[0076] El microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural puede comprender un ácido nucleico exógeno que codifica una L-LDH que tiene al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 81%, al menos aproximadamente 82%, al menos aproximadamente 83%, al menos aproximadamente 84%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 86%, al menos aproximadamente 87%, al menos aproximadamente 88%, al menos aproximadamente 89%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, y al menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y una variante truncada en los extremos N y C del mismo, en donde la LDH codificada comprende actividad L-LDH, o en donde el microorganismo metabolizador C_1 que se produce de forma natural que comprende dicho ácido nucleico exógeno produce L-lactato (según se determina, p. ej., usando el método del Ejemplo 1). En algunas realizaciones, la L-LDH codificada retiene al menos el 50% de la actividad de L-LDH en comparación con la LDH parental. Típicamente, el microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica tal L-LDH es

capaz de producir más lactato en comparación con el correspondiente microorganismo metabolizador C_1 de referencia, cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 bajo al menos un conjunto de condiciones de cultivo.

[0077] En algunas realizaciones, la referencia de secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 2, 8, 10, 12,14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 y 48. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de referencia se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, 16 y 24. Los ácidos nucleicos exógenos ejemplares incluyen aquellos que codifican una L-LDH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 (*Streptococcus pasteurianus* LDH), 4 (*Lactobacillus helveticus* LDH), 6 (variante *Bos taurus* LDH), 8 (*Ruminococcus torques* LDH), 10 (*Rhizopus oryzae* LDH), 12 (*Enterococcus faecalis* LDH), 14 (*Lactobacillus casei* LDH), 16 (*Bacillus megaterium* LDH), 18 (*Taeniopygia guttata* LDH), 20 (*Lactobacillus plantarum* LDH), 22 (*Lactobacillus acidophilus* LDH), 24 (*Staphylococcus aureus* LDH), 26 (*Bacillus caldolyticus* LDH), 28 (*Actinomyces viscosus* LDH), 30 (*Bacillus anthracis* LDH), 32 (*Bacteroides pectinophilus* LDH), 34 (*Listeria marthii* LDH), 36 (*Bacillus subtilis* LDH), 38 (*Enterococcus faecium* LDH), 40 (*Baco thuringiensis LDH)*, 42 (*Geobacillus stearothermophilus* LDH), 44 (*Deinococcus radiodurans* LDH), 46 (*Plasmodium ovale* LDH variante), 48 (*Thermus thermophilus* LDH), 53 (*Staphylococcus simiae* CCM 7213), 54 (*Staphylococcus vitulinus* F1028), 54 *Staphylococcus lentus* F1142), 56 (*Macrococcus caseolyticus* JCSC5402), 57 (*Bacillus thuringiensis* serovar konkukian str. 97-27), 58 (*Bacillus thuringiensis* serovar chinensis CT-43), 59 (*Bacillus mycoides* DSM 2048), y variante N- y N-C terminalmente truncada de los mismos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico exógeno codifica una L-LDH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 8, 10, 12,14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 y 48. En otras realizaciones, el ácido nucleico exógeno codifica una L-LDH que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 34, 16, y 24.

[0078] el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural puede comprender un ácido nucleico exógeno que codifica un L-LDH, en donde el ácido nucleico exógeno tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia a una secuencia de ácido nucleico de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 y 47, en donde el LDH codificado comprende actividad L-LDH, o en donde el microorganismo metabolizador C_1 de origin natural que comprende dicho ácido nucleico exógeno produce L-lactato (como se determina, p. ej., usando el método del Ejemplo 1). En algunas realizaciones, la L-LDH codificada retiene al menos el 50% de la actividad de L-LDH en comparación con la LDH parental. Típicamente, el microorganismo metabolizador C_1 no natural que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica tal L-LDH es capaz de producir más lactato en comparación con el correspondiente microorganismo metabolizador C_1 de referencia, cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 bajo al menos un conjunto de condiciones de cultivo.

[0079] En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de referencia se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 47. En otras realizaciones, el ácido nucleico exógeno codifica una secuencia de ácido nucleico de referencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 33, 15 y 23. Ácidos nucleicos exógenos ilustrativos que codifican una L-LDH incluyen aquellos que tienen una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 y 47. En algunas realizaciones, el ácido nucleico exógeno que codifica una L-LDH comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en 1, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 47. En ciertas realizaciones específicas, el ácido nucleico exógeno que codifica una L-LDH comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 33, 15, y 23.

[0080] En términos generales, las variantes de truncamiento de las LDH codificadas descritas en el presente documento codifican una LDH de referencia correspondiente (es decir, parental o secuencia de las mismas) que ha sido truncada en el extremo N por aproximadamente 1 a aproximadamente 6 residuos de aminoácidos (o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 residuos de aminoácidos), o de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 residuos de aminoácidos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 residuos de aminoácidos, o de 1 a aproximadamente 2 residuos de aminoácidos, o que está truncado en el extremo N por 1 residuo de aminoácido), y/o C-terminalmente truncado por de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 residuos de aminoácidos (o de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10, o aproximadamente 5 residuos de aminoácidos).

[0081] En ciertas realizaciones de los microorganismos metabolizadores C_1 de origen no natural descritos en este documento, el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural es capaz de producir al menos aproximadamente 1,5 veces más lactato como en comparación con el de un microorganismo metabolizador C_1 correspondiente de referencia cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 (p. ej., metano) en al menos un conjunto de condiciones de cultivo. En otras realizaciones, el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural es capaz de producir al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 500 veces, al menos aproximadamente 1000 veces y hasta aproximadamente 15.000 veces o hasta aproximadamente 20.000 veces más lactato en comparación con el correspondiente microorganismo metabolizador

C_1 de referencia cuando se cultiva en presencia de un sustrato C_1 (p. ej., metano) en al menos un conjunto de condiciones de cultivo.

[0082] Los métodos para generar ácidos nucleicos exógenos que codifican variantes de LDH pueden diseñarse usando los métodos basados en filogenética descritos en las referencias mencionadas anteriormente (Patente de Estados Unidos Nº 8,005,620; Gustafsson; Welch *y col.*; Villalobos *y col.*; Minshull *y col.*). Cada variante de LDH generada por estos métodos retendrá al menos 50% de actividad (preferiblemente 100% o más de actividad) y tendrá una secuencia de polipéptidos que sea al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, a al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% idéntico o 100% idéntico a una secuencia de polipéptidos de referencia o parental de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, las variantes de LDH codificadas incluirán al menos una sustitución de aminoácidos (p. ej., 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más o hasta 20, 25 o 30 sustituciones) en una posición predeterminada con respecto a una enzima de referencia o parental de tipo salvaje, siempre que una variante retenga la actividad de deshidrogenasa de lactato (*p. ej.,* actividad de deshidrogenasa de L- o D- lactato o producción de L- o D- lactato). En este documento se describen ensayos ejemplares para determinar la actividad de deshidrogenasa de D- y L-lactato.

[0083] En algunas realizaciones, el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural de la presente descripción comprende dos o más ácidos nucleicos, cada uno codifica una deshidrogenasa de lactato, en donde las secuencias de los ácidos nucleicos y/o las secuencias de las LDH pueden ser iguales o diferentes. En ciertas realizaciones, se introducen múltiples copias de un ácido nucleico que codifica LDH en una célula huésped, que puede ser dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más copias de la misma LDH o diferente codificación de LDH ácidos nucleicos. Cuando se introducen dos o más moléculas de ácido nucleico exógenas en un microorganismo metabolizador C_1 del huésped, se entiende que las dos moléculas de ácido nucleico exógenas más se pueden introducir como una molécula de ácido nucleico individual (p. ej., en un solo vector), vectores por separado, integrados en el cromosoma del huésped en un solo sitio o en múltiples sitios, y cada una de estas realizaciones todavía debe considerarse dos o más moléculas de ácido nucleico exógenas. Por ejemplo, se pueden introducir más de una molécula de ácido nucleico heterólogo o exógeno en una célula huésped, p. ej., como moléculas de ácido nucleico separadas, como una molécula de ácido nucleico policistrónico, como una molécula de ácido nucleico única que codifica una proteína de fusión, o cualquier combinación de las mismas., y aún se considerará como más de un ácido nucleico heterólogo o exógeno.

[0084] En ciertas realizaciones, el ácido nucleico exógeno se introduce en una célula huésped por conjugación, transformación, transfección, electroporación, o similar, en donde la molécula añadida puede integrar en el genoma del huésped o puede existir como material genético extra-cromosómico (p. ej., como un plásmido u otro vector autorreplicante).

[0085] En ciertas realizaciones, los microorganismos metabolizadores C_1 de origen no natural de la presente divulgación comprenden además modificaciones genéticas adicionales. Por ejemplo, una secuencia de control heteróloga (*p. ej.,* promotor, potenciador) puede usarse para regular la expresión de un gen o ácido nucleico nativo de una manera diferente de la forma en que un gen o ácido nucleico nativo se expresa normalmente en la naturaleza o en el cultivo.. Se pueden hacer otras modificaciones genéticas, como, p. ej., para reducir o inhibir la descarboxilasa de piruvato endógena, la metilglioxal sintasa, LDH (*p. ej.,* LDH aeróbica, D-LDH), sintasa de glucógeno, fosfoglucomutasa o cualquier combinación de las mismas para aumentar la producción de lactato, rendimiento de lactato, o ambos. En tales realizaciones, los microorganismos metabolizadores de C_1 no naturales (p. ej., bacterias metanotróficas no naturales) que comprenden un ácido nucleico exógeno que codifica LDH como se describe en el presente documento tendrán un gen de descarboxilasa de piruvato endógeno borrado o mutado de modo que la actividad de descarboxilasa de piruvato sea mínima a indetectable. En ciertas realizaciones, los microorganismos metabolizadores de C_1 no naturales (p. ej., bacterias metanotróficas no naturales) que comprenden un ácido nucleico exógeno que codifica LDH como se describe en el presente documento tendrán un ácido nucleico endógeno borrado o mutado que codifica la metilglioxal sintasa u otra enzima de la vía de derivación de metilglioxal tal que la vía de derivación de metilglioxal tiene una actividad mínima a indetectable para minimizar la acumulación de metilglioxal (un subproducto tóxico).

[0086] En ciertas realizaciones, microorganismos metabolizadores C_1 no naturales (*p. ej.,* Bacterias metanotróficas no naturales) que comprenden un ácido nucleico exógeno que codifica una LDH como se describe en el presente documento tendrá un D-LDH endógeno eliminado o mutado para minimizar o evitar síntesis de una mezcla racémica de D-lactato y L-lactato, en donde el microorganismo metabolizador C_1 no natural produce L-lactato. En ciertas realizaciones, los microorganismos metabolizadores de C_1 no naturales (p. ej., bacterias metanotróficas no naturales) se transforman con dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más copias de una LDH que codifica moléculas de ácido nucleico exógeno. En realizaciones adicionales, los microorganismos metabolizadores de C_1 no naturales (p. ej., bacterias metanotróficas no naturales) que comprenden una molécula de ácido nucleico exógena que codifica LDH como se describe en este documento sobreexpresan LDH a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más veces en comparación con el nivel de expresión normal de LDH endógeno.

[0087] Microorganismos metabolizadores C_1 no naturales (*p. ej.,* metanótrofos, metilótrofos) de la presente divulgación también pueden modificarse por ingeniería genética que comprenden la variantes de rutas o enzimas de lactato

biosintéticas. La variación en la síntesis de lactato puede ocurrir en uno o más pasos individuales de una ruta o involucrar una ruta completamente nueva. En ciertas realizaciones, las reacciones particulares de la ruta del lactato son catalizadas por enzimas de lactato variantes o alternativas, que pueden estar en combinación con la inhibición o la anulación de la actividad de piruvato descarboxilasa, actividad de alcohol deshidrogenasa, una o más enzimas de la ruta de derivación de metilglioxal, D-LDH, glucógeno sintasa, fosfoglucomutasa, o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, se usan rutas híbridas con ácidos nucleicos derivados de dos o más fuentes para mejorar la producción de lactato, el rendimiento, o ambos.

[0088] Se conocen varios métodos para inhibir, inactivar, knocking-out, o eliminar la función del gen endógeno en bacterias metanotróficas en la técnica. Por ejemplo, la disrupción genética dirigida es un método efectivo para la regulación negativa de genes donde un ácido nucleico exógeno se inserta en un gen estructural para interrumpir la transcripción. Los casetes genéticos que comprenden el ADN de inserción exógena (*p. ej.,* un marcador genético) flanqueado por una secuencia que tiene un alto grado de homología de secuencia con una porción del gen huésped diana a ser interrumpido se introducen en las bacterias metanotróficas del huésped. El ADN exógeno altera el gen del huésped diana a través de mecanismos de replicación del ADN nativo. El intercambio alélico para construir mutaciones de deleción/inserción en microorganismos metabolizadores C_1, incluidas las bacterias metanotróficas, se han descrito, p. ej., en Toyama y Lidstrom, Microbiol. 144: 183, 1998; Stolyar y col., Microbiol. 145: 1235, 1999; Ali y col., Microbiol. 152: 2931, 2006; Van Dien y col., Microbiol. 149: 601, 2003; Martin y Murrell, FEMS Microbiol. Letón. 127: 243, 2006.

Métodos de cultivo

Métodos de producción de lactato

[0089] En el presente documento se describen métodos para producir lactato, que comprenden cultivar un microorganismo metabolizador C_1 no natural. (*p. ej.*, metanotrofo, metilotrofo) que comprende un ácido nucleico exógeno que codifica la deshidrogenasa de lactato en presencia de una materia prima de carbono en condiciones suficientes para producir lactato. Típicamente, la materia prima de carbono se selecciona del grupo que consiste en metano, metanol, gas de síntesis y gas natural. Más típicamente, la materia prima de carbono se selecciona del grupo que consiste en metano y gas natural. Los métodos para el crecimiento y mantenimiento de cultivos bacterianos metanotróficos son bien conocidos en la técnica. Se pueden usar diversas realizaciones de bacterias metanotróficas no naturales descritas en el presente documento en los métodos de producción de lactato, tales como ácido L-láctico y sus sales y ésteres.

[0090] En ciertas realizaciones, el lactato se produce durante una fase específica del crecimiento celular (*p. ej.,* la fase de retardo, la fase de registro, la fase estacionaria, o fase de muerte). Puede ser deseable que el carbono de la materia prima se convierta en lactato en lugar de en crecimiento y mantenimiento del microorganismo metabolizador C_1. En algunas realizaciones, el microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural (*p. ej.,* metanótrofos, metilótrofos) como se describe en el presente documento se cultivan a una densidad celular baja a media (OD_{600}) y luego se inicia la producción de lactato. En algunas realizaciones, se produce lactato mientras que el microorganismo metabolizador C_1 (p. ej., bacterias metanotróficas) ya no se divide o se divide muy lentamente. En algunas realizaciones, el lactato se produce solo durante la fase estacionaria. En algunas realizaciones, el lactato se produce durante la fase logarítmica y la fase estacionaria.

[0091] La composición de fermentador que comprende lactato producido por microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural (*p. ej.,* metanótrofos, metilótrofos) según la invención puede comprender además otros compuestos orgánicos asociados con los procesos de fermentación biológicos. Por ejemplo, los subproductos biológicos de la fermentación pueden incluir uno o más de alcoholes, epóxidos, aldehídos, cetonas, ésteres o una combinación de los mismos. En ciertas realizaciones, la composición del fermentador puede contener uno o más de los siguientes alcoholes: metanol, etanol, butanol o propanol. Otros compuestos, como H_2O, CO, CO_2, CON_2, H_2, O_2 y materias primas de carbono no utilizadas, como metano, etano, propano y butano, también pueden estar presentes en el gas de escape del fermentador.

[0092] Condiciones suficientes para producir lactato incluyen el cultivo del microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25° a aproximadamente 50°C. En algunas realizaciones, la temperatura de cultivo está en el rango de aproximadamente 37° a aproximadamente 50°C, y puede estar en el rango de aproximadamente 37°C a aproximadamente 45°C. Otras condiciones suficientes para producir lactato incluyen el cultivo del microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural a un pH en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, y a menudo en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

[0093] En ciertas realizaciones, microorganismo metabolizador C_1 de origen no natural (*p. ej.,* metanótrofos, metilótrofos) dado a conocer en el presente documento producen lactato a aproximadamente 0,001 g/l de cultivo a aproximadamente 500 g/l de cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de lactato producido es de aproximadamente 1 g/l de cultivo a aproximadamente 100 g/l de cultivo. En algunas realizaciones, la cantidad de lactato producido es de aproximadamente 0,001 g/L, 0,01 g/L, 0,025 g/L, 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,15 g/L, 0,2 g/L, 0,25 g/L, 0,3g/L, 0,4g/L, 0,5g/L, 0,6g/L, 0,7g/L, 0,8g/L, 0,9g/L, 1g/L, 2,5g/L, 5g/L, 7,5 g/L, 10g/L, 12,5g/L, 15g/L, 20g/L, 25g/L,

30g/L, 35g/L, 40g/L, 45g/L, 50g/L, 60g/L, 70g/L, 80g/L, 90g/L, 100g/L, 125g/L, 150g/L, 175g/L, 200g/L, 225g/L, 250g/L, 275g/L, 300g/L, 325g/L, 350g/L, 375g/L, 400g/L, 425g/L, 450g/L, 475g/L, o 500g/L.

[0094] En ciertas realizaciones, el lactato es un líquido sustancialmente purificado. Los métodos de purificación son conocidos en la técnica y la pureza puede evaluarse mediante métodos tales como cromatografía en columna, HPLC o análisis GC-MS. En ciertas realizaciones, el lactato tiene al menos 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99% de pureza en peso.

[0095] En ciertas realizaciones, al menos una parte de la fase gas que queda después de una o más etapas de lactato de recuperación se recicla de nuevo en el sistema de fermentación.

[0096] Una variedad de metodologías de cultivo puede usarse para las bacterias metanotróficas recombinantes descritas en la presente memoria. Por ejemplo, las bacterias metanotróficas se pueden cultivar mediante cultivo discontinuo o metodologías de cultivo continuo. En ciertas realizaciones, los cultivos se cultivan en una unidad de cultivo controlada, tal como un fermentador, biorreactor, biorreactor de membrana de fibra hueca, o similares.

[0097] Un método de lote clásico de cultivo es un sistema cerrado donde la composición de los medios de comunicación se establece al comienzo del cultivo y no sujeto a alteraciones externas durante el proceso de cultivo. Por lo tanto, al comienzo del proceso de cultivo, los medios se inoculan con el microorganismo metabolizador C_1 deseado (*p. ej.*, metanotrofo) y se permite que ocurra crecimiento o actividad metabólica sin agregar nada al sistema. Típicamente, sin embargo, un cultivo "discontinuo" es discontinuo con respecto a la adición de una fuente de carbono y a menudo se hacen intentos para controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En sistemas discontinuos, las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema cambian constantemente hasta el momento en que finaliza el cultivo. Dentro de los cultivos discontinuos, las células se moderan a través de una fase de retraso estático a una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente a una fase estacionaria donde la tasa de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se trata, las células en la fase estacionaria eventualmente morirán. Las células en fase de crecimiento logarítmico a menudo son responsables de la producción en masa del producto final en algunos sistemas. La producción de fase estacionaria o post-exponencial se puede obtener en otros sistemas.

[0098] El sistema de alimentación por lotes es una variación en el sistema por lotes estándar. Los procesos de cultivo Fed-Batch comprenden un sistema de lote típico con la modificación de que el sustrato se agrega en incrementos a medida que avanza el cultivo. Los sistemas Fed-Batch son útiles cuando la represión de catabolitos es apta para inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medición de la concentración real de sustrato en los sistemas Fed-Batch es difícil y, por lo tanto, se estima sobre la base de los cambios de factores medibles, como el pH, el oxígeno disuelto y la presión parcial de los gases residuales como el CO_2. Los métodos de cultivo Batch y Fed-Batch son comunes y conocidos en la técnica (*véase, p. ej.,* Thomas D. Brock, Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, 2ª Ed. (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA; Deshpande, Appl. Biochem. Biotechnol. 36: 227, 1992).

[0099] Cultivos continuos son sistemas "abiertos", donde se añade un medio de cultivo definidos continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio acondicionado se elimina simultáneamente durante el procesamiento. Los cultivos continuos generalmente mantienen las células en una densidad de fase líquida alta constante donde las células están principalmente en crecimiento de fase logarítmica. Alternativamente, el cultivo continuo se puede practicar con células inmovilizadas donde se añaden continuamente carbono y nutrientes y se eliminan continuamente productos valiosos, subproductos y productos de desecho de la masa celular. La inmovilización celular puede realizarse usando una amplia gama de soportes sólidos compuestos de materiales naturales y/o sintéticos.

[0100] El cultivo continuo o semi-continuo permite la modulación de un factor o de cualquier número de factores que afectan al crecimiento celular o la concentración de producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitado, como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno, a una velocidad fija y permitirá que todos los demás parámetros se modifiquen. En otros sistemas, varios factores que afectan el crecimiento pueden alterarse continuamente mientras la concentración celular, medida por la turbidez del medio, se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener condiciones de crecimiento en estado estable y, por lo tanto, la pérdida celular debido a la extracción de los medios debe equilibrarse con la tasa de crecimiento celular en el cultivo. Los métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para procesos de cultivo continuo, así como las técnicas para maximizar la velocidad de formación del producto, son bien conocidos en la técnica, y Brock, *supra,* detalla una variedad de métodos.

[0101] Biorreactores de fase líquida (*p. ej.,* tanque agitado, lecho de relleno, una fase líquida, fase de dos líquidos, membrana de fibra hueca) son bien conocidos en la técnica y pueden usarse para el crecimiento de microorganismos y biocatálisis de origen no natural.

[0102] Mediante el uso de biorreactores en fase gaseosa, los sustratos para la bioproducción son absorbidos de un gas por microorganismos no naturales, lisados celulares o fracciones libres de células de los mismos, en lugar de un líquido. El uso de biorreactores en fase gaseosa con microorganismos es conocido en la técnica *(p. ej.,* Las patentes de EE.UU. Nºs 2,793,096; 4,999,302; 5,585,266; 5,079,168; y 6,143,556; Registro de Invención Estatutaria de EE.UU.

H1430; Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° 2003/0032170; Emerging Technologies in Hazardous Waste Management III, 1993, eds. Tedder y Pohland, pp. 411-428). Los ejemplos de biorreactores de fase gaseosa incluyen un sistema de paso único, un sistema de bombeo de circuito cerrado y un reactor de lecho fluidizado. Al utilizar biorreactores en fase gaseosa, el metano u otros sustratos gaseosos están fácilmente disponibles para la bioconversión por polipéptidos con, p. ej., actividad monooxigenasa. En ciertas realizaciones, los métodos para convertir un gas en una composición de lactato se realizan en biorreactores en fase gaseosa. En realizaciones adicionales, los métodos para convertir un gas en una composición de lactato se realizan en reactores de lecho fluidizado. En un reactor de lecho fluidizado, un fluido *(*es decir, gas o líquido) se pasa hacia arriba a través de portadores de lecho de partículas, generalmente arena, carbón activado granular o tierra de diatomeas, en donde los microorganismos pueden unirse y crecer. La velocidad del fluido es tal que los portadores de lecho de partículas y los microorganismos unidos están suspendidos (es decir, la fluidización del lecho). Los microorganismos unidos a los soportes del lecho de partículas circulan libremente en el fluido, lo que permite la transferencia de masa efectiva de sustratos en el fluido a los microorganismos y un mayor crecimiento microbiano. Los ejemplos de reactores de lecho fluidizado incluyen reactores de flujo enchufable y reactores completamente mezclados. Los usos de reactores de lecho fluidizado con biopelículas microbianas son conocidos en la técnica (p. ej., Pfluger et al., Bioresource Technol. 102: 9919, 2011; Fennell et al., Biotechnol, Bioengin. 40: 1218, 1992; Ruggeri et al., Water Sci. Technol. 29: 347, 1994; Patentes de los Estados Unidos N^{os} 4,032,407; 4,009, 098; 4,009,105; y 3,846,289).

[0103] Las bacterias metanotróficas descritas en la presente descripción pueden cultivarse como un cultivo puro aislado, con un microorganismo o heterólogos no metanotróficos que pueden ayudar con el crecimiento, o con una o más cepas o especies diferentes de bacterias metanotróficas pueden combinarse para generar un cultivo mixto.

[0104] En realizaciones alternativas, los métodos descritos en el presente documento usan microorganismos metabolizadores C_1 recombinantes como se describe en el presente documento o lisados celulares de los mismos inmovilizados en, dentro o detrás de una matriz sólida. En realizaciones adicionales, los microorganismos C_1 que se producen de forma no natural descritos en este documento, los lisados celulares o sus extractos libres de células están en un estado sustancialmente no acuoso (p. ej., liofilizados). Los microorganismos recombinantes, los lisados celulares o sus fracciones libres de células se unen temporal o permanentemente sobre, dentro o detrás de una matriz sólida dentro de un biorreactor. Los nutrientes, sustratos y otros factores requeridos se suministran a las matrices sólidas para que las células puedan catalizar las reacciones deseadas. Los microorganismos recombinantes pueden crecer en la superficie de una matriz sólida (p. ej., como una biopelícula). Los microorganismos recombinantes, los lisados celulares o las fracciones libres de células derivadas de los mismos pueden unirse a la superficie o dentro de una matriz sólida sin crecimiento celular o en un estado no vivo. Los ejemplos de soportes de matriz sólida para microorganismos incluyen anillos de polipropileno, anillos biológicos de cerámica, monturas de cerámica, soportes fibrosos (*p. ej.,* membrana), perlas de vidrio poroso, cuentas de polímero, carbón, carbón activado, gel de sílice seco, alúmina en partículas, arena de Ottawa, arcilla, láminas de soporte de células de poliuretano y portador de partículas de lecho fluidizado (p. ej., arena, carbón activado granular, tierra de diatomeas, perlas de gel de alginato de calcio).

[0105] El lactato producido usando las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede procesarse adicionalmente en otros productos de alto valor usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, después de la recuperación o purificación, se puede cambiar o derivatizar el lactato para diversos usos, como la fabricación de bioplásticos.

[0106] También se describen productos útiles, que incluyen lactato y composiciones de los mismos, y los de origen no natural que se producen microorganismos metabolizadores C_1 discutidos en este documento. Las composiciones de la presente descripción pueden estar en forma de un sólido (p. ej., un polvo) o líquido (p. ej., solución, emulsión, suspensión y similares) y pueden comprender lactato en combinación con un componente seleccionado del grupo que consiste en un microorganismo metabolizador C_1 no natural descrito aquí, agua, una sal, un ácido, una base, un tampón y similares.

[0107] El lactato y las composiciones del mismo producidas usando los métodos descritos en este documento pueden distinguirse del lactato producido a partir de productos petroquímicos o de lactato biosintetizado a partir de bacterias no metanotróficas mediante huellas dactilares de carbono. A modo de antecedentes, las mediciones isotópicas estables y los enfoques de balance de masa se utilizan ampliamente para evaluar las fuentes globales y los sumideros de metano *(véase* Whiticar y Faber, Org. Geochem. 10: 759, 1986; Whiticar, Org. Geochem. 16: 531, 1990) Se puede determinar una medida del grado de fraccionamiento isotópico de carbono causado por la oxidación microbiana del metano midiendo el valor de la firma isotópica (es decir, relación de isótopos estables ^{13}C: ^{12}C) del metano residual. Por ejemplo, los metanotrofos aeróbicos pueden metabolizar el metano a través de una enzima específica, la monoxigenasa de metano (MMO). Los metanótrofos convierten el metano en metanol y, posteriormente, el formaldehído. El formaldehído puede oxidarse aún más a CO_2 para proporcionar energía a la célula en forma de equivalentes reductores (NADH), o incorporarse a la biomasa a través de los ciclos RuMP o serina (Hanson y Hanson, Microbiol. Rev. 60: 439, 1996), que son directamente análogos a las vías de asimilación de carbono en los organismos fotosintéticos. Más específicamente, un metanotrofo Tipo I usa la ruta RuMP para la síntesis de biomasa y genera biomasa completamente a partir de CH_4, mientras que un metanotrofo Tipo II usa la ruta de serina que asimila el 50-70% del carbono celular del CH_4 y el 30-50% de CO_2 (Hanson y Hanson, 1996). Los métodos para medir las composiciones de isótopos de carbono se proporcionan, p. ej., en Templeton et al. (Geochim. Cosmochim. Acta 70:

1739, 2006). La relación de isótopos de carbono estable de $^{13}C/^{12}C$ de lactato (informada como un valor de $\delta\ ^{13}C$ en partes por mil, ‰), varía según la fuente y la pureza del sustrato de C_1 utilizado *(véase, p. ej.,* la Figura 2).

[0108] Por ejemplo, el lactato derivado del petróleo tendrá una distribución $\delta\ ^{13}C$ de aproximadamente -22 ‰ a aproximadamente -24 ‰. El lactato biosintetizado principalmente a partir de glucosa derivada del maíz ($\delta\ ^{13}C$ -10,73 ‰) tiene un $\delta\ ^{13}C$ de aproximadamente -14,66 ‰ a -14,85 ‰. Se espera que el lactato biosintetizado a partir de fuentes de carbono renovables tenga valores de $\delta\ ^{13}C$ que sean menos negativos que el lactato derivado del petróleo. Sin embargo, la distribución $\delta\ ^{13}C$ del metano del gas natural se diferencia de la mayoría de las fuentes de carbono, con una distribución $\delta\ ^{13}C$ más negativa que el petróleo crudo. Las bacterias metanotróficas muestran una preferencia por utilizar ^{12}C y reducir su consumo de ^{13}C en condiciones de exceso de metano, lo que resulta en un mayor desplazamiento negativo del valor de $\delta\ ^{13}C$. El lactato producido por bacterias metanotróficas como se describe en el presente documento tiene una distribución $\delta\ ^{13}C$ más negativa que el lactato de petróleo crudo o fuentes de carbono renovables, que varía de aproximadamente -30 ‰ a aproximadamente -70 ‰.

[0109] En ciertas realizaciones, una composición de lactato (es decir, una composición que comprende un lactato) y el lactato contenido en ella tienen una distribución $\delta\ ^{13}C$ de menos de aproximadamente -30 ‰, -40 ‰ o -50 ‰. En ciertas realizaciones, la composición de lactato y el lactato que contiene tienen una distribución de $\delta\ ^{13}C$ de aproximadamente -30 ‰ a aproximadamente -40 ‰, o de aproximadamente -40 ‰ a aproximadamente -50 ‰. En realizaciones adicionales, la composición de lactato y el lactato contenido en ella tienen un $\delta\ ^{13}C$ de menos de -30 ‰, menos de -31 ‰, menos de -32 ‰, menos de -33 ‰, menos de -34 ‰, menos de - 35 ‰, menos de -36 ‰, menos de -37 ‰, menos de -38 ‰, menos de -39 ‰, menos de -40 ‰, menos de -41 ‰, menos de -42 ‰, menos de -43 ‰, menos de -44 ‰, menos de -45 ‰, menos de -46 ‰, menos de -47 ‰, menos de -48 ‰, menos de -49 ‰, menos de -50 ‰, menos de -51 ‰, menos que -52 ‰, menos que -53 ‰, menos que -54 ‰, menos que -55 ‰, menos que -56 ‰, menos que -57 ‰, menos que -58 ‰, menos que -59 ‰, menos que - 60 ‰, menos de -61 ‰, menos de -62 ‰, menos de -63 ‰, menos de -64 ‰, menos de -65 ‰, menos de -66 ‰, menos de -67 ‰, menos de -68 ‰, menos de -69 ‰ o menos de -70 ‰. En realizaciones específicas, el lactato en tales realizaciones puede ser el ácido libre (es decir, ácido láctico, $CH_3CH(OH)COOH$, en donde dicho ácido libre tiene un $\delta\ ^{13}C$ como se describió anteriormente. En otras realizaciones, el lactato puede ser un sal, anhídrido, oligómero o éster que contiene uno o más grupos $CH_3C(OH)C(O)$- (como en el caso de una sal o éster) o uno o más grupos $CH_3C(O-)C(O)$-) (como en el caso de ciertos ésteres, oligómeros y anhídridos), en los que los átomos de carbono del grupo lactato tienen un $\delta\ ^{13}C$ como se describe aquí.

[0110] Los anteriores y otros aspectos de la invención se pueden entender mejor en relación con los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

MICROORGANISMOS METABOLIZADORES C_1 MODIFICADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE LACTATO

I. Metilococcus capsulatus (Bath) diseñado para la producción de lactato.

[0111] Las células huésped (Metilococcus capsulatus (Bath)) fueron diseñadas para poseer una dehidrogenasa de L-lactato exógeno (*ldh)* de ácido nucleico para permitir la producción de L-lactato de un sustrato C_1 (metano). Las secuencias de ácido nucleico que codifican las deshidrogenasa de lactatos se codificaron para el Metilococcus capsulatus (Bath) y se sintetizaron. Estos ácidos nucleicos optimizados con codones corresponden en secuencia a las siguientes SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43 y 45. Codifican las siguientes LDH, respectivamente, SEQ ID NO: 2 (*Streptococcus pasteurianus)*, 4 (*Lactobacillus helveticus)*, 6 (*Bos taurus)*, 8 (*Pediococcus acidilactici)*, 10 (*Rhizopus oryzae)*, 12 (*Enterococcus faecalis)*, 14 (*Lactobacillus casei)*, 16 (*Bacillus megaterium)*, 18 (*Taeniopygia guttata)*, 20 (*Lactobacillus plantarum)*, 22 (*Lactobaillus acidophilus)*, 24 (*Staphylococcus aureus)*, 26 (*Bacillus caldolyticus)*, 28 (*Actinomyces viscosus)*, 30 (*Bacillus anthracis)*, 32 (*Ruminococcus torques)*, 34 (*Listeria marthii)*, 36 (*Bacillus subtilis)*, 38 (*Enterococcus faecium)*, 40 (*Bacillus thuringiensis)*, 42 (*Geobacillus stearothermophilus)*, 44 (*Deinococcus radiodurans)*, 46 (*Plasmodium ovale* (variante)) y 48 (*Thermus thermophilus)*. Los ácidos nucleicos de LDH se clonaron en el plásmido pMS3 (representado en la Figura 3) aguas abajo de un sistema promotor que era el promotor de deshidrogenasa de metanol (MDH) con sitio de unión al ribosoma (SEQ ID NO: 49, promotor putativo de la proteína de deshidrogenasa de metanol de M. capsulatus (Bath)*,* subunidad grande n229 (MCA0779)) (vector pMS3x1) o alternativamente en el mismo vector con uno de los dos sitios de unión ribosomal mutados diferentes (vectores pMS3x2 y pMS3x3) o aguas abajo del promotor MDH en un promotor inducible por sistema de IPTG (LacIq) (con sitio de unión al ribosoma nativo (vector pMS3z1) o alternativamente en el mismo vector con uno de los dos sitios de unión al ribosoma mutados diferentes sitios de unión al ribosoma mutado (vectores pMS3z2 y pMS3z3). pMS3, derivado del plásmido RK2 (ver Schmidhauser, et al. al., J. Bacteriol. 164 (1): 446-55 (1985)) es un plásmido mínimo que contiene secuencias que codifican una proteína de iniciación de replicación (trfA) y un promotor (Pb1a), un origen de replicación (oriV), un origen de transferencia (oriT), y el gen y promotor de resistencia a la kanamicina (promotor KanR). Los vectores se introdujeron en Metilococcus

capsulatus (Bath) a través de apareamiento conjugado basado en los métodos informados por Ali y Murrell (Microbiology 155: 761, 2009).

[0112] Los vectores se transformaron primero en *E. coli* S17-1 utilizando métodos de electroporación estándar. La transformación se confirmó mediante la selección de colonias resistentes a la kanamicina en agar LB que contenía 30 µg/ml de kanamicina. La secuencia del plásmido donante se verificó mediante secuenciación. Las colonias transformadas se inocularon en medios LB que contenían 30 µg/ml de kanamicina y se agitaron durante la noche a 37°C. Se usaron alícuotas (p. ej., 100 ml) de cultivos nocturnos para inocular medios LB frescos que contenían 30 µg/ml de kanamicina y luego se cultivaron hasta una densidad óptica (OD_{600}) entre 0,45-0,6 (crecimiento de la fase de registro medio). Alícuotas de este segundo cultivo equivalentes a un OD de 1,6 (p. ej., 3 ml de un cultivo con un OD_{600} de 0,5) se sedimentaron luego por centrifugación y se lavaron tres veces con MM-W1 estéril por centrifugación y resuspensión. Luego se recogió una alícuota de 10 ml del cultivo nocturno en un filtro de nitrocelulosa estéril de 47 mm (tamaño de poro de 0,2 mm). Las células donantes de *E. coli* se lavaron en el filtro con 50 ml de medio NSM estéril para eliminar los medios residuales y el antibiótico.

[0113] En paralelo, se inoculó una muestra de la cepa receptora del M. capsulatus (Bath) (NCIMB 11132) en frascos de suero de 100 ml que contenían 20-50 ml de medio MM-W1. Las botellas se sellaron con septos de caucho de butilo y se rizaron y luego se introdujeron entre 40-60 ml de metano en la botella sellada. Las botellas se agitaron continuamente en una incubadora a 42°C hasta alcanzar un OD_{600} de aproximadamente 0,3. Aproximadamente 5 ml de cultivo de M. capsulatus (Bath) se sedimentaron por centrifugación y se mezclaron con las células donantes de E. *coli.* Esta mezcla se colocó en una placa de agar MM-W1 que contenía un 0,5% de extracto de levadura y se incubó durante 48 ha 37°C en presencia de una mezcla 1:1 de metano y aire. Después de 24 h, las células se resuspendieron en 0,5 ml de medio estéril (MM-W1) y se extendieron alícuotas (100 ml) sobre placas de agar MM-W1 que contenían 7,5 µg/ml de kanamicina.

[0114] Las placas se incubaron en cámaras selladas que contienen una mezcla 1:1 de metano y aire y se mantuvieron a 42°C (M. capsulatus (Bath)). La mezcla de gases se reponía aproximadamente cada 2 días hasta que se formaron colonias, típicamente después de 5-8 días. Se colonizaron colonias en placas NSM que contenían kanamicina para confirmar la resistencia a la kanamicina, así como para aislar aún más las células transformadas de metanotrofas de las células donantes de *E. coli* residuales.

[0115] La presencia de expresión *ldh* o función de LDH se verificó por (1) PCR y secuenciación y/o (2) ensayo para la presencia de lactato. Por ejemplo, para verificar que el material de la colonia de transferencia se hirvió a 98°C y se sometió a PCR usando condiciones estándar (98°C durante 1 min; 30 ciclos de 98°C durante 10 s, 55°C durante 30 s y 72°C durante 1 min; 72°C durante 10 min). Opcionalmente, como control adicional, 1 ml de cada uno de los plásmidos aislados se puede transformar de nuevo en *E. coli* XL1-Blue MRF'Kan (Stratagene, La Jolla, CA), y los plásmidos se pueden aislar para verificar por digestión de endonucleasa de restricción.

[0116] El M. capsulatus (Bath) recombinante se cultivó a 42°C en placas de 24 pocillos que contenían medio MM-W1 contenido en cámaras selladas. La composición del espacio de cabeza se ajustó a un volumen 1:1 de metano: aire. Las botellas se agitaron a una velocidad de 200-250 rpm. Alternativamente, el cultivo se mantuvo en placas de medio MM-W1 solidificadas con agar al 1,5% p/v cultivado en una cámara hermética a los gases que contenía una mezcla 1:1 (v/v) de metano: aire-gas. Las placas se incubaron invertidas en la cámara a 42°C.

Producción de lactato a partir de un sustrato C_1 (CH_4)

[0117] M. capsulatus (Bath) transformado con un vector solo (es decir, control negativo sin el ácido nucleico y promotor que codifica LDH exógeno) o vector que contiene el ácido nucleico LDH exógeno y el sistema promotor se usaron para inocular 2,5 ml de medio MM-W1/pocillo de placas de 24 pocillos con 7,5 µg/ml de kanamicina. La composición del medio MM-W1 utilizada fue la siguiente: 0,8 mM $MgSO_4 * 7H_2O$, 10 mM $NaNO_3$, 0,14 mM $CaCl_2$, 1,2 mM $NaHCO_3$, 2,35 mM KH_2PO_4, 3,4 mM K_2HPO_4, 20,7 µM $Na_2MoO_4 * 2H_2O$, 1 µM $CuSO_4 * 5H_2O$, 10 µM Fe^{III}-Na-EDTA, y 1 ml por litro de solución de metales traza (que contiene, por litro, 500 mg de $FeSO_4 * 7H_2O$, 400 mg de $ZnSO_4 * 7H_2O$, 20 mg $MnCl_2 * 7H_2O$, 50 mg de $CoCl_2 * 6H_2O$, 10 mg $NiCl_2 * 6H_2O$, 15 mg H_3BO_3, 250 mg EDTA). Se agregaron fosfato, bicarbonato y Fe^{III}-Na-EDTA después de que el medio se esterilizara en autoclave y se enfriara. Las placas se colocaron en cámaras selladas y el espacio superior se enjuagó con una mezcla 1:1 de aire y metano como fuente de carbono para el M. capsulatus (Bath), las placas se sellaron y luego se agitaron continuamente a una velocidad de 200-250 rpm durante la incubación a 42-45°C durante un precultivo de 24 horas. Luego, se inocularon nuevas placas de 24 pocillos que contenían 2,5 ml de MM-W1 fresco y kanamicina con 0,25 ml del pre-cultivo y se incubaron a 42-45°C durante 72 horas. La cepa de M. capsulatus (Bath) que contiene el promotor MDH en el sistema promotor inducible por IPTG (Laclq) se hizo crecer en presencia de IPTG 0,1-10 mM). Las células se cosecharon por centrifugación y los sobrenadantes se analizaron utilizando el kit de ensayo de enzima de L-lactato EnzyFluo™ según las instrucciones del fabricante (BioAssay Systems, Hayward, CA 94545, número de catálogo EFLLC-100) con la excepción de que los sobrenadantes se incubaron con reactivos del kit durante dos horas antes de medir la fluorescencia. Como el metano era la única fuente de carbono proporcionada a las células, todo el lactato producido debe haber sido derivado del metano.

Resultados

[0118] Los resultados en la Tabla 1 demuestran la producción de lactato usando una variedad de ácidos nucleicos exógenos que codifican la deshidrogenasa de lactato. En ciertos casos en los que el lactato se produjo bajo la expresión constitutiva de la LDH, el M. capsulatus (Bath) recombinante mostró una proporción de OD_{600} de alto lactato *(ver* Figura 1).

Tabla 1. Producción de ácido láctico por M. capsulatus (Bath) que expresa LDH

Ácido nucleico de LDH en el vector SEQ ID NO:	Fuente de secuencia del polipéptido LDH	Constitutivo			Inducible	
		(pMS3x2)	(pMS3x3)	(pMS3z1)	(pMS3z3)	(pMS3x2)
27	*Actinomyces viscosus*		++	+++	++	+
29	*B. anthracis*		+++		+++	+++
25	*Bacillus caldolyticus*		+	+++	+++	+
15	*Bacillus megaterium*			+	+++	+++
35	*Bacillus subtilis*			+		++
39	*Bacillus thuringiensis*		+			
43	*D. radiodurans*				+++	++
11	*Enterococcus faecalis*		+	+++	++	+++
37	*Enterococcus faecium*		+	+	+	
41	*Geobacillus stearothermophilus*		+	+	++	++
21	*Lactobacillus acidophilus*		++	++	++	++
13	*Lactobacillus casei*	+			+	
19	*Lactobacillus plantarum*		++	+	++	
33	*Listeria marthii*			++	+++	+++
7	*Pediococcus acidilactici*	+			+++	+++
9	*R. oryaze*				+++	+++
31	*Ruminococcus pares*				++	+++
23	*Staphylococcus aureus*		++		+++	++
1	*Streptococcus pasteurianus*		+		++	+++
17	*Taeniopygia guttata*		+			
47	*Thermus Thermophilus*		+	+	+	

[0119] Para cada secuencia en la Tabla 1, el valor detectado más alto se enumera de acuerdo con la siguiente escala: + 3 - 100uM, ++ 100 - 1000uM, +++> 1000uM. El límite inferior para designar células recombinantes como que tienen actividad LDH positiva (3 µM) se estableció en concentraciones 3 veces mayores de lactato que el fondo del ensayo de cepas que no se sabe que portan un ácido nucleico LDH funcional (es decir, las cepas de control negativo). En varios casos, la actividad de LDH (es decir, la producción de lactato) no se detectó por encima de este umbral para los ácidos nucleicos enumerados en la tabla anterior con ciertos promotores, o ácidos nucleicos que codifican LDH de *Bos Taurus* (SEQ ID NO: 5), L. *helveticus* (SEQ ID NO: 3), o *Plasmodium ovale* (SEQ ID NO: 45). En tres casos donde el ácido nucleico de LDH exógeno bajo el control de un promotor constitutivo se conjugó con la cepa huésped (es decir, los ácidos nucleicos que codifican *Bacillus anthracis* LDH (n: 29), *Bacillus thuringensis* LDH (SEQ ID NO: 39) y *Deinococcus radiodurans* LDH (SEQ ID NO: 43)), no se observaron colonias, sin embargo, se formaron colonias cuando los mismos ácidos nucleicos de LDH exógenos se colocaron bajo el control de un promotor inducible que indica un posible efecto tóxico del lactato en las células. Si bien no desea estar sujeto a ninguna teoría, se cree que debido a la alta toxicidad del lactato, la actividad de LDH induce una alta presión selectiva sobre las células que expresan para mutar o inactivar el ácido nucleico de LDH. Por lo tanto, la falta de actividad por encima del umbral

puede ser causada por una serie de factores (que se observaron en varios clones identificados por debajo del umbral de detección), incluidas las mutaciones en el ácido nucleico de LDH o la pérdida del plásmido, y no proporciona evidencia concluyente por la presencia o ausencia de la función LDH en ese caso.

II Metilosinus trichsporium OB3b y Metilomicrobium buryatense 5G diseñados para la producción de lactato.

[0120] Las células huésped (*Metilosinus trichosporium* OB3b y *Metilomicrobium buryatense* 5G) fueron diseñadas para poseer un ácido nucleico de deshidrogenasa de lactato exógeno (*ldh*) para permitir la producción de L-lactato a partir de un sustrato C_1 (metano). Las moléculas de ácido nucleico que codifican LDH exógenas de la Parte I anterior se clonaron individualmente en el vector de expresión pMS10 (un plásmido equivalente a PMS3 con gen de resistencia a la kanamicina de una fuente diferente) aguas abajo de un sistema promotor para la conjugación en *M. trichosporium* OB3b o *M.buryatense* basado en 5G sobre los métodos reportados por Ali y Murrell (Microbiology 155: 761, 2009). Para la transformación de *Metilosinus trichosporium* OB3b, el promotor fue el promotor Ob3b sga (serina-glucoxilato transaminasa) (SEQ ID NO: 50). Para la transformación de *Mthylomicrobium buryatense* 5G, el promotor fue el promotor *Metilomonas* 16a moxF (deshidrogenasa de metanol) (SEQ ID NO: 51) o el *promotor Metilomonas* 16a hps (hexulosa-6-fosfato sintetasa) (SEQ ID NO: 52).

[0121] Brevemente, el plásmido movilizable que contiene uno o más ácidos nucleicos de interés (p. ej., *LDH)* y que codifica resistencia a la kanamicina se transformó primero en *E. coli* S17-1 utilizando métodos de electroporación estándar. La transformación se confirmó mediante la selección de colonias resistentes a la kanamicina en agar LB que contenía 30 µg/ml de kanamicina. Las colonias transformadas se inocularon en medios LB que contenían 30 µg/ml de kanamicina y se agitaron a 37°C hasta que la OD600 alcanzó 1,0. Luego se recogió una alícuota de 1,0 ml del cultivo en un tubo Eppendorf estéril (tamaño de 1,6 ml). Las células donantes de *E. coli* se lavaron 2x 1,0 ml de medio MM-W1 estéril (OB3b) o NMS (5G) para eliminar los medios residuales y el antibiótico.

[0122] Paralelamente, se inoculó una muestra de la cepa receptora *M. trichosporium* OB3b (NCIMB 11131) o *M. buryatense* 5G (de la Dra. Mary Lidstrom, Universidad de Washington) en frascos de suero de 100 ml que contenían 20-50 ml de medios MM-W1 (OB3b) o NMS (5G). El espacio de cabeza de las botellas se enjuagó con una mezcla 1:1 de oxígeno y metano, y las botellas se sellaron con septos de caucho butílico y se engarzaron. Las botellas se agitaron continuamente en una incubadora a 30°C hasta alcanzar un OD_{600} de aproximadamente 0,5. Las células OB3b o 5G se recogieron luego por centrifugación y se lavaron con 50 ml de medio MM-W1 o NMS estéril. Las células lavadas se resuspendieron en medio MM-W1 o NMS estéril a una OD_{600} de 1,0 y se mezclaron alícuotas con el donante *E. coli* en una relación receptor:donante de 2:1. La mezcla celular se sedimentó por centrifugación y el sedimento celular se detectó en una placa de agar MM-W1 o NMS que contenía extracto de levadura al 0,5% y se incubó durante 48 h a 30°C en presencia de una mezcla 1:1 de metano y aire. Después de 48 h, las células se volvieron a suspender en 1,0 ml de medio estéril y se extendieron alícuotas (100 ml) sobre placas de agar MM-W1 o NMS que contenían 4-7,5 µg/ml de kanamicina.

[0123] Las placas se incubaron en cámaras selladas que contienen una mezcla 1:1 de metano y aire y se mantuvieron a 30°C. La mezcla de gas se repone cada 2 días hasta formarse las colonias, típicamente después de 7-14 días. Se colonizaron las colonias en placas MM-W1 o NMS que contenían kanamicina para confirmar la resistencia a la kanamicina, así como para aislar adicionalmente las células metanotróficas transformadas de las células donantes de *E. coli* residuales.

[0124] La presencia de expresión *ldh* o función LDH se verificó mediante uno o más de (1) PCR y secuenciación, (2) análisis de transferencia Western, y (3) ensayo para la presencia de lactato. Por ejemplo, para verificar la transferencia, el ADN plasmídico se aisló y se sometió a PCR usando OneTaq 2x Master Mix con tampón estándar (New England BioLabs) usando condiciones estándar (95°C durante 5 min; 25 ciclos de 95°C durante 30 s, 60°C durante 30 s, y 72°C durante 1 min; 72°C durante 10 min) y juegos de cebadores diseñados específicamente para unirse por fuera y por dentro al ácido nucleico *ldh*. El ADN del plásmido original que contiene el clonado de *ldh* se usó ácido(s) nucleico(s) como un control positivo para la PCR.

[0125] Los *M. trichosporium* OB3b o *M. buryatense* 5G recombinantes se cultivaron a 30ºC en frascos de suero que contenían MM-W1 o NMS que contenían 4-7,5 ug/ml de medio de kanamicina. La composición del espacio de cabeza se ajustó a un volumen 1:1 de metano:aire. Las botellas se agitaron a una velocidad de 200-250 rpm. Alternativamente, el cultivo se mantuvo en placas de medio MM-W1 o NMS solidificadas con agar al 1,5% p/v cultivado en una cámara hermética a los gases que contenía una mezcla 1:1 (v/v) de metano: aire-gas. Las placas se incubaron invertidas en la cámara a 30°C.

Producción de lactato a partir de un sustrato C_1 (CH_4)

[0126] *M. trichosporium* OB3b o *M. buryatense* 5G transformada con un vector solo o vector que contiene un ácido nucleico *ldh* se utilizaron para inocular 2,0 ml de MM-W1 o medios NMS en tubos de Balch (vidrio Bellco) que tienen 5 µg/ml de kanamicina. La composición del medio MM-W1 utilizado fue la siguiente: 0,8 mM $MgSO_4 * 7H_2O$, 10 mM $NaNO_3$, 0,14 mM $CaCl_2$, 1,2 mM $NaHCO_3$, 2,35 mM KH_2PO_4, 3,4 mM K_2HPO_4, 20,7 µM $Na_2MoO_4 * 2H_2O$, 1 µM $CuSO_4 * 5H_2O$, 10 µM Fe^{III}-NaEDTA y 1 ml por litro de solución de metales traza (que contiene, por litro 500 mg $FeSO_4 *$

$7H_2O$, 400 mg $ZnSO_4 * 7H_2O$, 20 mg $MnCl_2 * 7H_2O$, 50 mg $CoCl_2 * 6H_2O$, 10 mg $NiCl_2 * 6H_2O$, 15 mg H_3BO_3, 250 mg EDTA). Se agregaron fosfato, bicarbonato y Fe^{III}-Na-EDTA después de que el medio se esterilizara en autoclave y se enfriara. La composición de los medios NMS utilizados fue la siguiente: 1,00 g/L $MgSO_4 * 7H_2O$, 0,02 g/L $CaCl_2$ * $6H_2O$, 1,00 g/LKNO_3, 15 g/L NaCl, 20 ml de tampón fosfato (5,44 g/L KH_2PO_4, 14,34 g/L Na_2HPO_4 * 12 H_2O), 50 ml de tampón de carbonato (45 ml de $NaHCO_3$ 1 M + 5 ml de Na_2CO_3 1 M), 2 ml de solución de oligoelemento (0,5 g/L Na_2-EDTA, 1,0 g/L $FeSO_4 * 7H_2O$, 0,75 g/L Fe-EDTA, 0,8g/L $ZnSO_4 * 7H_2O$, 0,005 g/L $MnCl_2 * 4H_2O$, 0,03 g/LH_3BO_3, 0,05 g/L $CoCl_2 * 6H_2O$, 0,4 g/L Cu-EDTA, 0,6 g/L $CuCl_2 * 2H_2O$, 0,002 g/L $NiCl_2 * 6H_2O$, 0,05 g/L Na_2MoO_2 * $2H_2O$) (Ojala, DS, et al., Methods in Enzymology, Vol. 495, pp. 99-118). Se añadieron tampones de fosfato y carbonato estériles después de que la solución se enfriara a temperatura ambiente. El espacio superior de la placa se enjuagó con una mezcla 1:1 de oxígeno y metano como fuente de carbono para las cepas, los tubos se sellaron con septos de caucho butílico, se engarzaron y luego se agitaron continuamente a una velocidad de 200-250 rpm durante la incubación a 30ºC.°C durante 72 horas. Las células se cosecharon por centrifugación y los sobrenadantes se analizaron usando el kit de ensayo de enzima L-lactato EnzyFluo™ según las instrucciones del fabricante (BioAssay Systems, Hayward, CA 94545, número de catálogo EFLLC-100) con la excepción de que los sobrenadantes se incubaron con reactivos del kit durante dos horas antes de medir la fluorescencia. Los resultados se normalizaron a valores de OD_{600} para cada cultivo correspondiente. Como el metano era la única fuente de carbono proporcionada a las células, todo el lactato producido debe haber sido derivado del metano.

Resultados

[0127] *M. trichosporium* OB3b y *M. buryatesne* 5G se alteraron para producir L-lactato mediante la introducción y expresión de un ácido nucleico L-deshidrogenasa de lactato exógeno. Los diversos ácidos nucleicos de deshidrogenasa de lactato exógena se unieron operativamente a un promotor constitutivo en un vector de expresión que funciona en metanótrofos.

[0128] En todos los casos en los que se produjo lactato, el OD_{600} de los cultivos osciló entre 0,31 y 0,71 y todas las cepas recombinantes produjeron niveles bajos pero detectables (1- 20 µM mayores que concentraciones de lactato 3 veces mayores que las cepas que no se sabe que llevan un ácido nucleico funcional LDH) de lactato.

EJEMPLO 2

DISTRIBUCIÓN DE ISÓTOPOS DE CARBONO ESTABLE EN PRODUCTOS DERIVADOS DE MICROORGANISMOS METABOLIZADORES C_1

[0129] El ácido láctico derivado de metano producido por cepas de M. capsulatus (Bath) modificadas se analizó para determinar el contenido de carbono (% peso seco) y la relación de isótopos estables de carbono (^{13}C) a través de un analizador elemental/espectrometría de masas de relación de isótopos de flujo continuo utilizando un analizador elemental CHNOS (vario ISOTOPE cube, Elementar, Hanau, Alemania) junto con un IsoPrime100 IRMS (Isoprime, Cheadle, Reino Unido). Se centrifugaron muestras de biomasa metanotrófica cultivada en fermentadores o botellas de suero, se resuspendieron en agua desionizada y los volúmenes correspondientes a 0,2-2 mg de carbono (aproximadamente 0,5-5 mg de peso de células secas) se transfirieron a cápsulas de estaño de 5 x 9 mm (Costech Analytical Technologies, Inc., Valencia, CA) y se secaron a 80°C durante al menos 24 horas. Las muestras de ácido láctico (aprox. 0,3-1 mg) recuperadas de cultivos de *M. capsulatus* (Bath) que expresan secuencias de ácido nucleico que codifican LDH que codifican diferentes LDH se resuspendieron de manera similar en agua desionizada, se transfirieron a cápsulas de estaño de 5 x 9 mm y se secaron a 80°C durante al menos 24 horas. Los estándares que contenían al menos 0,1 mg de carbono proporcionaron valores confiables de $\delta^{13}C$.

[0130] La relación de isótopos se expresa en notación "delta" (‰), en donde la composición isotópica de un material en relación con la de un estándar en una desviación por millón está dada por $\delta^{13}C$ (o $\delta^{15}N$) = ($R_{Muestra}/R_{Estándar-1}$) x 1.000, en donde R es la relación molecular de las formas de isótopos pesados a ligeros. El estándar para el carbono es la Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) y para el nitrógeno es el aire. El NIST (National Institute of Standards and Technology) propuso SRM (Standard Reference Material) Nº 1547, hojas de durazno, se usó como estándar de calibración. Todos los análisis de isótopos se realizaron en el Center for Stable Isotope Biogeochemistry de la Universidad de California, Berkeley. La precisión externa a largo plazo para los análisis de isótopos C y N es 0,10 ‰ y 0,15 ‰, respectivamente.

[0131] Las cepas separadas de M. capsulatus (Bath) construidas para la expresión constitutiva de 4 ácidos nucleicos de LDH diferentes (véase la Tabla 2) se cultivaron en metano en botellas de suero 0,5L que contienen 130 ml de medio definido MMS1,0 modificado con 15 ug/ml de kanamicina. Las cepas se inocularon de cultivos discontinuos de botellas de suero (7% v/v) cultivadas en los mismos medios suministrados con una mezcla 1:1 (v/v) de metano y aire. La composición del medio MMS1,0 fue la siguiente: 0,8 mM $MgSO_4 * 7H_2O$, 30 mM $NaNO_3$, 0,14 mM $CaCl_2$, 1,2 mM $NaHCO_3$, 2,35 mM KH_2PO_4, 3,4 mM K_2HPO_4, 20,7 µM $Na_2MoO_4 * 2H_2O$, 6 µM $CuSO_4 * 5H_2O$, 10 µM Fe^{III}-Na-EDTA y 1 ml por litro de una solución de metales traza (que contiene, por L: 500 mg de FeSO4 $* 7H_2O$, 400 mg $ZnSO_4 * 7H_2O_2$0 mg $MnCl_2 * 7H_2O$, 50 mg $CoCl_2 * 6H_2O$, 10 mg $NiCl_2 * 6H_2O$, 15 mg H_3BO_3, 250 mg EDTA). Se agregaron fosfato, bicarbonato y Fe^{III}-Na-EDTA después de que los medios se esterilizaron en autoclave y se enfriaron. El pH final de los medios fue de 7,0 $\pm$ 0,1. Las botellas de suero se inocularon por duplicado, se sellaron con tapones de

goma y se inyectaron con 60 ml de gas metano (99% de pureza; grado 2,0, Praxair suministrado por Alliance Gas, San Carlos, CA) añadido mediante una jeringa a través de un filtro estéril de 0,45 µM y agujas estériles 27G. Los cultivos se incubaron a 42°C con agitación giratoria a 250 rpm y se midió el crecimiento a intervalos de aproximadamente 12 a 24 horas retirando muestras de 1 ml para determinar OD_{600}. Las submuestras (0,5 ml) se aclararon por centrifugación y los sobrenadantes libres de células se analizaron para L-lactato como se describió anteriormente. Después del muestreo, las botellas se ventilaron y el espacio de cabeza se reemplazó con 60 ml de metano y 60 a 120 ml de oxígeno concentrado (al menos 85% de pureza). Aproximadamente a las 72 horas, se retiraron las muestras finales y los volúmenes de cultivo restantes se clarificaron por centrifugación (8.000 rpm, 10 minutos), se determinó su pH (pH 6,7 a 6,9) y los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta la recuperación del producto y análisis.

Tabla 2. Descripción de la muestra de cepa

Identificación de la cepa	SEQ ID NO. (Vector)	Fuente LDH
1	27 (pMS3x3)	*A. viscosus*
3	33 (pMS3x3)	*L. marthii*
4	21 (pMS3x3)	*L. acidophilus*
5	29 (pMS3x2)	*B. anthracis*

[0132] El ácido láctico se recuperó de cada uno de estos cultivos por extracción líquido-líquido y el material extraído a partir de sobrenadantes acidificados se analizaron posteriormente para el contenido de ácido L-láctico, la composición de ácido láctico relativo y para estable distribución de isótopo de carbono (valores $\delta^{13}C$; *ver* Tabla 3). Los sobrenadantes de cultivos de metano de cepas de M. capsulatus (Bath) modificadas que expresan secuencias de ácido nucleico que codifican LDH que codifican diferentes LDH se clarificaron por centrifugación, se ajustaron a pH 2 usando HCl concentrado y se extrajeron dos veces usando volúmenes iguales de acetato de etilo (Fisher, grado HPLC) Las fracciones de acetato de etilo de cada muestra se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y luego se concentraron a sequedad a presión reducida por evaporación rotatoria a 40ºC. Los residuos se disolvieron en acetato de etilo y las submuestras se analizaron para determinar el contenido de ácido L-láctico (kit de ensayo de enzima L-lactato EnzyFluo™, Catálogo Nº EFLLC- 100; BioAssay Systems, Hayward, CA 94545) y la composición de ácido láctico por GC-MS.

[0133] La cromatografía de gas-espectrometría de masas se llevó a cabo en un 6890 GC Agilent equipado con un Zebron ZB-5HT (p/n 7HG-G015-11; Phenomenex, Torrance CA) y un detector selectivo de masas. La temperatura inicial de la columna fue de 50°C y se incrementó a una velocidad de 20°C por minuto a 320°C y se mantuvo durante 5 minutos. Las temperaturas de la línea de entrada y transferencia fueron de 250°C y se utilizó helio como gas portador. Las muestras que contenían L-lactato recuperado por extracción líquido-líquido se desvatizaron con BSTFA antes del análisis (inyecciones de 1,0 µl) de la siguiente manera: para secar extractos que contenían lactato (que contenían 0,3 a 1 mg de L-lactato) en viales GC de borosilicato se agregaron 400 µL N,O-bis(trimetilsililo)trifluoroacetamida (BSTFA), 400 µL de acetonitrilo y 100 µL de tolueno. Se preparó una muestra en blanco en un método similar como referencia. Viales de muestra con solventes de derivatización se calentaron durante 1 hora usando un bloque de calor a 50°C. Las muestras finales derivadas se analizaron por GC-MS usando las condiciones descritas anteriormente. Los cromatogramas se integraron y los picos individuales se registraron por tiempo y recuentos de área. Los cromatogramas de muestra se superpusieron con el cromatograma en blanco para determinar los picos comunes tanto en blanco como en muestras para que pudieran eliminarse de la evaluación de cuantificación relativa posterior. Los espectros de masas de cada pico restante en el cromatograma se revisaron contra una base de datos espectrales de masas para la identificación tentativa. La lista final de analitos y áreas de pico se utilizó para determinar las concentraciones relativas de ácido láctico en relación con todos los analitos. Para este paso, se supuso que todos los analitos tenían conteos de abundancia total equivalentes (factor de respuesta esencialmente equivalente). Los resultados indicaron que el contenido relativo del ácido láctico era del 55-80% dependiendo de la muestra individual (*ver* Tabla 3).

Tabla 3. Distribución estable de isótopos de carbono para el ácido L-láctico producido por diferentes deshidrogenasas de lactatos en *Metilococcus capsulatus*

ID de cepa nº	Fuente de LDH (o lactato)	Pureza LA (%)	Masa de carbono analizada (mg) †	δ Ácido ^{13}C L-Láctico
1	*A. viscosus*	70,1	0,24	-46,82
3	*L. marthii*	73,6	0,25	-42,74
3	*L. marthii*	80,6	0,35	-54,55
4	*L. acidophilus*	55,8	0,27	-50,61
4	*L. acidophilus*	55,4	0,27	-50,62
5	*B. anthracis*	71,3	0,29	-45,44
5	*B. anthracis*	73,7	0,38	-48,93
Controles:				
L-lactato de sodio	Aldrich 71718	> 98	0,98	-10,60
Lactato de sodio	Aldrich 71718	> 98	0,87	-10,59
L-lactato de calcio pentahidratado	Aldrich C8356	> 98	0,96	-12,16
L-lactato de calcio pentahidratado	Aldrich C8356	> 98	0,90	-12,09
* La pureza de ácido láctico se determinó mediante GC-MS como se describe en el texto. † La masa de carbono analizada se informa a partir de los resultados del analizador elemental CHNOS.				

LISTA DE SECUENCIAS

[0134]

<110> Calysta Energy, Inc.
Silverman, Josh
Saville, Renee M.
Lee, Sungwon
Regitsky, Drew D.
Resnick, Sol M.

<120> Composiciones y métodos para la producción biológica de lactato

<130> 200206,414WO

<150> US 61/836,609
<151> 2013-06-18

<150> US 61/928,390
<151> 2014-01-16

<160> 67

<170> Patente versión 3,5

<210> 1
<211> 987
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Streptococcus bovis LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (987)

<400> 1

```
atg acc gcg acc aag cag cac aaa aaa gtt atc ctg gtt gga gat ggg          48
Met Thr Ala Thr Lys Gln His Lys Lys Val Ile Leu Val Gly Asp Gly
1               5                   10                  15

gcc gtg ggc tcg tcg tat gcg ttc gcc ctc gtc aac cag ggc ata gcc          96
Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Leu Val Asn Gln Gly Ile Ala
            20                  25                  30

cag gaa ctg ggc atc atc gag atc ccg cag ttg ttc gac aaa gcc gtc         144
Gln Glu Leu Gly Ile Ile Glu Ile Pro Gln Leu Phe Asp Lys Ala Val
        35                  40                  45

ggt gac gcc gag gac ctc agc cac gct ctt gcc ttc acc agc cct aaa         192
Gly Asp Ala Glu Asp Leu Ser His Ala Leu Ala Phe Thr Ser Pro Lys
    50                  55                  60

aag atc tac gcg gca aag tac gag gat tgc gcc gac gcg gac ctg gta         240
Lys Ile Tyr Ala Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ala Asp Ala Asp Leu Val
65                  70                  75                  80

gtg atc acc gcc gga gcg ccc cag aag ccc ggt gaa acg cgc ctg gac         288
Val Ile Thr Ala Gly Ala Pro Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp
                85                  90                  95

ctg gtc ggg aag aac ttg gct atc aat aag tca att gtc acc gaa gtg         336
Leu Val Gly Lys Asn Leu Ala Ile Asn Lys Ser Ile Val Thr Glu Val
```

```
                100                 105                 110

gtc aag tcg ggg ttc aac ggc att ttc ctc gtg gcc gcg aat cca gtg  384
Val Lys Ser Gly Phe Asn Gly Ile Phe Leu Val Ala Ala Asn Pro Val
        115                 120                 125

gac gtg ctg aca tac agc acc tgg aag ttc tcc ggc ttc ccg aag gaa  432
Asp Val Leu Thr Tyr Ser Thr Trp Lys Phe Ser Gly Phe Pro Lys Glu
    130                 135                 140

cgg gtc atc ggt agc ggc acg agc ctg gac tcg gcc agg ttt cgg caa  480
Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Ser Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Gln
145                 150                 155                 160

gcc ctg gcg gag aag ctg gat gtc gat gcc cgc tcc gtc cac gca tac  528
Ala Leu Ala Glu Lys Leu Asp Val Asp Ala Arg Ser Val His Ala Tyr
                165                 170                 175

atc atg ggc gag cat ggc gac tcg gag ttc gcc gtg tgg agc cat gcg  576
Ile Met Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Phe Ala Val Trp Ser His Ala
            180                 185                 190

aat gtc gct ggg gtg aat ctg gag aac tat ctg aaa gac gtc cag aac  624
Asn Val Ala Gly Val Asn Leu Glu Asn Tyr Leu Lys Asp Val Gln Asn
        195                 200                 205

gtg aac gaa gcg gaa ctc gtg gag ctg ttc gag ggc gtc cgt gat gcg  672
Val Asn Glu Ala Glu Leu Val Glu Leu Phe Glu Gly Val Arg Asp Ala
    210                 215                 220

gcg tat tcc atc atc aac aaa aag ggc gcc act ttc tac ggc atc gcc  720
Ala Tyr Ser Ile Ile Asn Lys Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile Ala
225                 230                 235                 240

gtg gcg ctc gcc cgg atc acg aag gcc att ttg aac gat gaa aac gcc  768
Val Ala Leu Ala Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu Asn Asp Glu Asn Ala
                245                 250                 255

gtc ctg ccg ctg tcc gtg ttc cag gaa ggg cag tat ccg ggt gtg acc  816
Val Leu Pro Leu Ser Val Phe Gln Glu Gly Gln Tyr Pro Gly Val Thr
            260                 265                 270

gac tgc tac atc ggc cag ccc gcc atc gtc gga gcc cat ggc atc gta  864
Asp Cys Tyr Ile Gly Gln Pro Ala Ile Val Gly Ala His Gly Ile Val
        275                 280                 285

cgc ccc gtc aac atc ccg ctc aac gac gcg gag cag caa aag atg gaa  912
Arg Pro Val Asn Ile Pro Leu Asn Asp Ala Glu Gln Gln Lys Met Glu
    290                 295                 300

gca tct gca aaa gaa ctg aag gcc atc atc gac gaa gcc ttc tcc aaa  960
Ala Ser Ala Lys Glu Leu Lys Ala Ile Ile Asp Glu Ala Phe Ser Lys
305                 310                 315                 320

gaa gag ttt gcc agt gcg gcg aag taa                             987
Glu Glu Phe Ala Ser Ala Ala Lys
                325
```

<210> 2
< 211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 2

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

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

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

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

Lys Ile Tyr Ala Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ala Asp Ala Asp Leu Val
65                  70                  75                  80

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

Leu Val Gly Lys Asn Leu Ala Ile Asn Lys Ser Ile Val Thr Glu Val
            100                 105                 110

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

Asp Val Leu Thr Tyr Ser Thr Trp Lys Phe Ser Gly Phe Pro Lys Glu
    130                 135                 140

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

Ala Leu Ala Glu Lys Leu Asp Val Asp Ala Arg Ser Val His Ala Tyr
                165                 170                 175

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

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

Val Asn Glu Ala Glu Leu Val Glu Leu Phe Glu Gly Val Arg Asp Ala
    210                 215                 220

Ala Tyr Ser Ile Ile Asn Lys Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile Ala
```

```
225                 230                 235                 240

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

Val Leu Pro Leu Ser Val Phe Gln Glu Gly Gln Tyr Pro Gly Val Thr
            260                 265                 270

Asp Cys Tyr Ile Gly Gln Pro Ala Ile Val Gly Ala His Gly Ile Val
        275                 280                 285

Arg Pro Val Asn Ile Pro Leu Asn Asp Ala Glu Gln Gln Lys Met Glu
    290                 295                 300

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

Glu Glu Phe Ala Ser Ala Ala Lys
                325
```

<210> 3
<211> 924
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Lactobacillus helveticus LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (924)

<400> 3

```
atg tct agg aaa gtg ttt ctt gtg ggt gat ggt gcg gtg ggg tca acg        48
Met Ser Arg Lys Val Phe Leu Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Ser Thr
1               5                   10                  15

ttt gcg aac gat ttg ttg cag aat gcg aaa gtg gac gag ctc gcc atc        96
Phe Ala Asn Asp Leu Leu Gln Asn Ala Lys Val Asp Glu Leu Ala Ile
            20                  25                  30

ttc gag gtc gcc aag gat cgg ccg gta ggc gac gcg atg gac ctg gaa       144
Phe Glu Val Ala Lys Asp Arg Pro Val Gly Asp Ala Met Asp Leu Glu
        35                  40                  45

gat atc acc ccc ttc atg ggc cag acg gat atc cac ccg gca gac tac       192
Asp Ile Thr Pro Phe Met Gly Gln Thr Asp Ile His Pro Ala Asp Tyr
    50                  55                  60

tcg gac gcg aaa gac gcc gac gtg tgc gtc atc gct gcg ggt gtg ccc       240
Ser Asp Ala Lys Asp Ala Asp Val Cys Val Ile Ala Ala Gly Val Pro
65                  70                  75                  80

cgc aag ccc ggt gaa aca cgg ctc gac ctg gtc gcg aaa aac gtc aag       288
Arg Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu Val Ala Lys Asn Val Lys
```

```
                    85                  90                  95

ata ctg aag tcc atc gtg cag ccg gtc gtg gaa tcc ggc ttc aaa ggc   336
Ile Leu Lys Ser Ile Val Gln Pro Val Val Glu Ser Gly Phe Lys Gly
            100                 105                 110

gtg ttc gtt gtg tcg gcg aac ccg gtc gac att ctg acc acc ctc acg   384
Val Phe Val Val Ser Ala Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Thr Leu Thr
        115                 120                 125

cag aag ttg agt ggc ttc ccg aag aac cgc gtg atc gga acc ggc acc   432
Gln Lys Leu Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly Thr Gly Thr
    130                 135                 140

agc ctg gat tcg atg cgt ctg cgc gtg gag ctc gcc aag aaa ctg aac   480
Ser Leu Asp Ser Met Arg Leu Arg Val Glu Leu Ala Lys Lys Leu Asn
145                 150                 155                 160

gtt ccc gtc gct aag gtc aat agc atg gtc ctc gga gaa cac ggc gac   528
Val Pro Val Ala Lys Val Asn Ser Met Val Leu Gly Glu His Gly Asp
                165                 170                 175

acg tcg ttc gag aat ttc gac gag agc acc gtg gac ggc aag ccg ctg   576
Thr Ser Phe Glu Asn Phe Asp Glu Ser Thr Val Asp Gly Lys Pro Leu
            180                 185                 190

cgc gac tac gcc gag atc aac gac gat gtc ctg agc gag atc gaa acc   624
Arg Asp Tyr Ala Glu Ile Asn Asp Asp Val Leu Ser Glu Ile Glu Thr
        195                 200                 205

gac gtc cga aag aaa ggc gag aag atc atc gcc aaa aag ggc gcc acg   672
Asp Val Arg Lys Lys Gly Glu Lys Ile Ile Ala Lys Lys Gly Ala Thr
    210                 215                 220

ttc tat ggg gtc gcc atg atg ctg acc cag atc gta tcc gcc att ctg   720
Phe Tyr Gly Val Ala Met Met Leu Thr Gln Ile Val Ser Ala Ile Leu
225                 230                 235                 240

gac aat cgg tcc atc tgc ctg ccg ctg agc gcc cct atc aac ggc gaa   768
Asp Asn Arg Ser Ile Cys Leu Pro Leu Ser Ala Pro Ile Asn Gly Glu
                245                 250                 255

tat ggc atc aag cat gac ctc tac ctg ggc acc cca gcc gtg atc aac   816
Tyr Gly Ile Lys His Asp Leu Tyr Leu Gly Thr Pro Ala Val Ile Asn
            260                 265                 270

ggg gaa ggg atc gaa cag gtc atc gag act aag ctg tcg gat gcc gaa   864
Gly Glu Gly Ile Glu Gln Val Ile Glu Thr Lys Leu Ser Asp Ala Glu
        275                 280                 285

aag gcc aag atg att aac tcc gca gat aag atg caa gaa gtc ctg ggc   912
Lys Ala Lys Met Ile Asn Ser Ala Asp Lys Met Gln Glu Val Leu Gly
    290                 295                 300

gga atc gag taa                                                  924
Gly Ile Glu
305
```

<210> 4
<211> 307
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 4

```
Met Ser Arg Lys Val Phe Leu Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Ser Thr
1               5                  10                  15

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

Phe Glu Val Ala Lys Asp Arg Pro Val Gly Asp Ala Met Asp Leu Glu
        35                  40                  45

Asp Ile Thr Pro Phe Met Gly Gln Thr Asp Ile His Pro Ala Asp Tyr
    50                  55                  60

Ser Asp Ala Lys Asp Ala Asp Val Cys Val Ile Ala Ala Gly Val Pro
65                  70                  75                  80

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

Ile Leu Lys Ser Ile Val Gln Pro Val Val Glu Ser Gly Phe Lys Gly
            100                 105                 110

Val Phe Val Val Ser Ala Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Thr Leu Thr
        115                 120                 125

Gln Lys Leu Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly Thr Gly Thr
    130                 135                 140

Ser Leu Asp Ser Met Arg Leu Arg Val Glu Leu Ala Lys Lys Leu Asn
145                 150                 155                 160

Val Pro Val Ala Lys Val Asn Ser Met Val Leu Gly Glu His Gly Asp
                165                 170                 175

Thr Ser Phe Glu Asn Phe Asp Glu Ser Thr Val Asp Gly Lys Pro Leu
            180                 185                 190

Arg Asp Tyr Ala Glu Ile Asn Asp Asp Val Leu Ser Glu Ile Glu Thr
        195                 200                 205

Asp Val Arg Lys Lys Gly Glu Lys Ile Ile Ala Lys Lys Gly Ala Thr
    210                 215                 220

Phe Tyr Gly Val Ala Met Met Leu Thr Gln Ile Val Ser Ala Ile Leu
```

```
225                 230                 235                 240

Asp Asn Arg Ser Ile Cys Leu Pro Leu Ser Ala Pro Ile Asn Gly Glu
                245                 250                 255

Tyr Gly Ile Lys His Asp Leu Tyr Leu Gly Thr Pro Ala Val Ile Asn
            260                 265                 270

Gly Glu Gly Ile Glu Gln Val Ile Glu Thr Lys Leu Ser Asp Ala Glu
        275                 280                 285

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

Gly Ile Glu
305
```

<210> 5
<211> 1002
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (variante Bos taurus LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1002)

<400> 5

```
atg gcg act ctc aaa gat cag ctc ata cag aac ttg ctt aaa gaa gaa          48
Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu
1               5                   10                  15

cat gtg ccc cag aac aag atc acc atc gtg ggt gtg ggc gcc gtt ggg          96
His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly
            20                  25                  30

atg gcc tgc gcg atc agc atc ctg atg aaa gat ctc gcc gac gaa gtc         144
Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val
        35                  40                  45

gca ctg gtt gac gtg atg gaa gat aag ctc aag ggt aat gaa atg atg         192
Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Asn Glu Met Met
    50                  55                  60

gac ctc cag cat ggg tca ctg ttc ctg cga acc cca aag att gtc tcc         240
Asp Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser
65                  70                  75                  80

gga aag gac tac aac gtc acc gcc aac agc cgg ctg gtg atc atc acg         288
Gly Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr
                85                  90                  95

gct ggg gca cgc caa cag gaa ggc gag tcg agg ctg aac ctc gtc cag         336
Ala Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln
```

```
                100                 105                 110

cgc aat gtc aac atc ttt aag ttc atc atc ccg aac atc gtg aag tac  384
Arg Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr
        115                 120                 125

tcc ccg aac tgc aag ctg ttg gtt gtg tcg aat ccc gtg gat atc ctg  432
Ser Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu
    130                 135                 140

acg tac gtc gcc tgg aag att tcg ggc ttc ccc aag aac cgg gta atc  480
Thr Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile
145                 150                 155                 160

ggc agc ggc tgt aac ctg gat agc gcg cgt ttc cgc tac ctg atg ggc  528
Gly Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly
                165                 170                 175

gag cgc ttg gga gtc cac ccg ctg agc tgc cac ggg tgg atc ctc ggt  576
Glu Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly
            180                 185                 190

gag cat ggc gac tcc tcg gtg cct gtc tgg tct ggc gtc aat gta gcc  624
Glu His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala
        195                 200                 205

ggc gtc agt ctg aag aat ctg cac ccc gag ctg ggc acc gac gcc gac  672
Gly Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp
    210                 215                 220

aaa gag cag tgg aaa gcc gtc cac aag caa gtg gtg gac tcg gcg tat  720
Lys Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr
225                 230                 235                 240

gaa gtc atc aag ctg aag ggc tat acc agt tgg gcg atc ggc ctg agc  768
Glu Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser
                245                 250                 255

gtg gcc gac ctg gcg gag tcc att atg aag aac ctt cgg cgc gtc cac  816
Val Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His
            260                 265                 270

ccg atc tcg acc atg atc aaa ggc ctc tac ggg atc aaa gaa gat gtg  864
Pro Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val
        275                 280                 285

ttc ctc tcc gtc ccg tgc atc ttg ggc cag aac gga atc tcc gac gtc  912
Phe Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val
    290                 295                 300

gtg aag gtc aca ctg acg cat gaa gaa gaa gcg tgc ctg aag aag tcg  960
Val Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser
305                 310                 315                 320

gcc gac acc ctg tgg ggc atc cag aaa gaa cta cag ttc taa          1002
Ala Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe
                325                 330
```

<210> 6
<211> 333
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 6

```
Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu
1               5                  10                  15

His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly
            20                  25                  30

Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val
        35                  40                  45

Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Asn Glu Met Met
    50                  55                  60

Asp Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser
65                  70                  75                  80

Gly Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr
                85                  90                  95

Ala Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln
            100                 105                 110

Arg Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr
        115                 120                 125

Ser Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu
    130                 135                 140

Thr Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly
                165                 170                 175

Glu Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly
            180                 185                 190

Glu His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala
        195                 200                 205

Gly Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp
    210                 215                 220

Lys Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr
```

```
225                 230                 235                 240

Glu Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser
                245                 250                 255

Val Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His
            260                 265                 270

Pro Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val
        275                 280                 285

Phe Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val
    290                 295                 300

Val Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser
305                 310                 315                 320

Ala Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe
                325                 330
```

<210> 7
<211> 260
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Pediococcus acidilactici LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (258)

<400> 7

```
atg tct aat att caa aat cat caa aaa gtt gtc ctc gtc ggt gac ggt          48
Met Ser Asn Ile Gln Asn His Gln Lys Val Val Leu Val Gly Asp Gly
1               5                   10                  15

gcc gta ggt tct agt tac gca ttc gcg atg gca caa caa gga atc gct          96
Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Met Ala Gln Gln Gly Ile Ala
            20                  25                  30

gaa gaa ttc gtc att gtc gac gtt gtt aag gat cgt aca gtt ggg gac         144
Glu Glu Phe Val Ile Val Asp Val Val Lys Asp Arg Thr Val Gly Asp
        35                  40                  45

gca ttg gac ctt gaa gat gct act cca ttc aca gct cca aag aac atc         192
Ala Leu Asp Leu Glu Asp Ala Thr Pro Phe Thr Ala Pro Lys Asn Ile
    50                  55                  60

tac tct ggt gaa tac tca gac tgc aag gat gct gac tta gtt gtt atc         240
Tyr Ser Gly Glu Tyr Ser Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

aca gct ggc gca cca caa aa                                             260
Thr Ala Gly Ala Pro Gln

                                    85
```

<210> 8
<211> 86
<212> PRT
<213 > Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

```
Met Ser Asn Ile Gln Asn His Gln Lys Val Val Leu Val Gly Asp Gly
1               5                   10                  15

Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Met Ala Gln Gln Gly Ile Ala
            20                  25                  30

Glu Glu Phe Val Ile Val Asp Val Val Lys Asp Arg Thr Val Gly Asp
        35                  40                  45

Ala Leu Asp Leu Glu Asp Ala Thr Pro Phe Thr Ala Pro Lys Asn Ile
    50                  55                  60

Tyr Ser Gly Glu Tyr Ser Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

Thr Ala Gly Ala Pro Gln
                85
```

<210> 9
<211> 963
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Rhizopus oryzae LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (963)

<400> 9

```
atg gta tta cac agc aaa gtc gca ata gtc gga gcg gga gca gtt ggc          48
Met Val Leu His Ser Lys Val Ala Ile Val Gly Ala Gly Ala Val Gly
1               5                   10                  15

gca tct aca gca tac gcg ttg atg ttc aag aac atc tgc acg gaa att          96
Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Leu Met Phe Lys Asn Ile Cys Thr Glu Ile
            20                  25                  30

atc gtg gtc gac gtg aac ccc gat atc gtg cag gcc cag gtg ctg gac         144
Ile Val Val Asp Val Asn Pro Asp Ile Val Gln Ala Gln Val Leu Asp
        35                  40                  45
```

```
ctg gcc gat gcc gct agc atc tcc cac act cct atc agg gcg gga tcg        192
Leu Ala Asp Ala Ala Ser Ile Ser His Thr Pro Ile Arg Ala Gly Ser
    50                  55                  60

gtc gaa gaa gcc ggg cag gcc gat atc gtt gtg ata acc gcg ggt gcc        240
Val Glu Glu Ala Gly Gln Ala Asp Ile Val Val Ile Thr Ala Gly Ala
65                  70                  75                  80

aag cag cgc gag ggc gag ccg cgc acc aag ctg atc gaa cgg aat tac        288
Lys Gln Arg Glu Gly Glu Pro Arg Thr Lys Leu Ile Glu Arg Asn Tyr
                85                  90                  95

cgg gtc ctg cag agc atc atc ggc ggc atg cag ccc atc cgt cca gac        336
Arg Val Leu Gln Ser Ile Ile Gly Gly Met Gln Pro Ile Arg Pro Asp
            100                 105                 110

gcc gtg atc ctc gtg gtc gct aac ccg gtc gac att ctg acc cat atc        384
Ala Val Ile Leu Val Val Ala Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr His Ile
        115                 120                 125

gct aag acc ctc tcc ggc ctg ccg ccc aac caa gtg atc ggc tcg ggt        432
Ala Lys Thr Leu Ser Gly Leu Pro Pro Asn Gln Val Ile Gly Ser Gly
    130                 135                 140

acc tac ctg gac acg acg cgc ctg cgc gtg cac ctc ggc gac gtg ttc        480
Thr Tyr Leu Asp Thr Thr Arg Leu Arg Val His Leu Gly Asp Val Phe
145                 150                 155                 160

gac gtc aac ccg cag agc atc cac gcg ttc gtg ctg ggc gag cac ggc        528
Asp Val Asn Pro Gln Ser Ile His Ala Phe Val Leu Gly Glu His Gly
                165                 170                 175

gac tcg caa atg atc gcg tgg gaa gcc gcg tcg atc ggc ggt cag ccc        576
Asp Ser Gln Met Ile Ala Trp Glu Ala Ala Ser Ile Gly Gly Gln Pro
            180                 185                 190

ctc acg agc ttc ccg gag ttc gcg aag ctg gac aag acc gcc atc tca        624
Leu Thr Ser Phe Pro Glu Phe Ala Lys Leu Asp Lys Thr Ala Ile Ser
        195                 200                 205

aag gcc atc tcc ggc aag gcc atg gaa atc att cgg ttg aaa ggc gcc        672
Lys Ala Ile Ser Gly Lys Ala Met Glu Ile Ile Arg Leu Lys Gly Ala
    210                 215                 220

acc ttc tac ggg atc ggg gcg tgt gcc gcc gat ctg gtg cat acc atc        720
Thr Phe Tyr Gly Ile Gly Ala Cys Ala Ala Asp Leu Val His Thr Ile
225                 230                 235                 240

atg ctg aac cgt aag agt gtc cat ccg gtg agt gtg tac gtc gag aaa        768
Met Leu Asn Arg Lys Ser Val His Pro Val Ser Val Tyr Val Glu Lys
                245                 250                 255

tat ggt gcg acg ttc tcc atg cct gcg aag ctg ggc tgg cgc ggc gta        816
Tyr Gly Ala Thr Phe Ser Met Pro Ala Lys Leu Gly Trp Arg Gly Val
            260                 265                 270

gag caa atc tat gaa gtc ccc ttg acc gaa gaa gaa gaa gcc ctt ctg        864
Glu Gln Ile Tyr Glu Val Pro Leu Thr Glu Glu Glu Glu Ala Leu Leu
        275                 280                 285

gtc aaa tcg gtc gag gcc ctc aag agc gtc gag tat tcc agt acc aag        912
Val Lys Ser Val Glu Ala Leu Lys Ser Val Glu Tyr Ser Ser Thr Lys
    290                 295                 300
```

```
gtg ccc gag aaa aaa gtc cat gcg acc tcg ttt agc aag tcc aat tgc        960
Val Pro Glu Lys Lys Val His Ala Thr Ser Phe Ser Lys Ser Asn Cys
305                 310                 315                 320

taa                                                                    963
```

<210> 10
<211> 320
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400 > 10

```
Met Val Leu His Ser Lys Val Ala Ile Val Gly Ala Gly Ala Val Gly
1               5                   10                  15

Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Leu Met Phe Lys Asn Ile Cys Thr Glu Ile
            20                  25                  30

Ile Val Val Asp Val Asn Pro Asp Ile Val Gln Ala Gln Val Leu Asp
        35                  40                  45

Leu Ala Asp Ala Ala Ser Ile Ser His Thr Pro Ile Arg Ala Gly Ser
    50                  55                  60

Val Glu Glu Ala Gly Gln Ala Asp Ile Val Val Ile Thr Ala Gly Ala
65                  70                  75                  80

Lys Gln Arg Glu Gly Glu Pro Arg Thr Lys Leu Ile Glu Arg Asn Tyr
                85                  90                  95

Arg Val Leu Gln Ser Ile Ile Gly Gly Met Gln Pro Ile Arg Pro Asp
            100                 105                 110

Ala Val Ile Leu Val Val Ala Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr His Ile
        115                 120                 125

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

Thr Tyr Leu Asp Thr Thr Arg Leu Arg Val His Leu Gly Asp Val Phe
145                 150                 155                 160

Asp Val Asn Pro Gln Ser Ile His Ala Phe Val Leu Gly Glu His Gly
                165                 170                 175

Asp Ser Gln Met Ile Ala Trp Glu Ala Ala Ser Ile Gly Gly Gln Pro
```

```
                180                 185                 190

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

Lys Ala Ile Ser Gly Lys Ala Met Glu Ile Ile Arg Leu Lys Gly Ala
    210                 215                 220

Thr Phe Tyr Gly Ile Gly Ala Cys Ala Ala Asp Leu Val His Thr Ile
225                 230                 235                 240

Met Leu Asn Arg Lys Ser Val His Pro Val Ser Val Tyr Val Glu Lys
                245                 250                 255

Tyr Gly Ala Thr Phe Ser Met Pro Ala Lys Leu Gly Trp Arg Gly Val
            260                 265                 270

Glu Gln Ile Tyr Glu Val Pro Leu Thr Glu Glu Glu Glu Ala Leu Leu
        275                 280                 285

Val Lys Ser Val Glu Ala Leu Lys Ser Val Glu Tyr Ser Ser Thr Lys
    290                 295                 300

Val Pro Glu Lys Lys Val His Ala Thr Ser Phe Ser Lys Ser Asn Cys
305                 310                 315                 320
```

<210> 11
<211> 984
<212> ADN
<213 > Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Enterococcus faecalis LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (984)

<400> 11

```
atg acc gcg gct gcc gga aat aag gac cac cag aaa gtg ata ctg gtc          48
Met Thr Ala Ala Ala Gly Asn Lys Asp His Gln Lys Val Ile Leu Val
1               5                   10                  15

ggg gac ggt gcc gtg ggc agc tcg tat gca ttc gcg ttg gtg acc cag          96
Gly Asp Gly Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Leu Val Thr Gln
            20                  25                  30

aac atc gcc caa gaa gtc ggc atc ata gat atc aac gtc ccc aag acc         144
Asn Ile Ala Gln Glu Val Gly Ile Ile Asp Ile Asn Val Pro Lys Thr
        35                  40                  45

gag ggc gac gcc ctg gat ctc tcc cac gcc ctg gcc ttc acc agc ccc         192
Glu Gly Asp Ala Leu Asp Leu Ser His Ala Leu Ala Phe Thr Ser Pro
```

```
    50                  55                  60

aaa aag atc tac gcg gcc acc tac gac gat tgc cat gac gcg gat ctc        240
Lys Lys Ile Tyr Ala Ala Thr Tyr Asp Asp Cys His Asp Ala Asp Leu
65                  70                  75                  80

gtt gtc ctg acc gcg ggt gcg ccg cag aag cct ggc gaa acg cga ctg        288
Val Val Leu Thr Ala Gly Ala Pro Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu
                85                  90                  95

gat ctc gtc cat aag aac ttg aag atc aac aaa gaa atc gtc acc acc        336
Asp Leu Val His Lys Asn Leu Lys Ile Asn Lys Glu Ile Val Thr Thr
            100                 105                 110

atc gtg gac tcg ggc ttc aac ggc atc ttc ctg gtg gcg gcc aac cca        384
Ile Val Asp Ser Gly Phe Asn Gly Ile Phe Leu Val Ala Ala Asn Pro
        115                 120                 125

gta gac atc ctg acc tac tca acg tgg aag ttt agc ggg ttc ccg aag        432
Val Asp Ile Leu Thr Tyr Ser Thr Trp Lys Phe Ser Gly Phe Pro Lys
    130                 135                 140

gaa cgg gtc atc ggg tcc ggc aca tcg ctt gac tcc gcg cgg ttc cgc        480
Glu Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Ser Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg
145                 150                 155                 160

cag gcc att gcg gag ctg gtc gac gtg gac gcc cgc aac gtg cac gcg        528
Gln Ala Ile Ala Glu Leu Val Asp Val Asp Ala Arg Asn Val His Ala
                165                 170                 175

tat atc ctc ggc gag cat ggc gac acc gag ttt ccc gtt tgg tcc cac        576
Tyr Ile Leu Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Phe Pro Val Trp Ser His
            180                 185                 190

gcc aat gtg gcg gga ttg cag atc tac gag tgg gta aag aat aat ccc        624
Ala Asn Val Ala Gly Leu Gln Ile Tyr Glu Trp Val Lys Asn Asn Pro
        195                 200                 205

gat gtc gac gaa gaa gcc atg gtc aac ctc ttc ttc aac gtg cgc gat        672
Asp Val Asp Glu Glu Ala Met Val Asn Leu Phe Phe Asn Val Arg Asp
    210                 215                 220

gca gct tat acg atc atc gag aaa aag gga gcc acg ttc tat ggc atc        720
Ala Ala Tyr Thr Ile Ile Glu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile
225                 230                 235                 240

gcc gtg gcg ctg gcc cgg atc acg aag gcc atc ctg aac gac gag aat        768
Ala Val Ala Leu Ala Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu Asn Asp Glu Asn
                245                 250                 255

tcc gtg ctc ccg ctg agt gtc tac ctg gaa ggg gag tac ggt cag aac        816
Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Tyr Leu Glu Gly Glu Tyr Gly Gln Asn
            260                 265                 270

gac atc tac atc ggc gca ccg gcc atc att aac cgt cag ggc gtc aaa        864
Asp Ile Tyr Ile Gly Ala Pro Ala Ile Ile Asn Arg Gln Gly Val Lys
        275                 280                 285

caa gtg att gaa atc ccg ctg acc gac gcc gag caa gag aag atg gaa        912
Gln Val Ile Glu Ile Pro Leu Thr Asp Ala Glu Gln Glu Lys Met Glu
    290                 295                 300

gcc agc gct tcg gcg ctg aaa gaa gtc atc gag act gcc ttc gcc aag        960
```

```
Ala Ser Ala Ser Ala Leu Lys Glu Val Ile Glu Thr Ala Phe Ala Lys
305                 310                 315                 320

ttc gag gcc gaa gaa gcg aag taa                                 984
Phe Glu Ala Glu Glu Ala Lys
                325
```

<210> 12
<211> 327
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 12

```
Met Thr Ala Ala Ala Gly Asn Lys Asp His Gln Lys Val Ile Leu Val
1               5                  10                  15

Gly Asp Gly Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Leu Val Thr Gln
            20                  25                  30

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

Glu Gly Asp Ala Leu Asp Leu Ser His Ala Leu Ala Phe Thr Ser Pro
    50                  55                  60

Lys Lys Ile Tyr Ala Ala Thr Tyr Asp Asp Cys His Asp Ala Asp Leu
65                  70                  75                  80

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

Asp Leu Val His Lys Asn Leu Lys Ile Asn Lys Glu Ile Val Thr Thr
            100                 105                 110

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

Val Asp Ile Leu Thr Tyr Ser Thr Trp Lys Phe Ser Gly Phe Pro Lys
    130                 135                 140

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

Gln Ala Ile Ala Glu Leu Val Asp Val Asp Ala Arg Asn Val His Ala
                165                 170                 175

Tyr Ile Leu Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Phe Pro Val Trp Ser His
```

```
                180                 185                 190

Ala Asn Val Ala Gly Leu Gln Ile Tyr Glu Trp Val Lys Asn Asn Pro
        195                 200                 205

Asp Val Asp Glu Glu Ala Met Val Asn Leu Phe Phe Asn Val Arg Asp
    210                 215                 220

Ala Ala Tyr Thr Ile Ile Glu Lys Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile
225                 230                 235                 240

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

Ser Val Leu Pro Leu Ser Val Tyr Leu Glu Gly Glu Tyr Gly Gln Asn
            260                 265                 270

Asp Ile Tyr Ile Gly Ala Pro Ala Ile Ile Asn Arg Gln Gly Val Lys
        275                 280                 285

Gln Val Ile Glu Ile Pro Leu Thr Asp Ala Glu Gln Glu Lys Met Glu
    290                 295                 300

Ala Ser Ala Ser Ala Leu Lys Glu Val Ile Glu Thr Ala Phe Ala Lys
305                 310                 315                 320

Phe Glu Ala Glu Glu Ala Lys
                325
```

<210> 13
<211> 939
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Lactobacillus casei LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (939)

<400> 13

```
atg cgc aat aac ggg aac atc att ctt ata ggt gac ggt gcc atc ggt          48
Met Arg Asn Asn Gly Asn Ile Ile Leu Ile Gly Asp Gly Ala Ile Gly
1               5                   10                  15

agt tct tat gcc ttc aac tgc ctg acc acc ggc gtc ggc cag tcc ctg          96
Ser Ser Tyr Ala Phe Asn Cys Leu Thr Thr Gly Val Gly Gln Ser Leu
            20                  25                  30

ggg ata atc gac gtg aac gag aag cgc gta cag ggc gac gtc gag gac         144
Gly Ile Ile Asp Val Asn Glu Lys Arg Val Gln Gly Asp Val Glu Asp
```

```
        35                  40                  45

ttg agc gac gcc ctg ccc tac act tcg cag aag aac atc tac gct gcg        192
Leu Ser Asp Ala Leu Pro Tyr Thr Ser Gln Lys Asn Ile Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

tcc tac gaa gat tgc aaa tat gcc gac att atc gtg atc acg gca ggc        240
Ser Tyr Glu Asp Cys Lys Tyr Ala Asp Ile Ile Val Ile Thr Ala Gly
65                  70                  75                  80

atc gcc cag aag ccc gga cag acc cgg ttg cag ctc ctg gca atc aac        288
Ile Ala Gln Lys Pro Gly Gln Thr Arg Leu Gln Leu Leu Ala Ile Asn
                85                  90                  95

gcg aag att atg aaa gaa atc acc cat aac atc atg gcc tcg ggt ttc        336
Ala Lys Ile Met Lys Glu Ile Thr His Asn Ile Met Ala Ser Gly Phe
            100                 105                 110

aat ggc ttc atc ctg gtc gcc agc aac ccg gtg gac gtc ttg gcg gag        384
Asn Gly Phe Ile Leu Val Ala Ser Asn Pro Val Asp Val Leu Ala Glu
        115                 120                 125

ctg gtg ctc cag gaa tcg ggc ctg ccc cgg aac caa gtc ctg ggc tcg        432
Leu Val Leu Gln Glu Ser Gly Leu Pro Arg Asn Gln Val Leu Gly Ser
    130                 135                 140

ggc acc gcc ctc gac tcg gcg cgt ctg cgg agc gag atc ggg ctg cgc        480
Gly Thr Ala Leu Asp Ser Ala Arg Leu Arg Ser Glu Ile Gly Leu Arg
145                 150                 155                 160

tac aat gtc gac gca cgg atc gtc cac ggg tac atc atg ggc gag cac        528
Tyr Asn Val Asp Ala Arg Ile Val His Gly Tyr Ile Met Gly Glu His
                165                 170                 175

ggc gat tcc gag ttc ccg gtg tgg gac tac acc aat atc ggc ggc aag        576
Gly Asp Ser Glu Phe Pro Val Trp Asp Tyr Thr Asn Ile Gly Gly Lys
            180                 185                 190

ccg atc ctc gat tgg atc ccg aag gac cgc cag gac aaa gat ctc cct        624
Pro Ile Leu Asp Trp Ile Pro Lys Asp Arg Gln Asp Lys Asp Leu Pro
        195                 200                 205

gat atc tcc gaa agg gtt aag aca gcg gcc tat gga att atc gag aag        672
Asp Ile Ser Glu Arg Val Lys Thr Ala Ala Tyr Gly Ile Ile Glu Lys
    210                 215                 220

aaa ggg gcc acg ttt tac ggc atc gcc gcg tcc ctg acc cgt ttg acg        720
Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile Ala Ala Ser Leu Thr Arg Leu Thr
225                 230                 235                 240

tca gcg ttc ctg aac gac gat cga gcg gcc ttc gcc atg agc gtg cat        768
Ser Ala Phe Leu Asn Asp Asp Arg Ala Ala Phe Ala Met Ser Val His
                245                 250                 255

ctg gaa ggc gaa tat ggc ctt agc gga gtg tcg atc ggc gtc ccg gtg        816
Leu Glu Gly Glu Tyr Gly Leu Ser Gly Val Ser Ile Gly Val Pro Val
            260                 265                 270

atc ctg ggc gcc aac ggc ctg gag cgc atc atc gaa ctc gac ctg aat        864
Ile Leu Gly Ala Asn Gly Leu Glu Arg Ile Ile Glu Leu Asp Leu Asn
        275                 280                 285

cca gag gat cac aag cgc ctg gcc gac agc gct gcg atc ctc aag gaa        912
```

```
Pro Glu Asp His Lys Arg Leu Ala Asp Ser Ala Ala Ile Leu Lys Glu
    290                 295                 300

aac ctg aaa aag gcg caa gaa gcc taa                                939
Asn Leu Lys Lys Ala Gln Glu Ala
305                 310
```

<210> 14
<211> 312
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 14

```
Met Arg Asn Asn Gly Asn Ile Ile Leu Ile Gly Asp Gly Ala Ile Gly
1               5                  10                  15

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

Gly Ile Ile Asp Val Asn Glu Lys Arg Val Gln Gly Asp Val Glu Asp
        35                  40                  45

Leu Ser Asp Ala Leu Pro Tyr Thr Ser Gln Lys Asn Ile Tyr Ala Ala
    50                  55                  60

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

Ile Ala Gln Lys Pro Gly Gln Thr Arg Leu Gln Leu Leu Ala Ile Asn
                85                  90                  95

Ala Lys Ile Met Lys Glu Ile Thr His Asn Ile Met Ala Ser Gly Phe
            100                 105                 110

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

Leu Val Leu Gln Glu Ser Gly Leu Pro Arg Asn Gln Val Leu Gly Ser
    130                 135                 140

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

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

Gly Asp Ser Glu Phe Pro Val Trp Asp Tyr Thr Asn Ile Gly Gly Lys
```

```
                180                 185                 190

Pro Ile Leu Asp Trp Ile Pro Lys Asp Arg Gln Asp Lys Asp Leu Pro
        195                 200                 205

Asp Ile Ser Glu Arg Val Lys Thr Ala Ala Tyr Gly Ile Ile Glu Lys
    210                 215                 220

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

Ser Ala Phe Leu Asn Asp Asp Arg Ala Ala Phe Ala Met Ser Val His
                245                 250                 255

Leu Glu Gly Glu Tyr Gly Leu Ser Gly Val Ser Ile Gly Val Pro Val
            260                 265                 270

Ile Leu Gly Ala Asn Gly Leu Glu Arg Ile Ile Glu Leu Asp Leu Asn
        275                 280                 285

Pro Glu Asp His Lys Arg Leu Ala Asp Ser Ala Ala Ile Leu Lys Glu
    290                 295                 300

Asn Leu Lys Lys Ala Gln Glu Ala
305                 310
```

<210> 15
<211> 957
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Bacillus megaterium LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (957)

<400> 15

```
atg aaa acg cag ttc acc ccc aag aca cga aaa gta gca gtt ata ggc          48
Met Lys Thr Gln Phe Thr Pro Lys Thr Arg Lys Val Ala Val Ile Gly
1               5                   10                  15

acc ggc ttc gtg ggc tcc tcc tac gcg ttc tcg atg gtc aat cag ggg          96
Thr Gly Phe Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Met Val Asn Gln Gly
            20                  25                  30

atc gcg aac gaa ctg gtc ctg atc gac atg aac aag gaa aag gcc gag         144
Ile Ala Asn Glu Leu Val Leu Ile Asp Met Asn Lys Glu Lys Ala Glu
        35                  40                  45

ggc gaa gcc cgg gat atc aac cat ggc atg cct ttt gcc acc ccg atg         192
Gly Glu Ala Arg Asp Ile Asn His Gly Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
```

```
    50                  55                  60

aag att tgg gcc gga gat tac aag gac tgc gcg gac gcg gac ctg gcc        240
Lys Ile Trp Ala Gly Asp Tyr Lys Asp Cys Ala Asp Ala Asp Leu Ala
65                  70                  75                  80

gtg atc acc gcg ggt gcg aat cag gct ccg ggt gaa acc cgg ctg gac        288
Val Ile Thr Ala Gly Ala Asn Gln Ala Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp
                85                  90                  95

ctc gtc gag aaa aat gtc aag atc ttc gag tgc atc gtt aaa gac atc        336
Leu Val Glu Lys Asn Val Lys Ile Phe Glu Cys Ile Val Lys Asp Ile
            100                 105                 110

atg aac tcg ggg ttc gac ggc atc atc ctg gtc gcc acc aac ccg gtc        384
Met Asn Ser Gly Phe Asp Gly Ile Ile Leu Val Ala Thr Asn Pro Val
        115                 120                 125

gat atc ctg gcc cat gtc acg caa aag gtg agc ggc ctg ccc aac gag        432
Asp Ile Leu Ala His Val Thr Gln Lys Val Ser Gly Leu Pro Asn Glu
    130                 135                 140

cgg gtc att ggt tcg ggc acc atc ttg gac acg gcc cgt ttc cgc tat        480
Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Ile Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Tyr
145                 150                 155                 160

ctc ttg agc gat tac ttc gaa gtg gat tcc cgc aac gtc cac gcg tac        528
Leu Leu Ser Asp Tyr Phe Glu Val Asp Ser Arg Asn Val His Ala Tyr
                165                 170                 175

atc atg ggc gag cac ggg gac acg gaa ttc ccg gtc tgg tcg cac gcc        576
Ile Met Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Phe Pro Val Trp Ser His Ala
            180                 185                 190

cag atc ggc gga gtg aag ctg gag cac ttt atc aat acg gca gct atc        624
Gln Ile Gly Gly Val Lys Leu Glu His Phe Ile Asn Thr Ala Ala Ile
        195                 200                 205

gaa aaa gag cca gac atg cag cac ctg ttc gag cag acc cgg gac gcg        672
Glu Lys Glu Pro Asp Met Gln His Leu Phe Glu Gln Thr Arg Asp Ala
    210                 215                 220

gcc tac cac atc att aat cgc aag ggc gcg acg tac tat gga atc gcc        720
Ala Tyr His Ile Ile Asn Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala
225                 230                 235                 240

atg ggg ctg gtc agg atc acc aag gcc atc ctt gac gat gag aac agc        768
Met Gly Leu Val Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu Asp Asp Glu Asn Ser
                245                 250                 255

atc ctc acc gtg agt gcg ctg ttg gaa ggc cag tat ggc ata tca gac        816
Ile Leu Thr Val Ser Ala Leu Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Ile Ser Asp
            260                 265                 270

gtg tat atc ggt gtg ccc gcc att atc aac aag aac ggc gtg cgg cag        864
Val Tyr Ile Gly Val Pro Ala Ile Ile Asn Lys Asn Gly Val Arg Gln
        275                 280                 285

atc atc gag ctg aac ctg acc ccg cat gaa caa cag cag ctc gaa cat        912
Ile Ile Glu Leu Asn Leu Thr Pro His Glu Gln Gln Gln Leu Glu His
    290                 295                 300

agc gcc tcc atc ctc aag cag act cgc gat cgc gcc ttc gtg taa            957
```

Ser Ala Ser Ile Leu Lys Gln Thr Arg Asp Arg Ala Phe Val
305 310 315

<210> 16
<211> 318
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
< 223> Construcción sintética

<400> 16

```
Met Lys Thr Gln Phe Thr Pro Lys Thr Arg Lys Val Ala Val Ile Gly
1               5                  10                  15

Thr Gly Phe Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Met Val Asn Gln Gly
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Glu Leu Val Leu Ile Asp Met Asn Lys Glu Lys Ala Glu
        35                  40                  45

Gly Glu Ala Arg Asp Ile Asn His Gly Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
    50                  55                  60

Lys Ile Trp Ala Gly Asp Tyr Lys Asp Cys Ala Asp Ala Asp Leu Ala
65                  70                  75                  80

Val Ile Thr Ala Gly Ala Asn Gln Ala Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp
                85                  90                  95

Leu Val Glu Lys Asn Val Lys Ile Phe Glu Cys Ile Val Lys Asp Ile
            100                 105                 110

Met Asn Ser Gly Phe Asp Gly Ile Ile Leu Val Ala Thr Asn Pro Val
        115                 120                 125

Asp Ile Leu Ala His Val Thr Gln Lys Val Ser Gly Leu Pro Asn Glu
    130                 135                 140

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

Leu Leu Ser Asp Tyr Phe Glu Val Asp Ser Arg Asn Val His Ala Tyr
                165                 170                 175

Ile Met Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Phe Pro Val Trp Ser His Ala
            180                 185                 190

Gln Ile Gly Gly Val Lys Leu Glu His Phe Ile Asn Thr Ala Ala Ile
```

```
                195                 200                 205

Glu Lys Glu Pro Asp Met Gln His Leu Phe Glu Gln Thr Arg Asp Ala
    210                 215                 220

Ala Tyr His Ile Ile Asn Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala
225                 230                 235                 240

Met Gly Leu Val Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu Asp Asp Glu Asn Ser
                245                 250                 255

Ile Leu Thr Val Ser Ala Leu Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Ile Ser Asp
            260                 265                 270

Val Tyr Ile Gly Val Pro Ala Ile Ile Asn Lys Asn Gly Val Arg Gln
        275                 280                 285

Ile Ile Glu Leu Asn Leu Thr Pro His Glu Gln Gln Leu Glu His
    290                 295                 300

Ser Ala Ser Ile Leu Lys Gln Thr Arg Asp Arg Ala Phe Val
305                 310                 315
```

<210> 17
<211> 957
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Taeniopygia guttata LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (957)

<400> 17

```
atg aaa acg cag ttc acc ccc aag aca cga aaa gta gca gtt ata ggc          48
Met Lys Thr Gln Phe Thr Pro Lys Thr Arg Lys Val Ala Val Ile Gly
1               5                  10                  15

acc ggc ttc gtg ggc tcc tcc tac gcg ttc tcg atg gtc aat cag ggg          96
Thr Gly Phe Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Met Val Asn Gln Gly
            20                  25                  30

atc gcg aac gaa ctg gtc ctg atc gac atg aac aag gaa aag gcc gag         144
Ile Ala Asn Glu Leu Val Leu Ile Asp Met Asn Lys Glu Lys Ala Glu
        35                  40                  45

ggc gaa gcc cgg gat atc aac cat ggc atg cct ttt gcc acc ccg atg         192
Gly Glu Ala Arg Asp Ile Asn His Gly Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
    50                  55                  60

aag att tgg gcc gga gat tac aag gac tgc gcg gac gcg gac ctg gcc         240
Lys Ile Trp Ala Gly Asp Tyr Lys Asp Cys Ala Asp Ala Asp Leu Ala
```

```
65                  70                  75                  80

gtg atc acc gcg ggt gcg aat cag gct ccg ggt gaa acc cgg ctg gac  288
Val Ile Thr Ala Gly Ala Asn Gln Ala Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp
                85                  90                  95

ctc gtc gag aaa aat gtc aag atc ttc gag tgc atc gtt aaa gac atc  336
Leu Val Glu Lys Asn Val Lys Ile Phe Glu Cys Ile Val Lys Asp Ile
            100                 105                 110

atg aac tcg ggg ttc gac ggc atc atc ctg gtc gcc acc aac ccg gtc  384
Met Asn Ser Gly Phe Asp Gly Ile Ile Leu Val Ala Thr Asn Pro Val
        115                 120                 125

gat atc ctg gcc cat gtc acg caa aag gtg agc ggc ctg ccc aac gag  432
Asp Ile Leu Ala His Val Thr Gln Lys Val Ser Gly Leu Pro Asn Glu
    130                 135                 140

cgg gtc att ggt tcg ggc acc atc ttg gac acg gcc cgt ttc cgc tat  480
Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Ile Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Tyr
145                 150                 155                 160

ctc ttg agc gat tac ttc gaa gtg gat tcc cgc aac gtc cac gcg tac  528
Leu Leu Ser Asp Tyr Phe Glu Val Asp Ser Arg Asn Val His Ala Tyr
                165                 170                 175

atc atg ggc gag cac ggg gac acg gaa ttc ccg gtc tgg tcg cac gcc  576
Ile Met Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Phe Pro Val Trp Ser His Ala
            180                 185                 190

cag atc ggc gga gtg aag ctg gag cac ttt atc aat acg gca gct atc  624
Gln Ile Gly Gly Val Lys Leu Glu His Phe Ile Asn Thr Ala Ala Ile
        195                 200                 205

gaa aaa gag cca gac atg cag cac ctg ttc gag cag acc cgg gac gcg  672
Glu Lys Glu Pro Asp Met Gln His Leu Phe Glu Gln Thr Arg Asp Ala
    210                 215                 220

gcc tac cac atc att aat cgc aag ggc gcg acg tac tat gga atc gcc  720
Ala Tyr His Ile Ile Asn Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala
225                 230                 235                 240

atg ggg ctg gtc agg atc acc aag gcc atc ctt gac gat gag aac agc  768
Met Gly Leu Val Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu Asp Asp Glu Asn Ser
                245                 250                 255

atc ctc acc gtg agt gcg ctg ttg gaa ggc cag tat ggc ata tca gac  816
Ile Leu Thr Val Ser Ala Leu Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Ile Ser Asp
            260                 265                 270

gtg tat atc ggt gtg ccc gcc att atc aac aag aac ggc gtg cgg cag  864
Val Tyr Ile Gly Val Pro Ala Ile Ile Asn Lys Asn Gly Val Arg Gln
        275                 280                 285

atc atc gag ctg aac ctg acc ccg cat gaa caa cag cag ctc gaa cat  912
Ile Ile Glu Leu Asn Leu Thr Pro His Glu Gln Gln Gln Leu Glu His
    290                 295                 300

agc gcc tcc atc ctc aag cag act cgc gat cgc gcc ttc gtg taa      957
Ser Ala Ser Ile Leu Lys Gln Thr Arg Asp Arg Ala Phe Val
305                 310                 315
```

<210> 18
<211> 318
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 18

```
Met Lys Thr Gln Phe Thr Pro Lys Thr Arg Lys Val Ala Val Ile Gly
1               5                  10                  15

Thr Gly Phe Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Met Val Asn Gln Gly
            20                  25                  30

Ile Ala Asn Glu Leu Val Leu Ile Asp Met Asn Lys Glu Lys Ala Glu
        35                  40                  45

Gly Glu Ala Arg Asp Ile Asn His Gly Met Pro Phe Ala Thr Pro Met
    50                  55                  60

Lys Ile Trp Ala Gly Asp Tyr Lys Asp Cys Ala Asp Ala Asp Leu Ala
65                  70                  75                  80

Val Ile Thr Ala Gly Ala Asn Gln Ala Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp
                85                  90                  95

Leu Val Glu Lys Asn Val Lys Ile Phe Glu Cys Ile Val Lys Asp Ile
            100                 105                 110

Met Asn Ser Gly Phe Asp Gly Ile Ile Leu Val Ala Thr Asn Pro Val
        115                 120                 125

Asp Ile Leu Ala His Val Thr Gln Lys Val Ser Gly Leu Pro Asn Glu
    130                 135                 140

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

Leu Leu Ser Asp Tyr Phe Glu Val Asp Ser Arg Asn Val His Ala Tyr
                165                 170                 175

Ile Met Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Phe Pro Val Trp Ser His Ala
            180                 185                 190

Gln Ile Gly Gly Val Lys Leu Glu His Phe Ile Asn Thr Ala Ala Ile
        195                 200                 205

Glu Lys Glu Pro Asp Met Gln His Leu Phe Glu Gln Thr Arg Asp Ala
```

```
            210                 215                 220

Ala Tyr His Ile Ile Asn Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala
225                 230                 235                 240

Met Gly Leu Val Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu Asp Asp Glu Asn Ser
                245                 250                 255

Ile Leu Thr Val Ser Ala Leu Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Ile Ser Asp
            260                 265                 270

Val Tyr Ile Gly Val Pro Ala Ile Ile Asn Lys Asn Gly Val Arg Gln
        275                 280                 285

Ile Ile Glu Leu Asn Leu Thr Pro His Glu Gln Gln Gln Leu Glu His
    290                 295                 300

Ser Ala Ser Ile Leu Lys Gln Thr Arg Asp Arg Ala Phe Val
305                 310                 315
```

<210> 19
<211> 963
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Lactobacillus plantarum LDH)

< 220>
<221> CDS
<222> (1).. (963)

<400> 19

```
atg tcg tcg atg cct aac cat cag aaa gtc gtc ctg gtg ggc gac gga          48
Met Ser Ser Met Pro Asn His Gln Lys Val Val Leu Val Gly Asp Gly
1               5                   10                  15

gcg gtc ggc agc tca tac gcc ttc gcg atg gcg caa cag gga atc gcg          96
Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Met Ala Gln Gln Gly Ile Ala
            20                  25                  30

gaa gaa ttc gtc atc gtc gac gtg gtg aag gac cgc acc aag ggc gac         144
Glu Glu Phe Val Ile Val Asp Val Val Lys Asp Arg Thr Lys Gly Asp
        35                  40                  45

gcc ttg gac ctc gaa gat gca cag gcc ttc acg gcc ccg aag aaa atc         192
Ala Leu Asp Leu Glu Asp Ala Gln Ala Phe Thr Ala Pro Lys Lys Ile
    50                  55                  60

tac agc ggc gag tat agc gac tgc aaa gac gcg gac ctc gtg gtc ata         240
Tyr Ser Gly Glu Tyr Ser Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

acc gcg gga gcg cca cag aag ccc gga gaa tcg agg ctg gac ctt gtc         288
Thr Ala Gly Ala Pro Gln Lys Pro Gly Glu Ser Arg Leu Asp Leu Val
```

```
                    85                  90                  95

aac aaa aac ttg aac atc ctg tcc tcg atc gtg aag ccc gtg gta gac   336
Asn Lys Asn Leu Asn Ile Leu Ser Ser Ile Val Lys Pro Val Val Asp
            100                 105                 110

tcc ggg ttc gac ggc atc ttc ctg gtg gcc gcc aac ccc gtc gac atc   384
Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ala Asn Pro Val Asp Ile
        115                 120                 125

ctc acc tat gcg acc tgg aag ttc agc ggg ttt ccg aag gac cgg gtc   432
Leu Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Phe Pro Lys Asp Arg Val
    130                 135                 140

att ggc agt ggg acg tcg ctg gat agc tcg cgt ctg cga gtt gct ctg   480
Ile Gly Ser Gly Thr Ser Leu Asp Ser Ser Arg Leu Arg Val Ala Leu
145                 150                 155                 160

ggg aag caa ttc aac gtg gat ccg cgc tct gtg gat gcg tat atc atg   528
Gly Lys Gln Phe Asn Val Asp Pro Arg Ser Val Asp Ala Tyr Ile Met
                165                 170                 175

ggc gag cac ggc gat agt gag ttc gcc gca tat tcc acc gcc acg atc   576
Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Phe Ala Ala Tyr Ser Thr Ala Thr Ile
            180                 185                 190

ggc act cgg ccc gtg cgc gac gtt gcg aag gaa cag ggc gta tcc gac   624
Gly Thr Arg Pro Val Arg Asp Val Ala Lys Glu Gln Gly Val Ser Asp
        195                 200                 205

gag gac ctg gcc aag ctg gaa gat ggc gtc cgc aac aag gcc tac gac   672
Glu Asp Leu Ala Lys Leu Glu Asp Gly Val Arg Asn Lys Ala Tyr Asp
    210                 215                 220

atc atc aat ctc aag ggc gcg acc ttc tac ggt att ggt acc gcc ctg   720
Ile Ile Asn Leu Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile Gly Thr Ala Leu
225                 230                 235                 240

atg cgg atc tcc aag gcc atc ctg cgc gat gag aac gcc gtg ttg ccg   768
Met Arg Ile Ser Lys Ala Ile Leu Arg Asp Glu Asn Ala Val Leu Pro
                245                 250                 255

gtg ggg gct tac atg gat ggc cag tac ggc ctg aac gat atc tac atc   816
Val Gly Ala Tyr Met Asp Gly Gln Tyr Gly Leu Asn Asp Ile Tyr Ile
            260                 265                 270

ggc aca ccg gcc gtc atc ggt ggc acc ggt ctg aag cag atc atc gag   864
Gly Thr Pro Ala Val Ile Gly Gly Thr Gly Leu Lys Gln Ile Ile Glu
        275                 280                 285

agc ccg ctg tcc gcc gac gag ctg aaa aag atg cag gac agc gcc gca   912
Ser Pro Leu Ser Ala Asp Glu Leu Lys Lys Met Gln Asp Ser Ala Ala
    290                 295                 300

acg ctc aaa aaa gtc ctc aat gat ggc ctg gcc gaa ctg gag aat aag   960
Thr Leu Lys Lys Val Leu Asn Asp Gly Leu Ala Glu Leu Glu Asn Lys
305                 310                 315                 320

taa                                                               963
```

<210> 20

<211> 320
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 20

```
Met Ser Ser Met Pro Asn His Gln Lys Val Val Leu Val Gly Asp Gly
1               5                  10                  15

Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Met Ala Gln Gln Gly Ile Ala
            20                  25                  30

Glu Glu Phe Val Ile Val Asp Val Val Lys Asp Arg Thr Lys Gly Asp
        35                  40                  45

Ala Leu Asp Leu Glu Asp Ala Gln Ala Phe Thr Ala Pro Lys Lys Ile
    50                  55                  60

Tyr Ser Gly Glu Tyr Ser Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

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

Asn Lys Asn Leu Asn Ile Leu Ser Ser Ile Val Lys Pro Val Val Asp
            100                 105                 110

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

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

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

Gly Lys Gln Phe Asn Val Asp Pro Arg Ser Val Asp Ala Tyr Ile Met
                165                 170                 175

Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Phe Ala Ala Tyr Ser Thr Ala Thr Ile
            180                 185                 190

Gly Thr Arg Pro Val Arg Asp Val Ala Lys Glu Gln Gly Val Ser Asp
        195                 200                 205

Glu Asp Leu Ala Lys Leu Glu Asp Gly Val Arg Asn Lys Ala Tyr Asp
    210                 215                 220
```

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

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

Val Gly Ala Tyr Met Asp Gly Gln Tyr Gly Leu Asn Asp Ile Tyr Ile
            260                 265                 270

Gly Thr Pro Ala Val Ile Gly Gly Thr Gly Leu Lys Gln Ile Ile Glu
        275                 280                 285

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

Thr Leu Lys Lys Val Leu Asn Asp Gly Leu Ala Glu Leu Glu Asn Lys
305                 310                 315                 320
```

<210> 21
<211> 963
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Lactobacillus acidophilus LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (963)

<400> 21

```
atg tcg tcg atg cct aac cat cag aaa gtc gtc ctg gtg ggc gac gga          48
Met Ser Ser Met Pro Asn His Gln Lys Val Val Leu Val Gly Asp Gly
1               5                   10                  15

gcg gtc ggc agc tca tac gcc ttc gcg atg gcg caa cag gga atc gcg          96
Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Met Ala Gln Gln Gly Ile Ala
            20                  25                  30

gaa gaa ttc gtc atc gtc gac gtg gtg aag gac cgc acc aag ggc gac         144
Glu Glu Phe Val Ile Val Asp Val Val Lys Asp Arg Thr Lys Gly Asp
        35                  40                  45

gcc ttg gac ctc gaa gat gca cag gcc ttc acg gcc ccg aag aaa atc         192
Ala Leu Asp Leu Glu Asp Ala Gln Ala Phe Thr Ala Pro Lys Lys Ile
    50                  55                  60

tac agc ggc gag tat agc gac tgc aaa gac gcg gac ctc gtg gtc ata         240
Tyr Ser Gly Glu Tyr Ser Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

acc gcg gga gcg cca cag aag ccc gga gaa tcg agg ctg gac ctt gtc         288
Thr Ala Gly Ala Pro Gln Lys Pro Gly Glu Ser Arg Leu Asp Leu Val
                85                  90                  95
```

```
aac aaa aac ttg aac atc ctg tcc tcg atc gtg aag ccc gtg gta gac        336
Asn Lys Asn Leu Asn Ile Leu Ser Ser Ile Val Lys Pro Val Val Asp
            100                 105                 110

tcc ggg ttc gac ggc atc ttc ctg gtg gcc gcc aac ccc gtc gac atc        384
Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ala Asn Pro Val Asp Ile
        115                 120                 125

ctc acc tat gcg acc tgg aag ttc agc ggg ttt ccg aag gac cgg gtc        432
Leu Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Phe Pro Lys Asp Arg Val
    130                 135                 140

att ggc agt ggg acg tcg ctg gat agc tcg cgt ctg cga gtt gct ctg        480
Ile Gly Ser Gly Thr Ser Leu Asp Ser Ser Arg Leu Arg Val Ala Leu
145                 150                 155                 160

ggg aag caa ttc aac gtg gat ccg cgc tct gtg gat gcg tat atc atg        528
Gly Lys Gln Phe Asn Val Asp Pro Arg Ser Val Asp Ala Tyr Ile Met
                165                 170                 175

ggc gag cac ggc gat agt gag ttc gcc gca tat tcc acc gcc acg atc        576
Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Phe Ala Ala Tyr Ser Thr Ala Thr Ile
            180                 185                 190

ggc act cgg ccc gtg cgc gac gtt gcg aag gaa cag ggc gta tcc gac        624
Gly Thr Arg Pro Val Arg Asp Val Ala Lys Glu Gln Gly Val Ser Asp
        195                 200                 205

gag gac ctg gcc aag ctg gaa gat ggc gtc cgc aac aag gcc tac gac        672
Glu Asp Leu Ala Lys Leu Glu Asp Gly Val Arg Asn Lys Ala Tyr Asp
    210                 215                 220

atc atc aat ctc aag ggc gcg acc ttc tac ggt att ggt acc gcc ctg        720
Ile Ile Asn Leu Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile Gly Thr Ala Leu
225                 230                 235                 240

atg cgg atc tcc aag gcc atc ctg cgc gat gag aac gcc gtg ttg ccg        768
Met Arg Ile Ser Lys Ala Ile Leu Arg Asp Glu Asn Ala Val Leu Pro
                245                 250                 255

gtg ggg gct tac atg gat ggc cag tac ggc ctg aac gat atc tac atc        816
Val Gly Ala Tyr Met Asp Gly Gln Tyr Gly Leu Asn Asp Ile Tyr Ile
            260                 265                 270

ggc aca ccg gcc gtc atc ggt ggc acc ggt ctg aag cag atc atc gag        864
Gly Thr Pro Ala Val Ile Gly Gly Thr Gly Leu Lys Gln Ile Ile Glu
        275                 280                 285

agc ccg ctg tcc gcc gac gag ctg aaa aag atg cag gac agc gcc gca        912
Ser Pro Leu Ser Ala Asp Glu Leu Lys Lys Met Gln Asp Ser Ala Ala
    290                 295                 300

acg ctc aaa aaa gtc ctc aat gat ggc ctg gcc gaa ctg gag aat aag        960
Thr Leu Lys Lys Val Leu Asn Asp Gly Leu Ala Glu Leu Glu Asn Lys
305                 310                 315                 320

taa                                                                    963
```

<210> 22
<211> 320
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 22

```
Met Ser Ser Met Pro Asn His Gln Lys Val Val Leu Val Gly Asp Gly
1               5                  10                  15

Ala Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Met Ala Gln Gln Gly Ile Ala
            20                  25                  30

Glu Glu Phe Val Ile Val Asp Val Val Lys Asp Arg Thr Lys Gly Asp
        35                  40                  45

Ala Leu Asp Leu Glu Asp Ala Gln Ala Phe Thr Ala Pro Lys Lys Ile
    50                  55                  60

Tyr Ser Gly Glu Tyr Ser Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

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

Asn Lys Asn Leu Asn Ile Leu Ser Ser Ile Val Lys Pro Val Val Asp
            100                 105                 110

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

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

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

Gly Lys Gln Phe Asn Val Asp Pro Arg Ser Val Asp Ala Tyr Ile Met
                165                 170                 175

Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Phe Ala Ala Tyr Ser Thr Ala Thr Ile
            180                 185                 190

Gly Thr Arg Pro Val Arg Asp Val Ala Lys Glu Gln Gly Val Ser Asp
        195                 200                 205

Glu Asp Leu Ala Lys Leu Glu Asp Gly Val Arg Asn Lys Ala Tyr Asp
    210                 215                 220

Ile Ile Asn Leu Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile Gly Thr Ala Leu
```

```
225                 230                 235                 240

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

Val Gly Ala Tyr Met Asp Gly Gln Tyr Gly Leu Asn Asp Ile Tyr Ile
            260                 265                 270

Gly Thr Pro Ala Val Ile Gly Gly Thr Gly Leu Lys Gln Ile Ile Glu
        275                 280                 285

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

Thr Leu Lys Lys Val Leu Asn Asp Gly Leu Ala Glu Leu Glu Asn Lys
305                 310                 315                 320
```

<210> 23
<211> 954
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Staphylococcus aureus LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (954)

<400> 23

```
atg aac aag ttc aag ggc aac aaa gtc gtg ttg atc ggg aat ggc gcc          48
Met Asn Lys Phe Lys Gly Asn Lys Val Val Leu Ile Gly Asn Gly Ala
1               5                   10                  15

gtc ggc tcg tcc tac gcg ttt tcg ctg gtc aac cag tcc atc gtg gac          96
Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Leu Val Asn Gln Ser Ile Val Asp
            20                  25                  30

gaa ctc gtc ata atc gac ctc gac acc gaa aag gtt cgg ggt gac gtc         144
Glu Leu Val Ile Ile Asp Leu Asp Thr Glu Lys Val Arg Gly Asp Val
        35                  40                  45

atg gac ctc aag cac gcc act ccg tat agc ccc acg acc gtg cgc gtg         192
Met Asp Leu Lys His Ala Thr Pro Tyr Ser Pro Thr Thr Val Arg Val
    50                  55                  60

aag gcc gga gag tac agc gac tgc cat gac gcc aac ctg gtc gtc att         240
Lys Ala Gly Glu Tyr Ser Asp Cys His Asp Ala Asn Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

tgc gcg ggt gcg gcg cag aaa ccg ggc gaa acc cgc ctc gat ctg gtg         288
Cys Ala Gly Ala Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu Val
                85                  90                  95

agc aag aac ctc aag atc ttc aag agt att gtg gga gaa gta atg gcc         336
Ser Lys Asn Leu Lys Ile Phe Lys Ser Ile Val Gly Glu Val Met Ala
```

```
                100                 105                 110

tcg aag ttc gac ggc atc ttc ctg gtc gca acc aat cca gtg gat atc      384
Ser Lys Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Asp Ile
        115                 120                 125

ctg gcc tac gca acc tgg aag ttc tcg gga ctg ccc aaa gag cga gtc      432
Leu Ala Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val
    130                 135                 140

atc ggc tcc ggc acc atc ctt gac tca gcg cgt ttc cgg ctg ctg ttg      480
Ile Gly Ser Gly Thr Ile Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Leu Leu Leu
145                 150                 155                 160

agc gag gcc ttc gat gtg gcg ccc agg tct gtc gat gcc cag atc atc      528
Ser Glu Ala Phe Asp Val Ala Pro Arg Ser Val Asp Ala Gln Ile Ile
                165                 170                 175

ggc gag cac ggc gac acc gag ctt ccc gtg tgg tcc cat gcc aat atc      576
Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser His Ala Asn Ile
            180                 185                 190

gct ggg cag ccg ctg aaa acg ctg ctg gag caa cgt cct gag ggc aag      624
Ala Gly Gln Pro Leu Lys Thr Leu Leu Glu Gln Arg Pro Glu Gly Lys
        195                 200                 205

gcg cag atc gag cag atc ttt gtg cag acg cgc gac gcc gcc tac gac      672
Ala Gln Ile Glu Gln Ile Phe Val Gln Thr Arg Asp Ala Ala Tyr Asp
    210                 215                 220

atc atc caa gcg aag ggc gct aca tac tat ggg gtg gcg atg ggg ctc      720
Ile Ile Gln Ala Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Val Ala Met Gly Leu
225                 230                 235                 240

gcg cgc atc acg gaa gcc att ttc cgg aat gaa gat gca gtc ctg acc      768
Ala Arg Ile Thr Glu Ala Ile Phe Arg Asn Glu Asp Ala Val Leu Thr
                245                 250                 255

gta agc gcc ctg ctg gaa ggt gag tat gac gaa gaa gat gtc tac atc      816
Val Ser Ala Leu Leu Glu Gly Glu Tyr Asp Glu Glu Asp Val Tyr Ile
            260                 265                 270

ggc gtt ccg gcc gtg atc aac cgc aac ggc atc cgg aac gtc gtg gag      864
Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Asn Gly Ile Arg Asn Val Val Glu
        275                 280                 285

atc ccg ctg aac gat gaa gaa cag agc aag ttc gcc cac tcc gcg aaa      912
Ile Pro Leu Asn Asp Glu Glu Gln Ser Lys Phe Ala His Ser Ala Lys
    290                 295                 300

acc ctg aaa gac atc atg gcc gag gcc gag gaa ttg aag taa              954
Thr Leu Lys Asp Ile Met Ala Glu Ala Glu Glu Leu Lys
305                 310                 315
```

<210> 24
<211> 317
<212> PRT
<213> Artificial

<220 >
<223> Construcción sintética

<400> 24

```
Met Asn Lys Phe Lys Gly Asn Lys Val Val Leu Ile Gly Asn Gly Ala
1               5                  10                  15

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

Glu Leu Val Ile Ile Asp Leu Asp Thr Glu Lys Val Arg Gly Asp Val
        35                  40                  45

Met Asp Leu Lys His Ala Thr Pro Tyr Ser Pro Thr Thr Val Arg Val
    50                  55                  60

Lys Ala Gly Glu Tyr Ser Asp Cys His Asp Ala Asn Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

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

Ser Lys Asn Leu Lys Ile Phe Lys Ser Ile Val Gly Glu Val Met Ala
            100                 105                 110

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

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

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

Ser Glu Ala Phe Asp Val Ala Pro Arg Ser Val Asp Ala Gln Ile Ile
                165                 170                 175

Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser His Ala Asn Ile
            180                 185                 190

Ala Gly Gln Pro Leu Lys Thr Leu Leu Glu Gln Arg Pro Glu Gly Lys
        195                 200                 205

Ala Gln Ile Glu Gln Ile Phe Val Gln Thr Arg Asp Ala Ala Tyr Asp
    210                 215                 220

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

Ala Arg Ile Thr Glu Ala Ile Phe Arg Asn Glu Asp Ala Val Leu Thr
```

245 250 255

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

Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Asn Gly Ile Arg Asn Val Val Glu
275 280 285

Ile Pro Leu Asn Asp Glu Glu Gln Ser Lys Phe Ala His Ser Ala Lys
290 295 300

Thr Leu Lys Asp Ile Met Ala Glu Ala Glu Glu Leu Lys
305 310 315

<210> 25
<211> 954
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Bacillus caldolyticus LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (954)

<400> 25

```
atg aaa aac aat ggg ggc acc cgc gtg gtc gtc atc gga acc ggc ttc          48
Met Lys Asn Asn Gly Gly Thr Arg Val Val Val Ile Gly Thr Gly Phe
1               5                  10                  15

gtc ggc gcc tcg tac gcg ttc gcc ctg atg aac cag ggt att gcc gac          96
Val Gly Ala Ser Tyr Ala Phe Ala Leu Met Asn Gln Gly Ile Ala Asp
            20                  25                  30

gag atc gtg ctg atc gac gcg aac gag tcc aag gcc atc ggc gat gca         144
Glu Ile Val Leu Ile Asp Ala Asn Glu Ser Lys Ala Ile Gly Asp Ala
        35                  40                  45

atg gac ttt aac cac ggc aag gtt ttc gcc ccc aaa ccg gcg gac atc         192
Met Asp Phe Asn His Gly Lys Val Phe Ala Pro Lys Pro Ala Asp Ile
    50                  55                  60

tgg cat ggc gat tat gac gac tgc cgg gac gcc gac ctg gtg gtg atc         240
Trp His Gly Asp Tyr Asp Asp Cys Arg Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

tgc gcg ggt gcg aac cag aag ccg gga gaa acc cgc ctt gac ctg gtt         288
Cys Ala Gly Ala Asn Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu Val
                85                  90                  95

gac aag aac atc gcc atc ttc cgc tcg atc gtc gaa agc gtc atg gcc         336
Asp Lys Asn Ile Ala Ile Phe Arg Ser Ile Val Glu Ser Val Met Ala
            100                 105                 110

agc ggg ttc caa ggc ctc ttc ctg gtc gcc acc aac ccc gtc gac att         384
Ser Gly Phe Gln Gly Leu Phe Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Asp Ile
```

```
                115                 120                 125

ctc acg tac gcg acc tgg aaa ttc tcg ggc ctg ccg cac gag cgg gtg        432
Leu Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro His Glu Arg Val
    130                 135                 140

atc ggc agc ggc acg atc ctg gat act gcc cgg ttt cga ttc ttg ctg        480
Ile Gly Ser Gly Thr Ile Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Phe Leu Leu
145                 150                 155                 160

ggt gag tac ttc agc gtc gcc cca cag aat gtg cat gcg tac atc att        528
Gly Glu Tyr Phe Ser Val Ala Pro Gln Asn Val His Ala Tyr Ile Ile
                165                 170                 175

ggc gaa cat ggc gat acg gaa ctc ccc gtc tgg tcc cag gct gat atc        576
Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser Gln Ala Asp Ile
            180                 185                 190

ggg gga gtc ccg atc cgg aag ctc gtg gaa tcc aag ggc gaa gaa gcg        624
Gly Gly Val Pro Ile Arg Lys Leu Val Glu Ser Lys Gly Glu Glu Ala
        195                 200                 205

cag aaa gaa ttg gag cgt atc ttc gtg aat gta cgt gat gcc gcc tat        672
Gln Lys Glu Leu Glu Arg Ile Phe Val Asn Val Arg Asp Ala Ala Tyr
    210                 215                 220

cag ata atc gaa aag aaa ggc gcc acc tac tat ggt atc gcg atg ggg        720
Gln Ile Ile Glu Lys Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala Met Gly
225                 230                 235                 240

ctg gcc agg gtg acc cgc gca atc ctg cac aac gag aat gcg atc ctg        768
Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Ile Leu His Asn Glu Asn Ala Ile Leu
                245                 250                 255

aca gtg tcc gcg tac ctg gat ggg cct tac ggc gag cgc gac gtg tat        816
Thr Val Ser Ala Tyr Leu Asp Gly Pro Tyr Gly Glu Arg Asp Val Tyr
            260                 265                 270

atc ggc gtg ccg gca gtc atc aac cgg aac ggc atc cgc gaa gtc atc        864
Ile Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Asn Gly Ile Arg Glu Val Ile
        275                 280                 285

gag atc gag ctg aac gac gac gag aag aac cgc ttc cac cac tcg gcc        912
Glu Ile Glu Leu Asn Asp Asp Glu Lys Asn Arg Phe His His Ser Ala
    290                 295                 300

gct acc ctc aag agt gtg ttg gcc cgg ttc ttc acg cgc taa                954
Ala Thr Leu Lys Ser Val Leu Ala Arg Phe Phe Thr Arg
305                 310                 315
```

<210> 26
<211> 317
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 26

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

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

Glu Ile Val Leu Ile Asp Ala Asn Glu Ser Lys Ala Ile Gly Asp Ala
        35                  40                  45

Met Asp Phe Asn His Gly Lys Val Phe Ala Pro Lys Pro Ala Asp Ile
    50                  55                  60

Trp His Gly Asp Tyr Asp Asp Cys Arg Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

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

Asp Lys Asn Ile Ala Ile Phe Arg Ser Ile Val Glu Ser Val Met Ala
            100                 105                 110

Ser Gly Phe Gln Gly Leu Phe Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Asp Ile
        115                 120                 125

Leu Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro His Glu Arg Val
    130                 135                 140

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

Gly Glu Tyr Phe Ser Val Ala Pro Gln Asn Val His Ala Tyr Ile Ile
                165                 170                 175

Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser Gln Ala Asp Ile
            180                 185                 190

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

Gln Lys Glu Leu Glu Arg Ile Phe Val Asn Val Arg Asp Ala Ala Tyr
    210                 215                 220

Gln Ile Ile Glu Lys Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala Met Gly
225                 230                 235                 240

Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Ile Leu His Asn Glu Asn Ala Ile Leu
                245                 250                 255

Thr Val Ser Ala Tyr Leu Asp Gly Pro Tyr Gly Glu Arg Asp Val Tyr
```

260 265 270

Ile Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Asn Gly Ile Arg Glu Val Ile
275 280 285

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

Ala Thr Leu Lys Ser Val Leu Ala Arg Phe Phe Thr Arg
305 310 315

<210> 27
<211> 1002
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Actinomyces visosus LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1002)

<400> 27

```
atg tcc gac cat atc acg aca acc gcc gag ggc tcc tac ccg acc aat          48
Met Ser Asp His Ile Thr Thr Thr Ala Glu Gly Ser Tyr Pro Thr Asn
1               5                  10                  15

cgg tcc gga cgg ccc agc aaa gtg gcc gtg atc ggc gcg ggc gcg gtc          96
Arg Ser Gly Arg Pro Ser Lys Val Ala Val Ile Gly Ala Gly Ala Val
            20                  25                  30

ggg agc acc ctg gcc tac gcc tgt gtc acc aaa ggc gtc gct cgc gag         144
Gly Ser Thr Leu Ala Tyr Ala Cys Val Thr Lys Gly Val Ala Arg Glu
        35                  40                  45

gtc gtc ttg cag gac ata gtc aag gaa aaa gta gaa gcc gaa gcg ctg         192
Val Val Leu Gln Asp Ile Val Lys Glu Lys Val Glu Ala Glu Ala Leu
    50                  55                  60

gac atc gcc cag ggt atc cag ttc acc tcc gcg gga agt gtg tct ggc         240
Asp Ile Ala Gln Gly Ile Gln Phe Thr Ser Ala Gly Ser Val Ser Gly
65                  70                  75                  80

tcg gat gac ccg gag atc tgc cgc gat gcc gac gtg att gcc atc act         288
Ser Asp Asp Pro Glu Ile Cys Arg Asp Ala Asp Val Ile Ala Ile Thr
                85                  90                  95

gca ggc gca aag cag aag ccc ggc cag tcg cgc ttg gag ctg gcg gga         336
Ala Gly Ala Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Arg Leu Glu Leu Ala Gly
            100                 105                 110

gcg acc gtg ggg atc atg gaa aag atc ctg ccc aag ctc gtg gaa gtt         384
Ala Thr Val Gly Ile Met Glu Lys Ile Leu Pro Lys Leu Val Glu Val
        115                 120                 125

gcc ccc aac gcc atc ttc gtc ctg gtc gcc aac ccg gtc gat gtg gtg         432
Ala Pro Asn Ala Ile Phe Val Leu Val Ala Asn Pro Val Asp Val Val
```

```
    130                 135                 140

acg tac tgc gcc aag aaa atc acc ggc ctg ccg gag aac caa gtg ttt  480
Thr Tyr Cys Ala Lys Lys Ile Thr Gly Leu Pro Glu Asn Gln Val Phe
145                 150                 155                 160

ggc tcg ggc act gtc ctc gac acg gcc cgt atg cgc tat ctg atc agc  528
Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Thr Ala Arg Met Arg Tyr Leu Ile Ser
                165                 170                 175

ctc gaa acg ggg acc gct gtc cag aac atc cac ggc tat atc gcg ggt  576
Leu Glu Thr Gly Thr Ala Val Gln Asn Ile His Gly Tyr Ile Ala Gly
            180                 185                 190

gag cat ggc gat tcg gaa gtc cca ctg tgg tcc tcg acc gaa atc ggc  624
Glu His Gly Asp Ser Glu Val Pro Leu Trp Ser Ser Thr Glu Ile Gly
        195                 200                 205

ggt gtg ccg att acg cag tgg ggc acc acg ttg gac ggt ggc gtg ttc  672
Gly Val Pro Ile Thr Gln Trp Gly Thr Thr Leu Asp Gly Gly Val Phe
    210                 215                 220

gac gag agc aag cgc gag cgg atc gcg cat gac gtc gtg cgc agc gcc  720
Asp Glu Ser Lys Arg Glu Arg Ile Ala His Asp Val Val Arg Ser Ala
225                 230                 235                 240

tat cgg atc atc gag ggg aag ggc gcg acc aac tac gcg gtt ggc ctg  768
Tyr Arg Ile Ile Glu Gly Lys Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Val Gly Leu
                245                 250                 255

gcc gtg cag cgt atc atc ggc gca gtg ctg aat gac gag caa agg gtc  816
Ala Val Gln Arg Ile Ile Gly Ala Val Leu Asn Asp Glu Gln Arg Val
            260                 265                 270

ctc acg atc agc ccg ctg ctc gat aac tgg cac ggc att tca gat gtg  864
Leu Thr Ile Ser Pro Leu Leu Asp Asn Trp His Gly Ile Ser Asp Val
        275                 280                 285

tgc atg gcc gtc cct acc att gtt ggc cgc gag ggt gcg gga cgc cgg  912
Cys Met Ala Val Pro Thr Ile Val Gly Arg Glu Gly Ala Gly Arg Arg
    290                 295                 300

ctg gag ctc ccg ctg acc ccc gaa gaa aag gaa cga ctg acc gct tcc  960
Leu Glu Leu Pro Leu Thr Pro Glu Glu Lys Glu Arg Leu Thr Ala Ser
305                 310                 315                 320

gcc gac cac ctt cgg gaa gta gcc aga ggg ctg ggg tac taa          1002
Ala Asp His Leu Arg Glu Val Ala Arg Gly Leu Gly Tyr
                325                 330
```

<210> 28
<211> 333
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 28

```
Met Ser Asp His Ile Thr Thr Thr Ala Glu Gly Ser Tyr Pro Thr Asn
1               5                  10                  15
```

```
Arg Ser Gly Arg Pro Ser Lys Val Ala Val Ile Gly Ala Gly Ala Val
            20                  25                  30

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

Val Val Leu Gln Asp Ile Val Lys Glu Lys Val Glu Ala Glu Ala Leu
    50                  55                  60

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

Ser Asp Asp Pro Glu Ile Cys Arg Asp Ala Asp Val Ile Ala Ile Thr
                85                  90                  95

Ala Gly Ala Lys Gln Lys Pro Gly Gln Ser Arg Leu Glu Leu Ala Gly
            100                 105                 110

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

Ala Pro Asn Ala Ile Phe Val Leu Val Ala Asn Pro Val Asp Val Val
    130                 135                 140

Thr Tyr Cys Ala Lys Lys Ile Thr Gly Leu Pro Glu Asn Gln Val Phe
145                 150                 155                 160

Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Thr Ala Arg Met Arg Tyr Leu Ile Ser
                165                 170                 175

Leu Glu Thr Gly Thr Ala Val Gln Asn Ile His Gly Tyr Ile Ala Gly
            180                 185                 190

Glu His Gly Asp Ser Glu Val Pro Leu Trp Ser Ser Thr Glu Ile Gly
        195                 200                 205

Gly Val Pro Ile Thr Gln Trp Gly Thr Thr Leu Asp Gly Gly Val Phe
    210                 215                 220

Asp Glu Ser Lys Arg Glu Arg Ile Ala His Asp Val Val Arg Ser Ala
225                 230                 235                 240

Tyr Arg Ile Ile Glu Gly Lys Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Val Gly Leu
                245                 250                 255

Ala Val Gln Arg Ile Ile Gly Ala Val Leu Asn Asp Glu Gln Arg Val
```

```
                260                 265                 270

Leu Thr Ile Ser Pro Leu Leu Asp Asn Trp His Gly Ile Ser Asp Val
        275                 280                 285

Cys Met Ala Val Pro Thr Ile Val Gly Arg Glu Gly Ala Gly Arg Arg
    290                 295                 300

Leu Glu Leu Pro Leu Thr Pro Glu Glu Lys Glu Arg Leu Thr Ala Ser
305                 310                 315                 320

Ala Asp His Leu Arg Glu Val Ala Arg Gly Leu Gly Tyr
                325                 330
```

<210> 29
<211> 945
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Bacillus anthracis LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (945)

<400> 29

```
atg aaa aag ggc atc aac cga gtg gtc ctg gtc ggt acc gga gcc gtg          48
Met Lys Lys Gly Ile Asn Arg Val Val Leu Val Gly Thr Gly Ala Val
1               5                  10                  15

ggg tgc tcc tat gct tac tca atg atc aac cag ggc gtg gcc gag gaa          96
Gly Cys Ser Tyr Ala Tyr Ser Met Ile Asn Gln Gly Val Ala Glu Glu
            20                  25                  30

ttc gtg ctg gtc gac gtc aac gaa gcc aag gcc gag ggt gag gca atg         144
Phe Val Leu Val Asp Val Asn Glu Ala Lys Ala Glu Gly Glu Ala Met
        35                  40                  45

gac ctg tcc cac gcg gtc ccg ttc tcg ccc agc ccc acc aag gtg tgg         192
Asp Leu Ser His Ala Val Pro Phe Ser Pro Ser Pro Thr Lys Val Trp
    50                  55                  60

agc ggc agc tac gcg gac tgc aaa gac gcc gat ctg gtg gtc atc acc         240
Ser Gly Ser Tyr Ala Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile Thr
65                  70                  75                  80

gcc gga ctc cct cag aag ccg ggt gaa acc cgc ttg gac ctg gtc gag         288
Ala Gly Leu Pro Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu Val Glu
                85                  90                  95

aag aac acg aag atc ttc aaa cag atc gtg agg gga atc atg gat tcc         336
Lys Asn Thr Lys Ile Phe Lys Gln Ile Val Arg Gly Ile Met Asp Ser
            100                 105                 110

ggc ttt gac ggc atc ttc ctc atc gcg acg aac ccc gtg gat atc ttg         384
Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Ile Ala Thr Asn Pro Val Asp Ile Leu
```

```
                115                 120                 125

acc tat gtc acc tgg aag gaa tcc ggc ctc ccg aaa gag cgc gtc att        432
Thr Tyr Val Thr Trp Lys Glu Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val Ile
    130                 135                 140

ggc agt ggg acc acg ctg gac agc gct cgc ttc cgg tat atg ctg ggc        480
Gly Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Met Leu Gly
145                 150                 155                 160

gac tac ctg gac gtg gac ccg cgg aac gtc cat gcc tac atc gta ggt        528
Asp Tyr Leu Asp Val Asp Pro Arg Asn Val His Ala Tyr Ile Val Gly
                165                 170                 175

gaa cat ggc gat acc gag ctg ccc gtt tgg tcg cac gcg acg atc ggc        576
Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser His Ala Thr Ile Gly
            180                 185                 190

gtg cag aag ctg gaa aca atc ctc gcc aac aat gaa cag tac aag caa        624
Val Gln Lys Leu Glu Thr Ile Leu Ala Asn Asn Glu Gln Tyr Lys Gln
        195                 200                 205

gag gat ctc gat aag att ttc gaa aac gtc cgg gac gcg gcc tac cat        672
Glu Asp Leu Asp Lys Ile Phe Glu Asn Val Arg Asp Ala Ala Tyr His
    210                 215                 220

atc atc gag cgc aaa ggg gcc acc tat tac ggc atc ggg atg tcg ctc        720
Ile Ile Glu Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Met Ser Leu
225                 230                 235                 240

ctg cgg gtg acc aag gca ata ctg aat aat gag aat agc gtg ctg act        768
Leu Arg Val Thr Lys Ala Ile Leu Asn Asn Glu Asn Ser Val Leu Thr
                245                 250                 255

gtc tct gcg tac ctt gag ggc cag tat ggc gag aaa gac gcg tac gtg        816
Val Ser Ala Tyr Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Glu Lys Asp Ala Tyr Val
            260                 265                 270

ggc gta ccg gcc gtt atc aac cgc gag ggc gtc cgt gaa atc gtc gaa        864
Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Glu Gly Val Arg Glu Ile Val Glu
        275                 280                 285

ctg gag ttg aac gaa gag gaa aag gcc aag ttc gcc cac tcg gtg aag        912
Leu Glu Leu Asn Glu Glu Glu Lys Ala Lys Phe Ala His Ser Val Lys
    290                 295                 300

gtc ctc aag gaa acg atg gcg cca gtg ctg taa                           945
Val Leu Lys Glu Thr Met Ala Pro Val Leu
305                 310
```

<210> 30
<211> 314
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 30

```
Met Lys Lys Gly Ile Asn Arg Val Val Leu Val Gly Thr Gly Ala Val
1               5                  10                  15
```

```
Gly Cys Ser Tyr Ala Tyr Ser Met Ile Asn Gln Gly Val Ala Glu Glu
            20                  25                  30

Phe Val Leu Val Asp Val Asn Glu Ala Lys Ala Glu Gly Glu Ala Met
        35                  40                  45

Asp Leu Ser His Ala Val Pro Phe Ser Pro Ser Pro Thr Lys Val Trp
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Tyr Ala Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile Thr
65                  70                  75                  80

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

Lys Asn Thr Lys Ile Phe Lys Gln Ile Val Arg Gly Ile Met Asp Ser
            100                 105                 110

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

Thr Tyr Val Thr Trp Lys Glu Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val Ile
    130                 135                 140

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

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

Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser His Ala Thr Ile Gly
            180                 185                 190

Val Gln Lys Leu Glu Thr Ile Leu Ala Asn Asn Glu Gln Tyr Lys Gln
        195                 200                 205

Glu Asp Leu Asp Lys Ile Phe Glu Asn Val Arg Asp Ala Ala Tyr His
    210                 215                 220

Ile Ile Glu Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Met Ser Leu
225                 230                 235                 240

Leu Arg Val Thr Lys Ala Ile Leu Asn Asn Glu Asn Ser Val Leu Thr
                245                 250                 255

Val Ser Ala Tyr Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Glu Lys Asp Ala Tyr Val
```

260 265 270

Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Glu Gly Val Arg Glu Ile Val Glu
275 280 285

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

Val Leu Lys Glu Thr Met Ala Pro Val Leu
305 310

<210> 31
<211> 957
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Ruminococcus torques LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (957)

<400> 31

```
atg aag aaa aaa gtg atc aac tcg aag aaa gcc gtg atg atc ggg tgc          48
Met Lys Lys Lys Val Ile Asn Ser Lys Lys Ala Val Met Ile Gly Cys
1               5                   10                  15

ggc ttt gtg ggt agc gcg tcg gtg ttc gca ctg atg cag agt ggc ctg          96
Gly Phe Val Gly Ser Ala Ser Val Phe Ala Leu Met Gln Ser Gly Leu
            20                  25                  30

ttc acc gag atc gtc ctc atc gac gct gac aag aat aag gcc gaa ggc         144
Phe Thr Glu Ile Val Leu Ile Asp Ala Asp Lys Asn Lys Ala Glu Gly
        35                  40                  45

gag gcc atg gat atc tcg cac ggt att ccg ttc gcg tcc cct atg aag         192
Glu Ala Met Asp Ile Ser His Gly Ile Pro Phe Ala Ser Pro Met Lys
    50                  55                  60

atc tat gcg ggc gac tac gat gat gtc gcc gat gcg gca atc gtt gtg         240
Ile Tyr Ala Gly Asp Tyr Asp Asp Val Ala Asp Ala Ala Ile Val Val
65                  70                  75                  80

atc tcc gcc gga gcc ggc cag aaa ccc ggc gag act cgg ctg gac ctg         288
Ile Ser Ala Gly Ala Gly Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu
                85                  90                  95

gtc aac aaa aac gtc gcg atc ttc aag tcg atc att ccg gag att gcg         336
Val Asn Lys Asn Val Ala Ile Phe Lys Ser Ile Ile Pro Glu Ile Ala
            100                 105                 110

aag cgc aac ttc gcc ggt atc atg ctg gtc gtc gcc aac ccg gtc gat         384
Lys Arg Asn Phe Ala Gly Ile Met Leu Val Val Ala Asn Pro Val Asp
        115                 120                 125

atc ctg acc caa gtg gcc atc aag ttg tcc ggg ctg ccc gag aac cgc         432
Ile Leu Thr Gln Val Ala Ile Lys Leu Ser Gly Leu Pro Glu Asn Arg
```

```
        130                 135                 140

gtc atc ggc tcg ggc acg gtg ctc gac agt gcg cgg ctg agg tac aag   480
Val Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser Ala Arg Leu Arg Tyr Lys
145                 150                 155                 160

ttg ggg gaa cat ctc tcc gtc gac tcc cgg agc gtg cat gcc ttc atc   528
Leu Gly Glu His Leu Ser Val Asp Ser Arg Ser Val His Ala Phe Ile
                165                 170                 175

gtc ggc gaa cac ggg gac tcc gaa gtc gtg gct tgg agc agc gcg aat   576
Val Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Val Val Ala Trp Ser Ser Ala Asn
            180                 185                 190

gtg tcg gga gtg ccg ctg agc gaa atg tgc gag atg cgt ggc cac tac   624
Val Ser Gly Val Pro Leu Ser Glu Met Cys Glu Met Arg Gly His Tyr
        195                 200                 205

aag cat aag gaa aac acg gcc gaa atc gcc acc gcg gta aag aat tct   672
Lys His Lys Glu Asn Thr Ala Glu Ile Ala Thr Ala Val Lys Asn Ser
    210                 215                 220

gcg tac gag ata atc aac aag aag cac gcc acc tac tat ggc atc gca   720
Ala Tyr Glu Ile Ile Asn Lys Lys His Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala
225                 230                 235                 240

atg agc gtt aaa cgc atc tgt gag gtc atc atg cgc gat gag aag tcg   768
Met Ser Val Lys Arg Ile Cys Glu Val Ile Met Arg Asp Glu Lys Ser
                245                 250                 255

atc ctt ccc gta tcc cac atg att cat ggc gtc tat gac atc gac ggc   816
Ile Leu Pro Val Ser His Met Ile His Gly Val Tyr Asp Ile Asp Gly
            260                 265                 270

gtg agc ctc tca atg cca gcc atc gtg ggt gcc gac ggc atc gag agc   864
Val Ser Leu Ser Met Pro Ala Ile Val Gly Ala Asp Gly Ile Glu Ser
        275                 280                 285

gac atc ccg ata aac ctc agc gga gaa gaa gcg ctg aag ctg aaa gag   912
Asp Ile Pro Ile Asn Leu Ser Gly Glu Glu Ala Leu Lys Leu Lys Glu
    290                 295                 300

tcc gcc gac tcg ctg aag aaa atc atc gaa acc atc gaa ctg taa       957
Ser Ala Asp Ser Leu Lys Lys Ile Ile Glu Thr Ile Glu Leu
305                 310                 315
```

<210> 32
<211> 318
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 32

```
Met Lys Lys Lys Val Ile Asn Ser Lys Lys Ala Val Met Ile Gly Cys
1               5                   10                  15

Gly Phe Val Gly Ser Ala Ser Val Phe Ala Leu Met Gln Ser Gly Leu
            20                  25                  30
```

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

Glu Ala Met Asp Ile Ser His Gly Ile Pro Phe Ala Ser Pro Met Lys
    50                  55                  60

Ile Tyr Ala Gly Asp Tyr Asp Asp Val Ala Asp Ala Ala Ile Val Val
65                  70                  75                  80

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

Val Asn Lys Asn Val Ala Ile Phe Lys Ser Ile Ile Pro Glu Ile Ala
            100                 105                 110

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

Ile Leu Thr Gln Val Ala Ile Lys Leu Ser Gly Leu Pro Glu Asn Arg
    130                 135                 140

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

Leu Gly Glu His Leu Ser Val Asp Ser Arg Ser Val His Ala Phe Ile
                165                 170                 175

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

Val Ser Gly Val Pro Leu Ser Glu Met Cys Glu Met Arg Gly His Tyr
        195                 200                 205

Lys His Lys Glu Asn Thr Ala Glu Ile Ala Thr Ala Val Lys Asn Ser
    210                 215                 220

Ala Tyr Glu Ile Ile Asn Lys Lys His Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala
225                 230                 235                 240

Met Ser Val Lys Arg Ile Cys Glu Val Ile Met Arg Asp Glu Lys Ser
                245                 250                 255

Ile Leu Pro Val Ser His Met Ile His Gly Val Tyr Asp Ile Asp Gly
            260                 265                 270

Val Ser Leu Ser Met Pro Ala Ile Val Gly Ala Asp Gly Ile Glu Ser
```

275 280 285

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

Ser Ala Asp Ser Leu Lys Lys Ile Ile Glu Thr Ile Glu Leu
305 310 315

< 210> 33
<211> 942
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Listeria marthii LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (942)

<400> 33

```
atg aag gat cat cag aag atc atc ctg gta ggc gat ggt gcc gtg gga          48
Met Lys Asp His Gln Lys Ile Ile Leu Val Gly Asp Gly Ala Val Gly
1               5                   10                  15

tcc tcc tac gcc ttc gcc tgc gtc aac ctt tcg att ggc cag gaa ttc          96
Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Cys Val Asn Leu Ser Ile Gly Gln Glu Phe
            20                  25                  30

ggc att atc gac atc gac aag gat agg aca atc ggt gac gcg atg gac         144
Gly Ile Ile Asp Ile Asp Lys Asp Arg Thr Ile Gly Asp Ala Met Asp
        35                  40                  45

ctc tcc cat gcc gtg ccc ttc tct acc ccg aaa aag atc tac tcc gcg         192
Leu Ser His Ala Val Pro Phe Ser Thr Pro Lys Lys Ile Tyr Ser Ala
    50                  55                  60

aac tat tcg gac tgc cac gac gcg gat ctg gtg gtc gtc acg gct ggg         240
Asn Tyr Ser Asp Cys His Asp Ala Asp Leu Val Val Val Thr Ala Gly
65                  70                  75                  80

acc gcc cag aag cct ggc gaa acg cgc ctg gac ttg gtt aac cgc aat         288
Thr Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu Val Asn Arg Asn
                85                  90                  95

atc aag atc atg aag ggc ata gtg gac gaa gtc atg gcg agc ggt ttt         336
Ile Lys Ile Met Lys Gly Ile Val Asp Glu Val Met Ala Ser Gly Phe
            100                 105                 110

gac ggc atc ttc ctg atc gcg agc aac ccc gtg gac atc ctg acc tac         384
Asp Gly Ile Phe Leu Ile Ala Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr
        115                 120                 125

gcg acc tgg aag ttc agc ggg ctc ccc aaa gag cgg gtc atc ggc tcg         432
Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val Ile Gly Ser
    130                 135                 140

gga acc tca ctc gat acc gca cgc ttc cgg atg agt atc gcc gac tac         480
Gly Thr Ser Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Met Ser Ile Ala Asp Tyr
```

```
145                 150                 155                 160

ctg aag gtc gat gcg cgg aat gtt cac ggc tac atc ctg ggg gag cac  528
Leu Lys Val Asp Ala Arg Asn Val His Gly Tyr Ile Leu Gly Glu His
                165                 170                 175

ggg gat acg gaa ttc ccg gcc tgg agc cac acc act gtc ggc ggc ttg  576
Gly Asp Thr Glu Phe Pro Ala Trp Ser His Thr Thr Val Gly Gly Leu
            180                 185                 190

ccg atc acc gag tgg atc tcg gaa gat gaa cag ggc gcc atg gac acg  624
Pro Ile Thr Glu Trp Ile Ser Glu Asp Glu Gln Gly Ala Met Asp Thr
        195                 200                 205

atc ttc gtg tcc gtg cgt gat gcc gcc tac gag atc atc aac aaa aag  672
Ile Phe Val Ser Val Arg Asp Ala Ala Tyr Glu Ile Ile Asn Lys Lys
    210                 215                 220

gga gcc acc ttc tat ggc gtc gcg gca gcc ctc gcc cgc atc acg aag  720
Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Val Ala Ala Ala Leu Ala Arg Ile Thr Lys
225                 230                 235                 240

gcc att ctg aat aac gag aac gcg atc ctg ccg ctg tcg gtc tac ctg  768
Ala Ile Leu Asn Asn Glu Asn Ala Ile Leu Pro Leu Ser Val Tyr Leu
                245                 250                 255

gac ggc cat tat ggc atg aac gac atc tat atc ggc gct ccg gcg gtc  816
Asp Gly His Tyr Gly Met Asn Asp Ile Tyr Ile Gly Ala Pro Ala Val
            260                 265                 270

gtg aat cgg cag ggt gtg cga cac atc gtg gag atg aac ctc acc gac  864
Val Asn Arg Gln Gly Val Arg His Ile Val Glu Met Asn Leu Thr Asp
        275                 280                 285

aaa gaa aag gaa cag atg aag aac agc gcg gac acc ctg aaa aag gtc  912
Lys Glu Lys Glu Gln Met Lys Asn Ser Ala Asp Thr Leu Lys Lys Val
    290                 295                 300

ctg gac gac gcc atg aaa caa gtg gac taa                         942
Leu Asp Asp Ala Met Lys Gln Val Asp
305                 310
```

<210> 34
<211> 313
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 34

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

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

Gly Ile Ile Asp Ile Asp Lys Asp Arg Thr Ile Gly Asp Ala Met Asp
        35                  40                  45
```

```
Leu Ser His Ala Val Pro Phe Ser Thr Pro Lys Lys Ile Tyr Ser Ala
    50                  55                  60

Asn Tyr Ser Asp Cys His Asp Ala Asp Leu Val Val Val Thr Ala Gly
65                  70                  75                  80

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

Ile Lys Ile Met Lys Gly Ile Val Asp Glu Val Met Ala Ser Gly Phe
            100                 105                 110

Asp Gly Ile Phe Leu Ile Ala Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr
        115                 120                 125

Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val Ile Gly Ser
    130                 135                 140

Gly Thr Ser Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Met Ser Ile Ala Asp Tyr
145                 150                 155                 160

Leu Lys Val Asp Ala Arg Asn Val His Gly Tyr Ile Leu Gly Glu His
                165                 170                 175

Gly Asp Thr Glu Phe Pro Ala Trp Ser His Thr Thr Val Gly Gly Leu
            180                 185                 190

Pro Ile Thr Glu Trp Ile Ser Glu Asp Glu Gln Gly Ala Met Asp Thr
        195                 200                 205

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

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

Ala Ile Leu Asn Asn Glu Asn Ala Ile Leu Pro Leu Ser Val Tyr Leu
                245                 250                 255

Asp Gly His Tyr Gly Met Asn Asp Ile Tyr Ile Gly Ala Pro Ala Val
            260                 265                 270

Val Asn Arg Gln Gly Val Arg His Ile Val Glu Met Asn Leu Thr Asp
        275                 280                 285

Lys Glu Lys Glu Gln Met Lys Asn Ser Ala Asp Thr Leu Lys Lys Val
```

290 295 300

Leu Asp Asp Ala Met Lys Gln Val Asp
305 310

<210> 35
<211> 963
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Bacillus subtilis LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (963)

<400> 35

```
atg aac aaa cac gtg aat aaa gtg gcc ctg atc ggc gca ggc ttc gtc          48
Met Asn Lys His Val Asn Lys Val Ala Leu Ile Gly Ala Gly Phe Val
1               5                   10                  15

ggg agc tcg tac gcg ttc gcg ctg atc aac cag ggc atc acc gat gag          96
Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Leu Ile Asn Gln Gly Ile Thr Asp Glu
            20                  25                  30

ctg gta gtc atc gat gtt aac aaa gaa aag gcc atg ggg gat gtg atg         144
Leu Val Val Ile Asp Val Asn Lys Glu Lys Ala Met Gly Asp Val Met
        35                  40                  45

gac ttg aat cac ggc aag gcc ttt gcc ccg cag ccc gtc aag acg agc         192
Asp Leu Asn His Gly Lys Ala Phe Ala Pro Gln Pro Val Lys Thr Ser
    50                  55                  60

tat ggg acg tac gaa gat tgt aaa gac gcc gac atc gtg tgc atc tgc         240
Tyr Gly Thr Tyr Glu Asp Cys Lys Asp Ala Asp Ile Val Cys Ile Cys
65                  70                  75                  80

gct ggc gcc aat cag aag ccg gga gag act cgc ctg gag ctg gtc gag         288
Ala Gly Ala Asn Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Glu Leu Val Glu
                85                  90                  95

aag aac ctg aaa atc ttc aag ggc att gtg tcc gaa gtg atg gcc agc         336
Lys Asn Leu Lys Ile Phe Lys Gly Ile Val Ser Glu Val Met Ala Ser
            100                 105                 110

ggc ttc gac ggc atc ttc ctt atc gcc aca aac ccg gtc gac atc ctg         384
Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Ile Ala Thr Asn Pro Val Asp Ile Leu
        115                 120                 125

acc tat gcc acc tgg aag ttc tcg ggc ctc cct aag gaa cgc gtc atc         432
Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val Ile
    130                 135                 140

gga tct ggc acc acg ctc gac tcg gcg cgt ttc cgc tac atg ctc tcc         480
Gly Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Met Leu Ser
145                 150                 155                 160

gaa tac ttc ggc gct gcg ccc caa aac gtc cat gcc cac atc ata ggc         528
Glu Tyr Phe Gly Ala Ala Pro Gln Asn Val His Ala His Ile Ile Gly
```

```
                    165                 170                 175

gag cac ggc gac acc gag ctg ccg gtc tgg tcc cac gcg aac gtg ggt        576
Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser His Ala Asn Val Gly
                180                 185                 190

ggc gtc ccc gtg tcg gag ttg gtg gag aag aat gac gcg tat aag caa        624
Gly Val Pro Val Ser Glu Leu Val Glu Lys Asn Asp Ala Tyr Lys Gln
        195                 200                 205

gaa gaa ctg gac cag atc gtc gat gac gtg aag aac gcg gcc tac cat        672
Glu Glu Leu Asp Gln Ile Val Asp Asp Val Lys Asn Ala Ala Tyr His
    210                 215                 220

atc att gag aag aaa ggc gcg acc tac tac ggt gtc gca atg tcc ctg        720
Ile Ile Glu Lys Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Val Ala Met Ser Leu
225                 230                 235                 240

gcg cgg atc acc aag gcc atc ctg cat aac gag aat tca atc ctc acg        768
Ala Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu His Asn Glu Asn Ser Ile Leu Thr
                245                 250                 255

gtg agt acc tat ttg gac ggc cag tat ggg gcc gac gat gtc tac atc        816
Val Ser Thr Tyr Leu Asp Gly Gln Tyr Gly Ala Asp Asp Val Tyr Ile
            260                 265                 270

gga gtt cca gcg gta gtc aac cgg ggt ggc atc gcc ggg atc acc gaa        864
Gly Val Pro Ala Val Val Asn Arg Gly Gly Ile Ala Gly Ile Thr Glu
        275                 280                 285

ctc aac ctg aac gaa aag gaa aag gaa cag ttc ctg cac agc gcc ggt        912
Leu Asn Leu Asn Glu Lys Glu Lys Glu Gln Phe Leu His Ser Ala Gly
    290                 295                 300

gtg ctg aag aac att ctg aag ccg cat ttt gcc gag cag aaa gtg aac        960
Val Leu Lys Asn Ile Leu Lys Pro His Phe Ala Glu Gln Lys Val Asn
305                 310                 315                 320

taa                                                                    963
```

<210> 36
<211> 320
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 36

```
Met Asn Lys His Val Asn Lys Val Ala Leu Ile Gly Ala Gly Phe Val
1               5                   10                  15

Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Leu Ile Asn Gln Gly Ile Thr Asp Glu
            20                  25                  30

Leu Val Val Ile Asp Val Asn Lys Glu Lys Ala Met Gly Asp Val Met
        35                  40                  45
```

```
Asp Leu Asn His Gly Lys Ala Phe Ala Pro Gln Pro Val Lys Thr Ser
    50                  55                  60

Tyr Gly Thr Tyr Glu Asp Cys Lys Asp Ala Asp Ile Val Cys Ile Cys
65                  70                  75                  80

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

Lys Asn Leu Lys Ile Phe Lys Gly Ile Val Ser Glu Val Met Ala Ser
            100                 105                 110

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

Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val Ile
    130                 135                 140

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

Glu Tyr Phe Gly Ala Ala Pro Gln Asn Val His Ala His Ile Ile Gly
                165                 170                 175

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

Gly Val Pro Val Ser Glu Leu Val Glu Lys Asn Asp Ala Tyr Lys Gln
        195                 200                 205

Glu Glu Leu Asp Gln Ile Val Asp Asp Val Lys Asn Ala Ala Tyr His
    210                 215                 220

Ile Ile Glu Lys Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Val Ala Met Ser Leu
225                 230                 235                 240

Ala Arg Ile Thr Lys Ala Ile Leu His Asn Glu Asn Ser Ile Leu Thr
                245                 250                 255

Val Ser Thr Tyr Leu Asp Gly Gln Tyr Gly Ala Asp Asp Val Tyr Ile
            260                 265                 270

Gly Val Pro Ala Val Val Asn Arg Gly Gly Ile Ala Gly Ile Thr Glu
        275                 280                 285

Leu Asn Leu Asn Glu Lys Glu Lys Glu Gln Phe Leu His Ser Ala Gly
    290                 295                 300
```

Val Leu Lys Asn Ile Leu Lys Pro His Phe Ala Glu Gln Lys Val Asn
305 310 315 320

<210> 37
<211> 945
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Enterococcus feecium LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (945)

<400> 37

```
atg aag aaa acg agc cgc aaa gtc gtg atc gtc ggg acc ggc ttc gtc      48
Met Lys Lys Thr Ser Arg Lys Val Val Ile Val Gly Thr Gly Phe Val
1               5                  10                  15

ggc acc tcc atc gct tac gcc atg atc aat cag ggt att tcg aac gaa      96
Gly Thr Ser Ile Ala Tyr Ala Met Ile Asn Gln Gly Ile Ser Asn Glu
            20                  25                  30

ctg gtg ctg atc gac gtg aat cag gaa aag gcc gaa ggt gag gca ctg     144
Leu Val Leu Ile Asp Val Asn Gln Glu Lys Ala Glu Gly Glu Ala Leu
        35                  40                  45

gat ctg ctg gat ggc atg gcc tgg ggc gac gag aac gtg gcg gtc tgg     192
Asp Leu Leu Asp Gly Met Ala Trp Gly Asp Glu Asn Val Ala Val Trp
    50                  55                  60

agc ggt ggc tat gaa gag tgc aaa gac gcc gac att gtg gtc gtc acc     240
Ser Gly Gly Tyr Glu Glu Cys Lys Asp Ala Asp Ile Val Val Val Thr
65                  70                  75                  80

gcc ggt atc aac caa aag ccg gga cag tct agg ttg gat ctg gtc aag     288
Ala Gly Ile Asn Gln Lys Pro Gly Gln Ser Arg Leu Asp Leu Val Lys
                85                  90                  95

acg aat gcc tcc atc atg cgg cag atc gtc aaa gaa atc atg ggg tcc     336
Thr Asn Ala Ser Ile Met Arg Gln Ile Val Lys Glu Ile Met Gly Ser
            100                 105                 110

gga ttc gac ggc atc atc gtg gtg gcg tcg aac cct gta gac atc ctc     384
Gly Phe Asp Gly Ile Ile Val Val Ala Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu
        115                 120                 125

acc tac atc gcg tgg aac gag tcc ggg ctg ccg acg agc cgg gtg atc     432
Thr Tyr Ile Ala Trp Asn Glu Ser Gly Leu Pro Thr Ser Arg Val Ile
    130                 135                 140

ggg acg ggc acg acc ctg gac acc acc cgg ttc cgg aag gaa atc gcg     480
Gly Thr Gly Thr Thr Leu Asp Thr Thr Arg Phe Arg Lys Glu Ile Ala
145                 150                 155                 160

ctc aag ctc aag gtc gac ccc cgc tcg gtc cat ggc tat atc ctg ggc     528
Leu Lys Leu Lys Val Asp Pro Arg Ser Val His Gly Tyr Ile Leu Gly
                165                 170                 175
```

```
gag cat ggc gac agc gaa gtg gcg gcc tgg agc cac aca acg gtg ggc        576
Glu His Gly Asp Ser Glu Val Ala Ala Trp Ser His Thr Thr Val Gly
            180                 185                 190

ggc aag ccc gtc ttt gag atc gtt gaa aag gac cac cgt atc gcg aaa        624
Gly Lys Pro Val Phe Glu Ile Val Glu Lys Asp His Arg Ile Ala Lys
        195                 200                 205

gac gag ttg gat gtc ata gcc gat aag gtc cgc aac gcg gcc tat gaa        672
Asp Glu Leu Asp Val Ile Ala Asp Lys Val Arg Asn Ala Ala Tyr Glu
    210                 215                 220

atc atc gac cgc aag aaa gcc acc tac tac ggg atc ggc atg tcg acc        720
Ile Ile Asp Arg Lys Lys Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Met Ser Thr
225                 230                 235                 240

gcg cgg atc gtg aag gcc ata ctg aat aac gaa cag gcc gtg ctg ccg        768
Ala Arg Ile Val Lys Ala Ile Leu Asn Asn Glu Gln Ala Val Leu Pro
                245                 250                 255

gtt tca gct tac ctg acc gga gag tac aac gag aaa gac atc ttc acc        816
Val Ser Ala Tyr Leu Thr Gly Glu Tyr Asn Glu Lys Asp Ile Phe Thr
            260                 265                 270

ggc gtt ccg tcg atc gtg gat gag aac ggc gtg cga gaa gtc gtg gag        864
Gly Val Pro Ser Ile Val Asp Glu Asn Gly Val Arg Glu Val Val Glu
        275                 280                 285

ctc agt att aac gaa gaa gag aaa gcg atg ttc tcc aag agc acc tcc        912
Leu Ser Ile Asn Glu Glu Glu Lys Ala Met Phe Ser Lys Ser Thr Ser
    290                 295                 300

gca ctt cgc gag gta ctg aac act gtc ctc taa                            945
Ala Leu Arg Glu Val Leu Asn Thr Val Leu
305                 310
```

<210> 38
<211> 314
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintétic

<400> 38

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

Gly Thr Ser Ile Ala Tyr Ala Met Ile Asn Gln Gly Ile Ser Asn Glu
            20                  25                  30

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

Asp Leu Leu Asp Gly Met Ala Trp Gly Asp Glu Asn Val Ala Val Trp
    50                  55                  60
```

```
Ser Gly Gly Tyr Glu Glu Cys Lys Asp Ala Asp Ile Val Val Val Thr
65                  70                  75                  80

Ala Gly Ile Asn Gln Lys Pro Gly Gln Ser Arg Leu Asp Leu Val Lys
                85                  90                  95

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

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

Thr Tyr Ile Ala Trp Asn Glu Ser Gly Leu Pro Thr Ser Arg Val Ile
    130                 135                 140

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

Leu Lys Leu Lys Val Asp Pro Arg Ser Val His Gly Tyr Ile Leu Gly
                165                 170                 175

Glu His Gly Asp Ser Glu Val Ala Ala Trp Ser His Thr Thr Val Gly
            180                 185                 190

Gly Lys Pro Val Phe Glu Ile Val Glu Lys Asp His Arg Ile Ala Lys
        195                 200                 205

Asp Glu Leu Asp Val Ile Ala Asp Lys Val Arg Asn Ala Ala Tyr Glu
    210                 215                 220

Ile Ile Asp Arg Lys Lys Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Met Ser Thr
225                 230                 235                 240

Ala Arg Ile Val Lys Ala Ile Leu Asn Asn Glu Gln Ala Val Leu Pro
                245                 250                 255

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

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

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

Ala Leu Arg Glu Val Leu Asn Thr Val Leu
305                 310
```

<210> 39
<211> 951
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Bacillus t huriengensis LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (951)

<400> 39

```
atg aaa cgg cat acc cgg aaa ata gcc atc atc ggc acg ggc ctg gtg          48
Met Lys Arg His Thr Arg Lys Ile Ala Ile Ile Gly Thr Gly Leu Val
1               5                   10                  15

ggg tcc agc tgc gca tac tcc atc gtc aac cag ggt atc tgc gag gaa          96
Gly Ser Ser Cys Ala Tyr Ser Ile Val Asn Gln Gly Ile Cys Glu Glu
            20                  25                  30

ctc ctg ctg atc gac atc aac cac gag cgc gct gtc ggc gag gcg atg         144
Leu Leu Leu Ile Asp Ile Asn His Glu Arg Ala Val Gly Glu Ala Met
        35                  40                  45

gat ctc tcc cat tgc atc aac ttc acg aac acg cgc acc aag gtg tac         192
Asp Leu Ser His Cys Ile Asn Phe Thr Asn Thr Arg Thr Lys Val Tyr
    50                  55                  60

gcg ggg tcg tac gaa gat tgt aaa gac atg gac atc gtt atc att acc         240
Ala Gly Ser Tyr Glu Asp Cys Lys Asp Met Asp Ile Val Ile Ile Thr
65                  70                  75                  80

gcg ggt ccg gca ccc aag cct ggc cag tcg cgg ctg gat acg ttg ggc         288
Ala Gly Pro Ala Pro Lys Pro Gly Gln Ser Arg Leu Asp Thr Leu Gly
                85                  90                  95

gcc tcc gcc aag atc atg gag agc gtt gtg ggt gga gtc atg gaa tcg         336
Ala Ser Ala Lys Ile Met Glu Ser Val Val Gly Gly Val Met Glu Ser
            100                 105                 110

ggg ttt gac ggc atc ttc ctt ctc gcc agt aat ccg gtg gac atc atc         384
Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Leu Ala Ser Asn Pro Val Asp Ile Ile
        115                 120                 125

acc tat caa gtc tgg aag ttg tcg ggc ctc ccc agg aat cga gtg atc         432
Thr Tyr Gln Val Trp Lys Leu Ser Gly Leu Pro Arg Asn Arg Val Ile
    130                 135                 140

ggg acc ggc acc agc ctg gac agc tca cgg ctg cgt acc atc ctg tcg         480
Gly Thr Gly Thr Ser Leu Asp Ser Ser Arg Leu Arg Thr Ile Leu Ser
145                 150                 155                 160

gaa atg ctg cac gtc gat ccg cgc agc atc cac ggc tac agc ctc ggc         528
Glu Met Leu His Val Asp Pro Arg Ser Ile His Gly Tyr Ser Leu Gly
                165                 170                 175

gag cac ggc gac tcg cag atg gtc gcc tgg agt cac gtc acc gtc ggc         576
Glu His Gly Asp Ser Gln Met Val Ala Trp Ser His Val Thr Val Gly
            180                 185                 190
```

```
gga aag ccc atc ctg cag atc ctc gaa gaa cag aaa gag cgt ttc ggc        624
Gly Lys Pro Ile Leu Gln Ile Leu Glu Glu Gln Lys Glu Arg Phe Gly
        195                 200                 205

gag att gac ctg gac gag atc gtg gaa aag act gcc aag gcc ggt tgg        672
Glu Ile Asp Leu Asp Glu Ile Val Glu Lys Thr Ala Lys Ala Gly Trp
    210                 215                 220

gag atc tat aag cgc aag ggg aca acg tac tat ggc atc ggc aac tcc        720
Glu Ile Tyr Lys Arg Lys Gly Thr Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Asn Ser
225                 230                 235                 240

ctg gcc tat atc gcg tcg tct atc ttc aac gac gac cat cgc gta atc        768
Leu Ala Tyr Ile Ala Ser Ser Ile Phe Asn Asp Asp His Arg Val Ile
                245                 250                 255

gcg gtg agc gcc atc ctg gac ggc gag tac ggt gaa tac gat att tgc        816
Ala Val Ser Ala Ile Leu Asp Gly Glu Tyr Gly Glu Tyr Asp Ile Cys
            260                 265                 270

acc ggc gtg ccg gcc att atc acc cgg gat gga ata cgc gaa gtc gtg        864
Thr Gly Val Pro Ala Ile Ile Thr Arg Asp Gly Ile Arg Glu Val Val
        275                 280                 285

gag ttg aac ctg acg gaa gat gaa gag tcc cgg ttc gcg aag tcc aat        912
Glu Leu Asn Leu Thr Glu Asp Glu Glu Ser Arg Phe Ala Lys Ser Asn
    290                 295                 300

gac atc ctg cgc gac tat atg aaa acc atc ggc tac taa                  951
Asp Ile Leu Arg Asp Tyr Met Lys Thr Ile Gly Tyr
305                 310                 315
```

<210> 40
<211> 316
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 40

```
Met Lys Arg His Thr Arg Lys Ile Ala Ile Ile Gly Thr Gly Leu Val
1               5                   10                  15

Gly Ser Ser Cys Ala Tyr Ser Ile Val Asn Gln Gly Ile Cys Glu Glu
            20                  25                  30

Leu Leu Leu Ile Asp Ile Asn His Glu Arg Ala Val Gly Glu Ala Met
        35                  40                  45

Asp Leu Ser His Cys Ile Asn Phe Thr Asn Thr Arg Thr Lys Val Tyr
    50                  55                  60

Ala Gly Ser Tyr Glu Asp Cys Lys Asp Met Asp Ile Val Ile Ile Thr
65                  70                  75                  80
```

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

Ala Ser Ala Lys Ile Met Glu Ser Val Val Gly Gly Val Met Glu Ser
            100                 105                 110

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

Thr Tyr Gln Val Trp Lys Leu Ser Gly Leu Pro Arg Asn Arg Val Ile
    130                 135                 140

Gly Thr Gly Thr Ser Leu Asp Ser Ser Arg Leu Arg Thr Ile Leu Ser
145                 150                 155                 160

Glu Met Leu His Val Asp Pro Arg Ser Ile His Gly Tyr Ser Leu Gly
                165                 170                 175

Glu His Gly Asp Ser Gln Met Val Ala Trp Ser His Val Thr Val Gly
            180                 185                 190

Gly Lys Pro Ile Leu Gln Ile Leu Glu Glu Gln Lys Glu Arg Phe Gly
        195                 200                 205

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

Glu Ile Tyr Lys Arg Lys Gly Thr Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Asn Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ala Tyr Ile Ala Ser Ser Ile Phe Asn Asp Asp His Arg Val Ile
                245                 250                 255

Ala Val Ser Ala Ile Leu Asp Gly Glu Tyr Gly Glu Tyr Asp Ile Cys
            260                 265                 270

Thr Gly Val Pro Ala Ile Ile Thr Arg Asp Gly Ile Arg Glu Val Val
        275                 280                 285

Glu Leu Asn Leu Thr Glu Asp Glu Glu Ser Arg Phe Ala Lys Ser Asn
    290                 295                 300

Asp Ile Leu Arg Asp Tyr Met Lys Thr Ile Gly Tyr
305                 310                 315
```

<210> 41
<211> 954
<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Geobacillus stearothermophilus LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (954)

<400> 41

```
atg aag aat aat ggt ggc gca agg gta gtg gta atc gga gcg ggg ttt   48
Met Lys Asn Asn Gly Gly Ala Arg Val Val Val Ile Gly Ala Gly Phe
1               5                  10                  15

gtg gga gcg tct tat gtg ttc gcg ctc atg aac cag ggc atc gcc gac   96
Val Gly Ala Ser Tyr Val Phe Ala Leu Met Asn Gln Gly Ile Ala Asp
            20                  25                  30

gag atc gtg ctc atc gac gcc aac gag agc aag gct atc ggc gat gcg  144
Glu Ile Val Leu Ile Asp Ala Asn Glu Ser Lys Ala Ile Gly Asp Ala
        35                  40                  45

atg gac ttc aat cat ggc aag gtc ttt gcg ccc aaa ccg gtg gat atc  192
Met Asp Phe Asn His Gly Lys Val Phe Ala Pro Lys Pro Val Asp Ile
    50                  55                  60

tgg cac ggt gac tac gat gac tgc cgg gac gcc gac ctg gtt gtc atc  240
Trp His Gly Asp Tyr Asp Asp Cys Arg Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

tgc gct ggc gct aac caa aag ccc ggg gaa acc cgg ctg gac ttg gtc  288
Cys Ala Gly Ala Asn Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu Val
                85                  90                  95

gat aag aac atc gcg att ttc cga agc atc gtg gag tcc gtc atg gcg  336
Asp Lys Asn Ile Ala Ile Phe Arg Ser Ile Val Glu Ser Val Met Ala
            100                 105                 110

tcg ggc ttc cag ggc ctg ttc ctg gtg gcc aca aac ccg gtc gac ata  384
Ser Gly Phe Gln Gly Leu Phe Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Asp Ile
        115                 120                 125

ctc acg tat gcc acc tgg aag ttc tcc gga ctg ccg cac gaa cgg gtc  432
Leu Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro His Glu Arg Val
    130                 135                 140

atc ggg agc ggt acg att ctg gac acg gca cgc ttc cgc ttc ctg ttg  480
Ile Gly Ser Gly Thr Ile Leu Asp Thr Ala Arg Phe Arg Phe Leu Leu
145                 150                 155                 160

ggc gag tac ttc tcg gtc gcc cct cag aac gtc cat gcc tac atc atc  528
Gly Glu Tyr Phe Ser Val Ala Pro Gln Asn Val His Ala Tyr Ile Ile
                165                 170                 175

ggc gag cac ggc gat acc gaa ctg cca gtg tgg tcg cag gcc tat atc  576
Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser Gln Ala Tyr Ile
            180                 185                 190

ggc gtc atg ccc atc cgc aaa ctg gtg gag tcg aag ggc gaa gaa gcc  624
Gly Val Met Pro Ile Arg Lys Leu Val Glu Ser Lys Gly Glu Glu Ala
        195                 200                 205
```

```
cag aaa gac ctg gaa cgc atc ttc gtc aat gtg cgc gat gca gcg tac        672
Gln Lys Asp Leu Glu Arg Ile Phe Val Asn Val Arg Asp Ala Ala Tyr
    210                 215                 220

cag atc att gaa aag aaa ggg gcc acc tat tac ggg atc gcg atg ggc        720
Gln Ile Ile Glu Lys Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala Met Gly
225                 230                 235                 240

ctc gcc cgt gtc act cgg gcg atc ctc cac aac gag aac gcc atc ttg        768
Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Ile Leu His Asn Glu Asn Ala Ile Leu
                245                 250                 255

acc gtc agc gcc tat ctg gac ggc ctt tac ggc gaa cgc gac gtg tac        816
Thr Val Ser Ala Tyr Leu Asp Gly Leu Tyr Gly Glu Arg Asp Val Tyr
            260                 265                 270

atc ggc gtt ccg gcc gtg atc aat cgg aac ggt atc cgc gag gtg atc        864
Ile Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Asn Gly Ile Arg Glu Val Ile
        275                 280                 285

gaa atc gag ctc aac gat gac gag aaa aac cgg ttc cat cac agt gcg        912
Glu Ile Glu Leu Asn Asp Asp Glu Lys Asn Arg Phe His His Ser Ala
    290                 295                 300

gcc acc ctg aag tcc gtc ctg gcc cgt gcc ttc acc cgc taa                954
Ala Thr Leu Lys Ser Val Leu Ala Arg Ala Phe Thr Arg
305                 310                 315
```

<210>42
<211> 317
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 42

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

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

Glu Ile Val Leu Ile Asp Ala Asn Glu Ser Lys Ala Ile Gly Asp Ala
        35                  40                  45

Met Asp Phe Asn His Gly Lys Val Phe Ala Pro Lys Pro Val Asp Ile
    50                  55                  60

Trp His Gly Asp Tyr Asp Asp Cys Arg Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

Cys Ala Gly Ala Asn Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu Val
                85                  90                  95
```

```
Asp Lys Asn Ile Ala Ile Phe Arg Ser Ile Val Glu Ser Val Met Ala
            100                 105                 110

Ser Gly Phe Gln Gly Leu Phe Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Asp Ile
        115                 120                 125

Leu Thr Tyr Ala Thr Trp Lys Phe Ser Gly Leu Pro His Glu Arg Val
    130                 135                 140

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

Gly Glu Tyr Phe Ser Val Ala Pro Gln Asn Val His Ala Tyr Ile Ile
                165                 170                 175

Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser Gln Ala Tyr Ile
            180                 185                 190

Gly Val Met Pro Ile Arg Lys Leu Val Glu Ser Lys Gly Glu Glu Ala
        195                 200                 205

Gln Lys Asp Leu Glu Arg Ile Phe Val Asn Val Arg Asp Ala Ala Tyr
    210                 215                 220

Gln Ile Ile Glu Lys Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Ala Met Gly
225                 230                 235                 240

Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Ile Leu His Asn Glu Asn Ala Ile Leu
                245                 250                 255

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

Ile Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Asn Gly Ile Arg Glu Val Ile
        275                 280                 285

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

Ala Thr Leu Lys Ser Val Leu Ala Arg Ala Phe Thr Arg
305                 310                 315
```

<210> 43
<211> 915
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética (Deinococcus radiodurans LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (915)

<400> 43

```
atg aaa gtc ggg gta gtc ggt acg gga ttt gta ggt tca aca gca gcg          48
Met Lys Val Gly Val Val Gly Thr Gly Phe Val Gly Ser Thr Ala Ala
1               5                   10                  15

ttc gct ctt gtt ctc agg ggc agc tgc agc gaa ctg gtg ctc gtc gac          96
Phe Ala Leu Val Leu Arg Gly Ser Cys Ser Glu Leu Val Leu Val Asp
            20                  25                  30

cgc gat gaa gat cgg gcc caa gcg gaa gcc gag gac atc gcg cac gcc         144
Arg Asp Glu Asp Arg Ala Gln Ala Glu Ala Glu Asp Ile Ala His Ala
        35                  40                  45

gcc ccg gtg agt cac ggc acc cgc gtg tgg cat ggc ggc cac tcg gaa         192
Ala Pro Val Ser His Gly Thr Arg Val Trp His Gly Gly His Ser Glu
    50                  55                  60

ctc gcg gac gcc cag gtc gtg att ctg acc gca ggc gcc aac cag aaa         240
Leu Ala Asp Ala Gln Val Val Ile Leu Thr Ala Gly Ala Asn Gln Lys
65                  70                  75                  80

ccg ggc gag agc cgg ctg gac ctg ttg gag aag aac gcg gac atc ttc         288
Pro Gly Glu Ser Arg Leu Asp Leu Leu Glu Lys Asn Ala Asp Ile Phe
                85                  90                  95

cgc gag ctc gtc ccc cag atc acc cgt gcg gct ccc gac gcg gtc ttg         336
Arg Glu Leu Val Pro Gln Ile Thr Arg Ala Ala Pro Asp Ala Val Leu
            100                 105                 110

ctc gtg acc agc aac cct gtc gat ctg ttg acc gac ctg gcc act cag         384
Leu Val Thr Ser Asn Pro Val Asp Leu Leu Thr Asp Leu Ala Thr Gln
        115                 120                 125

ctg gca ccc ggc cag ccg gtg ata ggc tcc ggc acg gtc ctc gac tct         432
Leu Ala Pro Gly Gln Pro Val Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser
    130                 135                 140

gcc cgg ttc cga cat ctg atg gcc caa cac gcc ggg gtc gac gga acc         480
Ala Arg Phe Arg His Leu Met Ala Gln His Ala Gly Val Asp Gly Thr
145                 150                 155                 160

cat gca cac ggt tat gtg ctg ggc gag cac ggc gat tcc gaa gtg ctg         528
His Ala His Gly Tyr Val Leu Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Val Leu
                165                 170                 175

gcc tgg tcg tcc gcc atg gtg gcc ggc atg cca gtg gcg gac ttc atg         576
Ala Trp Ser Ser Ala Met Val Ala Gly Met Pro Val Ala Asp Phe Met
            180                 185                 190

cag gcc cag aac ctc ccg tgg aat gaa cag gtt cgc gcg aag atc gac         624
Gln Ala Gln Asn Leu Pro Trp Asn Glu Gln Val Arg Ala Lys Ile Asp
        195                 200                 205

gaa ggc acc cgt aat gcg gcc gcg tcg atc atc gag ggc aaa cgc gcc         672
Glu Gly Thr Arg Asn Ala Ala Ala Ser Ile Ile Glu Gly Lys Arg Ala
    210                 215                 220
```

```
acc tat tac ggc atc ggt gcc gcg ctg gcc cgg atc acc gag gcc gtc        720
Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Ala Ala Leu Ala Arg Ile Thr Glu Ala Val
225                 230                 235                 240

ctg cgc gat cgc cgt gcc gtg ctg acc gtc agc gct ccg acg ccg gag        768
Leu Arg Asp Arg Arg Ala Val Leu Thr Val Ser Ala Pro Thr Pro Glu
                245                 250                 255

tac gga gtg agc ctg tcc ctt ccc cgg gtg gtc gga cgc cag ggc gtc        816
Tyr Gly Val Ser Leu Ser Leu Pro Arg Val Val Gly Arg Gln Gly Val
            260                 265                 270

ttg tcg acg ctc cat ccg aag ctg acg ggg gat gag cag cag aag ctg        864
Leu Ser Thr Leu His Pro Lys Leu Thr Gly Asp Glu Gln Gln Lys Leu
        275                 280                 285

gaa cag tcg gcg ggt gtc ctg cgg ggg ttc aag caa cag ctg ggg ctg        912
Glu Gln Ser Ala Gly Val Leu Arg Gly Phe Lys Gln Gln Leu Gly Leu
    290                 295                 300

taa                                                                    915
```

<210> 44
<211 > 304
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 44

```
Met Lys Val Gly Val Val Gly Thr Gly Phe Val Gly Ser Thr Ala Ala
1               5                  10                  15

Phe Ala Leu Val Leu Arg Gly Ser Cys Ser Glu Leu Val Leu Val Asp
            20                  25                  30

Arg Asp Glu Asp Arg Ala Gln Ala Glu Ala Glu Asp Ile Ala His Ala
        35                  40                  45

Ala Pro Val Ser His Gly Thr Arg Val Trp His Gly Gly His Ser Glu
    50                  55                  60

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

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

Arg Glu Leu Val Pro Gln Ile Thr Arg Ala Ala Pro Asp Ala Val Leu
            100                 105                 110

Leu Val Thr Ser Asn Pro Val Asp Leu Leu Thr Asp Leu Ala Thr Gln
        115                 120                 125
```

```
Leu Ala Pro Gly Gln Pro Val Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser
    130                 135                 140

Ala Arg Phe Arg His Leu Met Ala Gln His Ala Gly Val Asp Gly Thr
145                 150                 155                 160

His Ala His Gly Tyr Val Leu Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Val Leu
                165                 170                 175

Ala Trp Ser Ser Ala Met Val Ala Gly Met Pro Val Ala Asp Phe Met
            180                 185                 190

Gln Ala Gln Asn Leu Pro Trp Asn Glu Gln Val Arg Ala Lys Ile Asp
        195                 200                 205

Glu Gly Thr Arg Asn Ala Ala Ala Ser Ile Ile Glu Gly Lys Arg Ala
    210                 215                 220

Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Ala Ala Leu Ala Arg Ile Thr Glu Ala Val
225                 230                 235                 240

Leu Arg Asp Arg Arg Ala Val Leu Thr Val Ser Ala Pro Thr Pro Glu
                245                 250                 255

Tyr Gly Val Ser Leu Ser Leu Pro Arg Val Val Gly Arg Gln Gly Val
            260                 265                 270

Leu Ser Thr Leu His Pro Lys Leu Thr Gly Asp Glu Gln Gln Lys Leu
        275                 280                 285

Glu Gln Ser Ala Gly Val Leu Arg Gly Phe Lys Gln Gln Leu Gly Leu
    290                 295                 300
```

<210> 45
<211> 948
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (variante LDH de Plasmodium ovale)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (948)

<400> 45

```
atg gca cct aaa ccc aaa att gta cta gtc gga agc ggc atg atc ggc        48
Met Ala Pro Lys Pro Lys Ile Val Leu Val Gly Ser Gly Met Ile Gly
1               5                   10                  15
```

```
gga gta atg gca acc ctc atc gtc cag aag aat ctg ggc gat gtc gtc          96
Gly Val Met Ala Thr Leu Ile Val Gln Lys Asn Leu Gly Asp Val Val
            20                  25                  30

atg ttc gat atc gtc aag aac atg ccc ctc ggc aag gcc ctg gac acc         144
Met Phe Asp Ile Val Lys Asn Met Pro Leu Gly Lys Ala Leu Asp Thr
        35                  40                  45

tca cat acc aac gtg atg gcc tac tcc aac tgc cag gtg acc ggc agc         192
Ser His Thr Asn Val Met Ala Tyr Ser Asn Cys Gln Val Thr Gly Ser
    50                  55                  60

aat acc tac gag gac ttg aag ggt gcg gac gtg gtg gtg aca gcc ggc         240
Asn Thr Tyr Glu Asp Leu Lys Gly Ala Asp Val Val Val Thr Ala Gly
65                  70                  75                  80

ttc acg aag gct ccg ggc aag tcc gac aag gaa tgg aac cgc gac gat         288
Phe Thr Lys Ala Pro Gly Lys Ser Asp Lys Glu Trp Asn Arg Asp Asp
                85                  90                  95

ctg ctc ccg ctg aat aac aag att atg atc gag atc ggc ggt cac atc         336
Leu Leu Pro Leu Asn Asn Lys Ile Met Ile Glu Ile Gly Gly His Ile
            100                 105                 110

aag aac tat tgt ccg aac gcg ttc atc atc gtg gtc act aac cca gcc         384
Lys Asn Tyr Cys Pro Asn Ala Phe Ile Ile Val Val Thr Asn Pro Ala
        115                 120                 125

gac gtg atg gtg cag ctg ctg cac cag cat agc ggc gtg agc aag aac         432
Asp Val Met Val Gln Leu Leu His Gln His Ser Gly Val Ser Lys Asn
    130                 135                 140

aag atc gtc ggc ctg ggt ggt gtg ctg gat acc tcc cgg ctg aag tat         480
Lys Ile Val Gly Leu Gly Gly Val Leu Asp Thr Ser Arg Leu Lys Tyr
145                 150                 155                 160

tac atc tcg cag aag ctc aat gtc tgc ccc cgt gac gtc aac gcg cac         528
Tyr Ile Ser Gln Lys Leu Asn Val Cys Pro Arg Asp Val Asn Ala His
                165                 170                 175

atc gtc ggg gcg cac ggg aac aaa atg gtc gtt ctg aag cgc tat atc         576
Ile Val Gly Ala His Gly Asn Lys Met Val Val Leu Lys Arg Tyr Ile
            180                 185                 190

acc gtg ggg ggc atc ccg ctg caa gag ttc atc aac aac aaa aag atc         624
Thr Val Gly Gly Ile Pro Leu Gln Glu Phe Ile Asn Asn Lys Lys Ile
        195                 200                 205

acc gac gcc gag ctc gat gcg ata ttc gat cgg acg gtc aat acg gcc         672
Thr Asp Ala Glu Leu Asp Ala Ile Phe Asp Arg Thr Val Asn Thr Ala
    210                 215                 220

ctt gag atc gtc aac tac cac gcc agt ccg tac gtg gct ccg gcc gcg         720
Leu Glu Ile Val Asn Tyr His Ala Ser Pro Tyr Val Ala Pro Ala Ala
225                 230                 235                 240

gcc atc atc gag atg gcc gag tcg tat ttg aaa gac ctg aaa aaa gtg         768
Ala Ile Ile Glu Met Ala Glu Ser Tyr Leu Lys Asp Leu Lys Lys Val
                245                 250                 255

ctg att tgc tcg acc ctg ttg gaa ggc cag tac ggc cat acg ggc gtg         816
Leu Ile Cys Ser Thr Leu Leu Glu Gly Gln Tyr Gly His Thr Gly Val
```

```
                260                 265                 270

ttt ggc ggg acg ccc ctg gtc ctc gga tgc aat ggc gtc gaa cag gtt        864
Phe Gly Gly Thr Pro Leu Val Leu Gly Cys Asn Gly Val Glu Gln Val
        275                 280                 285

ttc gaa ctc cag ctg aac gcg gaa gaa aag aaa atg ttc gac gac gcc        912
Phe Glu Leu Gln Leu Asn Ala Glu Glu Lys Lys Met Phe Asp Asp Ala
    290                 295                 300

atc gcc gaa acc aag cgc atg aag gcc ctg gcg taa                       948
Ile Ala Glu Thr Lys Arg Met Lys Ala Leu Ala
305                 310                 315
```

<210> 46
<211> 315
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 46

```
Met Ala Pro Lys Pro Lys Ile Val Leu Val Gly Ser Gly Met Ile Gly
1               5                  10                  15

Gly Val Met Ala Thr Leu Ile Val Gln Lys Asn Leu Gly Asp Val Val
            20                  25                  30

Met Phe Asp Ile Val Lys Asn Met Pro Leu Gly Lys Ala Leu Asp Thr
        35                  40                  45

Ser His Thr Asn Val Met Ala Tyr Ser Asn Cys Gln Val Thr Gly Ser
    50                  55                  60

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

Phe Thr Lys Ala Pro Gly Lys Ser Asp Lys Glu Trp Asn Arg Asp Asp
                85                  90                  95

Leu Leu Pro Leu Asn Asn Lys Ile Met Ile Glu Ile Gly Gly His Ile
            100                 105                 110

Lys Asn Tyr Cys Pro Asn Ala Phe Ile Ile Val Val Thr Asn Pro Ala
        115                 120                 125

Asp Val Met Val Gln Leu Leu His Gln His Ser Gly Val Ser Lys Asn
    130                 135                 140

Lys Ile Val Gly Leu Gly Gly Val Leu Asp Thr Ser Arg Leu Lys Tyr
145                 150                 155                 160
```

```
Tyr Ile Ser Gln Lys Leu Asn Val Cys Pro Arg Asp Val Asn Ala His
                165                 170                 175

Ile Val Gly Ala His Gly Asn Lys Met Val Val Leu Lys Arg Tyr Ile
            180                 185                 190

Thr Val Gly Gly Ile Pro Leu Gln Glu Phe Ile Asn Asn Lys Lys Ile
        195                 200                 205

Thr Asp Ala Glu Leu Asp Ala Ile Phe Asp Arg Thr Val Asn Thr Ala
    210                 215                 220

Leu Glu Ile Val Asn Tyr His Ala Ser Pro Tyr Val Ala Pro Ala Ala
225                 230                 235                 240

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

Leu Ile Cys Ser Thr Leu Leu Glu Gly Gln Tyr Gly His Thr Gly Val
            260                 265                 270

Phe Gly Gly Thr Pro Leu Val Leu Gly Cys Asn Gly Val Glu Gln Val
        275                 280                 285

Phe Glu Leu Gln Leu Asn Ala Glu Glu Lys Lys Met Phe Asp Asp Ala
    290                 295                 300

Ile Ala Glu Thr Lys Arg Met Lys Ala Leu Ala
305                 310                 315
```

<210> 47
<211> 933
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética (Thermus thermophilus LDH)

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (933)

<400> 47

```
atg aaa gta gga ata gtc ggc tct gga atg gtt gga tcg gca acg gca   48
Met Lys Val Gly Ile Val Gly Ser Gly Met Val Gly Ser Ala Thr Ala
1               5                   10                  15

tac gca ctc gca ctc ctc ggc gtg gcg cgg gaa gtc gtg ctg gtc gat   96
Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Gly Val Ala Arg Glu Val Val Leu Val Asp
            20                  25                  30
```

```
ctc gac cgc aag ctg gcg cag gcc cat gcc gag gat atc ctg cac gcg        144
Leu Asp Arg Lys Leu Ala Gln Ala His Ala Glu Asp Ile Leu His Ala
        35                  40                  45

acc ccg ttc gcg cat ccc gtg tgg gtc cgt gcc ggc agc tat ggc gac        192
Thr Pro Phe Ala His Pro Val Trp Val Arg Ala Gly Ser Tyr Gly Asp
    50                  55                  60

ctg gaa ggg gcg aga gcg gtc gtc ctg gcg gcc ggg gtg gcc cag cgg        240
Leu Glu Gly Ala Arg Ala Val Val Leu Ala Ala Gly Val Ala Gln Arg
65                  70                  75                  80

cca ggc gaa acc cgc ctc cag ctg ctc gat cgc aac gcc cag gtg ttt        288
Pro Gly Glu Thr Arg Leu Gln Leu Leu Asp Arg Asn Ala Gln Val Phe
                85                  90                  95

gcc caa gtg gta ccg cgg gtt ctg gaa gct gcc ccc gaa gcc gtg ttg        336
Ala Gln Val Val Pro Arg Val Leu Glu Ala Ala Pro Glu Ala Val Leu
            100                 105                 110

ctg gtc gcc acc aat ccc gtc gac gtg atg acc cag gtc gcc tac cgc        384
Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Asp Val Met Thr Gln Val Ala Tyr Arg
        115                 120                 125

ctg agc ggt ctg ccg ccg gga agg gtc gtg ggg agc ggc acg atc ctg        432
Leu Ser Gly Leu Pro Pro Gly Arg Val Val Gly Ser Gly Thr Ile Leu
    130                 135                 140

gac aca gcg cgg ttc cgg gcc ttg ctt gcc gag tat ctg cgg gtg gct        480
Asp Thr Ala Arg Phe Arg Ala Leu Leu Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala
145                 150                 155                 160

ccg cag tcg gtc cac gcg tac gtg ctc ggc gaa cac ggc gac tcg gaa        528
Pro Gln Ser Val His Ala Tyr Val Leu Gly Glu His Gly Asp Ser Glu
                165                 170                 175

gtc ctc gtg tgg agc tcc gcg caa gtc ggg ggt gtg ccg ctt ctg gag        576
Val Leu Val Trp Ser Ser Ala Gln Val Gly Gly Val Pro Leu Leu Glu
            180                 185                 190

ttc gcg gaa gcg cgt ggg cgt gcc cta tcg cct gag gac agg gct cgg        624
Phe Ala Glu Ala Arg Gly Arg Ala Leu Ser Pro Glu Asp Arg Ala Arg
        195                 200                 205

atc gac gag ggc gtg cga cgg gcc gcc tac cgc atc atc gag ggc aag        672
Ile Asp Glu Gly Val Arg Arg Ala Ala Tyr Arg Ile Ile Glu Gly Lys
    210                 215                 220

ggc gcg act tat tac ggc atc ggt gcc ggc ctg gcg cgt ctg gtc cgc        720
Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Ala Gly Leu Ala Arg Leu Val Arg
225                 230                 235                 240

gcg atc ttg acc gac gag aaa ggc gtc tat acg gtg tcc gcc ttc acc        768
Ala Ile Leu Thr Asp Glu Lys Gly Val Tyr Thr Val Ser Ala Phe Thr
                245                 250                 255

ccc gag gtt gag ggt gtg ctg gaa gtc agt ctg tcc ttg ccg cgc att        816
Pro Glu Val Glu Gly Val Leu Glu Val Ser Leu Ser Leu Pro Arg Ile
            260                 265                 270

ctc ggc gcc ggc ggc gtc gag ggc acc gtg tac ccg tcc ctg tca ccc        864
Leu Gly Ala Gly Gly Val Glu Gly Thr Val Tyr Pro Ser Leu Ser Pro
```

```
                275                 280                 285

gag gaa cgc gag gcc ctg cgc cgc agc gcc gaa atc ctc aag gaa gcg        912
Glu Glu Arg Glu Ala Leu Arg Arg Ser Ala Glu Ile Leu Lys Glu Ala
    290                 295                 300

gcg ttc gcc ctg ggt ttc taa                                        933
Ala Phe Ala Leu Gly Phe
305                 310
```

<210> 48
<211> 310
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 48

```
Met Lys Val Gly Ile Val Gly Ser Gly Met Val Gly Ser Ala Thr Ala
1               5                  10                  15

Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Gly Val Ala Arg Glu Val Val Leu Val Asp
            20                  25                  30

Leu Asp Arg Lys Leu Ala Gln Ala His Ala Glu Asp Ile Leu His Ala
        35                  40                  45

Thr Pro Phe Ala His Pro Val Trp Val Arg Ala Gly Ser Tyr Gly Asp
    50                  55                  60

Leu Glu Gly Ala Arg Ala Val Val Leu Ala Ala Gly Val Ala Gln Arg
65                  70                  75                  80

Pro Gly Glu Thr Arg Leu Gln Leu Leu Asp Arg Asn Ala Gln Val Phe
                85                  90                  95

Ala Gln Val Val Pro Arg Val Leu Glu Ala Ala Pro Glu Ala Val Leu
            100                 105                 110

Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Asp Val Met Thr Gln Val Ala Tyr Arg
        115                 120                 125

Leu Ser Gly Leu Pro Pro Gly Arg Val Val Gly Ser Gly Thr Ile Leu
    130                 135                 140

Asp Thr Ala Arg Phe Arg Ala Leu Leu Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala
145                 150                 155                 160

Pro Gln Ser Val His Ala Tyr Val Leu Gly Glu His Gly Asp Ser Glu
                165                 170                 175
```

```
Val Leu Val Trp Ser Ser Ala Gln Val Gly Gly Val Pro Leu Leu Glu
            180                 185                 190

Phe Ala Glu Ala Arg Gly Arg Ala Leu Ser Pro Glu Asp Arg Ala Arg
        195                 200                 205

Ile Asp Glu Gly Val Arg Arg Ala Ala Tyr Arg Ile Ile Glu Gly Lys
    210                 215                 220

Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Ala Gly Leu Ala Arg Leu Val Arg
225                 230                 235                 240

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

Pro Glu Val Glu Gly Val Leu Glu Val Ser Leu Ser Leu Pro Arg Ile
            260                 265                 270

Leu Gly Ala Gly Gly Val Glu Gly Thr Val Tyr Pro Ser Leu Ser Pro
        275                 280                 285

Glu Glu Arg Glu Ala Leu Arg Arg Ser Ala Glu Ile Leu Lys Glu Ala
    290                 295                 300

Ala Phe Ala Leu Gly Phe
305                 310
```

<210> 49
<211> 229
<212> ADN
<213> Metanococcus capsulatus (Bath) promotor MDH

<400> 49

```
tttgcctcga tcggcggtcc ttgtgacagg gagatattcc cgacggatcc ggggcattcg   60

agcggaaccg cccgccgtgg gagtttttcc agcgagcatt cgagagtttt tcaaggcggc  120

ttcgaggggt tattccgtaa cgccgccgac atgatctgtc ccagaatctc cgccgctgtt  180

cgtagagcgc cgatgcaggg tcggcatcaa tcattcttgg aggagacac              229
```

<210> 50
<211> 114
<212> ADN
<213> Metilosinus trichosporium OB3b región promotora para sga

<400> 50

tttttgaga ccacgcggcc cgacgcgcaa ggaagctttc gggcgcgcgc gcgtccggcg 60

aagacaactc gaaccgatga gctcgaaggg agccctagac aggaggtaaa aatg 114

<210> 51
<211> 707
<212> ADN
<213> Metilmonas sp. 16a promotor maxF

<400> 51

gcgccgtatg ctttcgaatc cgccaagacc gggcatggat aaatccatga ccaccacatc 60

gggcaattgc tttgaataga gttggcaagc ggtctcgcca cgatcggctt catagatctc 120

gccgatacga tccgacagcg atagataggt cttgtagccg gtacgaacca cggcgtgatc 180

atctaccaat aaaacgctga ttttactcgc cactggaaaa tttcctcctc aggtcgtcaa 240

gggataaaga tatgggacaa gtccagtctg atgccaggcg gacttggtgt gccttttttt 300

atgatgacgc tttatccgtg cttaaaccat gggagctttt cccgtttcca atttcgatcc 360

ttggcgagat aggaatattt ccgtgcatga ttgcgtcgat ttcacatcga tttcatggat 420

tgttccgtaa cgttagccag cccggcttct ataacatttg cgccagcgtg gcctggtggt 480

cggtaacccg tgatgcggtt atgatcaaca aagctggttt tcaacgacta attctgatct 540

tcaggtcgcg cctcacttat agcgataaaa atcctggagg aaacatgcaa caactcgatt 600

tgcgcatagt cgggaaaacc gcggccttgt tggctggtgg ccttctgagc gtggcgcaac 660

ccgcatcggc gaacaaggag ctggaacagc tcggaggatt taaaatg 707

<210> 52
<211> 281
<212> ADN
<213> Metilmonas sp. 16a hps promotor

<400> 52

cagatagtaa gcgctaagga ttggggtgcg tcgccggtcg cggcggcgct cctcgacggc 60

agagttggtg ccaggttggc ggatgattga tgccgaatat tacgcgacca attctcgagg 120

caaatgaact gtgagctact gagttgcagg cattgacagc catcccattt ctatcataca 180

gttacggacg catcacgagt aggtgataag cctagcagat tgcggcagtt ggcaaaatca 240

gctattacta ataattaaaa actttcggag cacatcaaat g 281

<210> 53
<211> 317
<212> PRT
<213> Staphylococcus simiae

<400> 53

```
Met Asn Gln Phe Lys Gly Asn Lys Val Val Leu Ile Gly Asn Gly Ala
1               5                   10                  15

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

```
Glu Leu Val Ile Ile Asp Leu Asp Thr Glu Lys Val Lys Gly Asp Val
        35                  40                  45

Met Asp Leu Lys His Ala Thr Pro Tyr Ser Pro Thr Thr Val Arg Val
    50                  55                  60

Lys Ala Gly Glu Tyr Ser Asp Cys His Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65                  70                  75                  80

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

Ser Lys Asn Leu Lys Ile Phe Lys Ser Ile Val Asp Glu Val Met Ala
            100                 105                 110

Ser Gln Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Thr Asn Pro Val Asp Ile
        115                 120                 125

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

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

Ser Glu Glu Phe Asp Val Ala Pro Ser Ser Val His Ala Gln Ile Ile
                165                 170                 175

Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Ala Val Trp Ser His Ala Asn Ile
            180                 185                 190

Ala Gly Gln Pro Leu Lys Glu Ile Leu Glu Lys Arg Pro Gln Glu Lys
        195                 200                 205

Glu Lys Val Glu Gln Ile Phe Val Gln Thr Arg Asp Ala Ala Tyr Asp
    210                 215                 220

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

Thr Arg Ile Thr Glu Ala Ile Phe Arg Asn Glu Asp Ala Val Leu Thr
                245                 250                 255

Ile Ser Ala Leu Leu Glu Gly Glu Tyr Gly Gln Glu Asp Leu Tyr Ile
            260                 265                 270

Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Gly Gly Ile Arg Asn Val Val Glu
        275                 280                 285
```

Thr Pro Leu Asn Glu Glu Glu Arg Thr Gln Phe Ala His Ser Ala His
290 295 300

Thr Leu Lys Asp Ile Met Ser Lys Ala Asp Glu Leu Lys
305 310 315

<210> 54
<211> 317
<212> PRT
<213> Staphylococcus vitulinus

<400> 54

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

Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Met Ile Asn Gln Gly Ile Cys Asp
20 25 30

Glu Phe Val Ile Ile Asp Leu Asp Lys Lys Lys Val Asn Gly Asp Val
35 40 45

Met Asp Leu Asn His Gly Thr Val Tyr Gly Pro Ser Pro Ile Lys Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asn Met Lys Ile Phe Lys Ser Ile Val Asp Glu Ile Met Arg
100 105 110

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

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

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

Ser Glu Glu Phe Asp Val Ala Pro Gln Ser Val His Ala Asn Ile Ile
165 170 175

Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Leu Pro Val Trp Ser His Ala Asn Ile
180 185 190

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

His Arg Val Glu Glu Ile Phe Val Gln Thr Arg Asp Ala Ala Tyr Glu
210 215 220

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

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

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

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

Ile Pro Leu Asp Glu Glu Glu Thr Ser Leu Phe Asn His Ser Val Lys
290 295 300

Val Leu Lys Asp Ile Gln Asp Pro Phe Glu Lys Glu Phe
305 310 315

<210> 55
<211> 318
<212> PRT
<213> Staphylococcus lentus

<400> 55

Met Lys Gln Phe Lys Gly Asn Lys Val Val Leu Val Gly Asn Gly Phe
1 5 10 15

Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Met Ile Asn Gln Gly Ile Cys Asp
20 25 30

Glu Phe Val Ile Ile Asp Leu Asp Lys Lys Lys Val Asn Gly Asp Val
35 40 45

Met Asp Leu Asn His Gly Ser Val Tyr Gly Pro Ser Pro Met Lys Val
50 55 60

Lys Ala Gly Glu Tyr Lys Asp Cys Glu Asp Ala Asp Leu Val Val Ile
65 70 75 80

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

```
Ala Lys Asn Met Lys Ile Phe Lys Asn Ile Val Thr Glu Ile Met Asp
            100                 105                 110

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

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

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

Ser Glu Glu Phe Asp Val Ala Pro Gln Ser Val His Ala Asn Ile Ile
                165                 170                 175

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

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

His Arg Val Glu Glu Ile Phe Val Glu Thr Arg Asp Ala Ala Tyr Glu
    210                 215                 220

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

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

Val Ser Ala Tyr Leu Glu Gly Glu Tyr Gly His Glu Asp Val Tyr Ile
            260                 265                 270

Gly Val Pro Ala Leu Val Asn Arg Thr Gly Val Arg Glu Val Ile Glu
        275                 280                 285

Met Pro Leu Asn Asp Glu Glu Thr Arg Leu Phe Asp Asn Ser Val Lys
    290                 295                 300

Val Leu Lys Asp Ile Gln Ala Pro Phe Glu Lys Glu Phe Lys
305                 310                 315
```

<210> 56
<211> 315
<212> PRT
<213> Macrococcus caseolyticus

<400> 56

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

Val Gly Ser Ser Tyr Ala Phe Ala Met Leu Asn Gln Gly Ala Cys Asp
            20                  25                  30

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

Met Asp Leu Asn His Gly Val Val Tyr Ala Pro Ser Pro Met Gln Val
    50                  55                  60

Lys Tyr Gly Thr Tyr Glu Asp Cys His Asp Ala Ser Leu Ile Val Ile
65                  70                  75                  80

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

Gly Lys Asn Met Lys Ile Phe Lys Ser Ile Val Asp Glu Ile Met Lys
            100                 105                 110

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

Leu Thr Tyr Ala Val Gln Lys Phe Ser Gly Leu Pro Glu Asn Gln Val
    130                 135                 140

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

Ser Gln Glu Phe Asn Val Ser Pro Asn Ser Val His Gly Tyr Ile Ile
                165                 170                 175

Gly Glu His Gly Asp Ser Glu Leu Ala Val Trp Ser Gly Thr Asn Ile
            180                 185                 190

Ala Gly Asn Ser Leu Tyr Asp Ile Leu Asn Glu Asn Pro Glu Lys Gln
        195                 200                 205

Lys Leu Ile Glu Glu Ile Phe Val Asn Thr Arg Asp Ala Ala Tyr Glu
    210                 215                 220

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

Met Arg Ile Ser Lys Ala Ile Leu Asn Asn Glu Asn Val Val Leu Thr
```

245 250 255

Val Ser Ala Lys Leu Asn Gly Glu Tyr Gly His Asp Asp Val Tyr Ile
260 265 270

Gly Val Pro Ala Ile Ile Asn Arg Asn Gly Ile Arg Glu Val Leu Glu
275 280 285

Thr Pro Leu Asn Thr Glu Glu Lys Glu Lys Phe Ala Lys Ser Val Glu
290 295 300

Thr Leu Lys Ala Ile Gln Thr Pro Phe Phe Ser
305 310 315

<210> 57
<211> 314
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 57

```
Met Lys Lys Gly Ile Asn Arg Val Val Leu Val Gly Thr Gly Ala Val
1               5                  10                  15

Gly Cys Ser Tyr Ala Tyr Ser Met Ile Asn Gln Gly Val Ala Glu Glu
            20                  25                  30

Phe Val Leu Val Asp Val Asn Glu Ala Lys Ala Glu Gly Glu Ala Met
        35                  40                  45

Asp Leu Ser His Ala Val Pro Phe Ser Pro Ser Pro Thr Lys Val Trp
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Tyr Ala Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile Thr
65                  70                  75                  80

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

Lys Asn Thr Lys Ile Phe Lys Gln Ile Val Arg Gly Ile Met Asp Ser
            100                 105                 110

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

Thr Tyr Val Thr Trp Lys Glu Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val Ile
    130                 135                 140

Gly Ser Gly Thr Thr Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Met Leu Gly
```

```
145                 150                 155                 160

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

Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser His Ala Thr Ile Gly
            180                 185                 190

Val Gln Lys Leu Glu Thr Ile Leu Ala Asn Asn Glu Gln Tyr Lys Gln
        195                 200                 205

Glu Asp Leu Asp Lys Ile Phe Glu Asn Val Arg Asp Ala Ala Tyr His
    210                 215                 220

Ile Ile Glu Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Met Ser Leu
225                 230                 235                 240

Leu Arg Val Thr Lys Ala Ile Leu Asn Asn Glu Asn Ser Val Leu Thr
                245                 250                 255

Val Ser Ala Tyr Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Glu Lys Asp Ala Tyr Val
            260                 265                 270

Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Glu Gly Val Arg Glu Ile Val Glu
        275                 280                 285

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

Val Leu Lys Glu Thr Met Ala Pro Val Leu
305                 310
```

<210> 58
<211> 314
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 58

```
Met Lys Lys Gly Ile Asn Arg Val Val Leu Val Gly Thr Gly Ala Val
1               5                   10                  15

Gly Cys Ser Tyr Ala Tyr Ser Met Ile Asn Gln Gly Val Ala Glu Glu
            20                  25                  30

Phe Val Leu Val Asp Val Asn Glu Ala Lys Ala Glu Gly Glu Ala Met
        35                  40                  45

Asp Leu Ser His Ala Val Pro Phe Ser Pro Ser Pro Thr Lys Val Trp
```

```
     50                  55                  60

Ser Gly Ser Tyr Ala Asp Cys Lys Asp Ala Asp Leu Val Val Ile Thr
65                  70                  75                  80

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

Lys Asn Thr Lys Ile Phe Lys Gln Ile Val Arg Gly Ile Met Asp Ser
            100                 105                 110

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

Thr Tyr Val Thr Trp Lys Glu Ser Gly Leu Pro Lys Glu Arg Val Ile
    130                 135                 140

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

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

Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser His Ala Thr Ile Gly
            180                 185                 190

Val Gln Lys Leu Glu Thr Ile Leu Ala Asn Asn Glu Gln Tyr Asn Gln
        195                 200                 205

Glu Asp Leu Asp Lys Ile Phe Glu Asn Val Arg Asp Ala Ala Tyr His
    210                 215                 220

Ile Ile Glu Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr Gly Ile Gly Met Ser Leu
225                 230                 235                 240

Leu Arg Val Thr Lys Ala Ile Leu Asn Asn Glu Asn Ser Val Leu Thr
                245                 250                 255

Val Ser Ala Tyr Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Glu Lys Asp Ala Tyr Val
            260                 265                 270

Gly Val Pro Ala Val Ile Asn Arg Glu Gly Val Arg Glu Ile Val Glu
        275                 280                 285

Leu Glu Leu Asn Glu Asp Glu Lys Ala Lys Phe Ala His Ser Val Lys
    290                 295                 300
```

Val Leu Lys Glu Thr Met Ala Pro Val Leu
305 310

<210> 59
<211> 320
<212> PRT
<213> Bacillus mycoides

<400> 59

Met Lys Gly Glu Ile Asn Met Lys Lys Gly Ile Asn Arg Val Val Leu
1 5 10 15

Val Gly Thr Gly Ala Val Gly Cys Ser Tyr Ala Tyr Ser Met Ile Asn
20 25 30

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

Ala Glu Gly Glu Ala Met Asp Leu Ser His Ala Val Pro Phe Ser Pro
50 55 60

Ala Pro Thr Lys Val Trp Ser Gly Ser Tyr Ala Asp Cys Lys Asp Ala
65 70 75 80

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

Arg Leu Asp Leu Val Glu Lys Asn Thr Lys Ile Phe Lys Gln Ile Val
100 105 110

Arg Gly Ile Met Asp Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Ile Ala Thr
115 120 125

Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr Val Thr Trp Lys Glu Ser Gly Leu
130 135 140

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

Phe Arg Tyr Met Leu Gly Asp Tyr Leu Asp Val Asp Pro Arg Asn Val
165 170 175

His Ala Tyr Ile Val Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp
180 185 190

Ser His Ala Thr Val Gly Val Gln Lys Leu Glu Thr Ile Leu Ala Asn
195 200 205

Asn Glu Gln Tyr Asn Gln Glu Asp Leu Asp Lys Ile Phe Glu Asn Val
210 215 220

Arg Asp Ala Ala Tyr His Ile Ile Glu Arg Lys Gly Ala Thr Tyr Tyr
225 230 235 240

Gly Ile Gly Met Ser Leu Leu Arg Val Thr Lys Ala Ile Leu Ser Asn
245 250 255

Glu Asn Ser Val Leu Thr Val Ser Ala Tyr Leu Glu Gly Gln Tyr Gly
260 265 270

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

Val Arg Glu Ile Val Glu Leu Glu Leu Asn Glu Glu Glu Lys Ala Lys
290 295 300

Phe Ala His Ser Val Lys Val Leu Lys Glu Thr Met Ala Pro Val Leu
305 310 315 320

<210> 60
<211> 312
<212> PRT
<213> Lactobacillus rhamnosus

<400> 60

Met Gln His Ser Gly Asn Ile Ile Leu Ile Gly Asp Gly Ala Ile Gly
1 5 10 15

Ser Ser Phe Ala Phe Asn Cys Leu Thr Thr Gly Val Gly Gln Ser Leu
20 25 30

Gly Ile Ile Asp Val Asn Glu Lys Arg Val Gln Gly Asp Val Glu Asp
35 40 45

Leu Ser Asp Ala Leu Pro Tyr Thr Ser Gln Lys Asn Ile Tyr Ala Ala
50 55 60

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

Ile Ala Gln Lys Pro Gly Gln Thr Arg Leu Glu Leu Leu Ser Ile Asn
85 90 95

Ala Lys Ile Ile Lys Glu Ile Thr His Asn Ile Met Ala Ser Gly Phe
100 105 110

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

Leu Val Leu Glu Glu Ser Gly Leu Pro Arg Asn Gln Val Leu Gly Ser
130 135 140

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

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

Gly Asp Ser Glu Phe Pro Val Trp Asp Tyr Thr Asn Ile Gly Gly Lys
180 185 190

Pro Ile Leu Asp Trp Ile Pro Lys Asn Arg Gln Ala Ser Asp Leu Ala
195 200 205

Glu Ile Ser His Arg Val Lys Thr Ala Ala Tyr Gly Ile Ile Glu Lys
210 215 220

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

Ser Ala Phe Leu Asn Asp Asp Arg Ala Ala Phe Ala Met Ser Val His
245 250 255

Leu Asp Gly Glu Tyr Gly Leu Ser Gly Val Ser Ile Gly Val Pro Val
260 265 270

Ile Leu Gly Ala Asn Gly Leu Glu Arg Ile Ile Glu Leu Asp Leu Asn
275 280 285

Ala Glu Asp His Lys Arg Leu Ala Asp Ser Ala Ala Ile Leu Lys Asp
290 295 300

Asn Leu Lys Lys Ala Gln Glu Ala
305 310

<210> 61
<211 > 313
<212> PRT
<213> Lactobacillus fermentum

<400> 61

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

```
Val Ala His Tyr Leu Val Ala Gly Gly Phe Thr Asp Asp Leu Val Leu
            20                  25                  30

Ile Asp Pro Arg Glu Glu Lys Val Val Ala Asp Ala Val Asp Phe Glu
        35                  40                  45

Asp Ala Met Ala Asn Leu Glu Tyr His Thr Asn Ile Phe Val Asn Asp
    50                  55                  60

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

Ile Lys Leu Gln Asp Asn Pro Asp Asp Asp Arg Phe Ala Glu Leu Pro
                85                  90                  95

Tyr Thr Arg Val Gln Val Lys Lys Val Ala Thr Lys Leu Lys Glu Val
            100                 105                 110

Gly Phe Asn Gly Ile Ile Val Ala Ile Thr Asn Pro Val Asp Val Ile
        115                 120                 125

Thr Ser Leu Tyr Gln Glu Ile Thr Gly Leu Pro Lys Asn His Val Ile
    130                 135                 140

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

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

Glu His Gly Asn Ser Gln Phe Thr Ala Trp Ser Thr Val Arg Val Leu
            180                 185                 190

Gly Lys Pro Ile Glu Gln Ile Ala Asp Gln Lys Gly Leu Asp Leu Val
        195                 200                 205

Asp Leu Asp Lys Ala Ala Arg Glu Gly Gly Phe Ile Val Phe Arg Gly
    210                 215                 220

Lys Lys Tyr Thr Ser Tyr Gly Val Ala Thr Ala Ala Val Arg Leu Val
225                 230                 235                 240

Asn Thr Ile Leu Ser Asn Ala Leu Thr Glu Leu Pro Val Ser Asn Tyr
                245                 250                 255

Arg Glu Glu Tyr Gly Val Tyr Leu Ser Tyr Pro Ala Val Val Gly Arg
            260                 265                 270
```

Asp Gly Ile Val Glu Gln Cys Gln Leu Asp Leu Thr Ala Glu Glu Leu
275 280 285

Gln Lys Leu Gln Val Ser Ala Asp Phe Ile Lys Gln Lys Phe Ala Glu
290 295 300

Ser Leu Glu Ala Ala Asp Gln Glu Asp
305 310

< 210> 62
<211> 307
<212> PRT
<213> Lactobacillus delbrueckii

<400> 62

Met Ser Arg Lys Val Leu Leu Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Ser Asn
1 5 10 15

Phe Ala Asn Asp Leu Leu Gln Thr Thr Arg Val Asp Glu Leu Val Ile
20 25 30

Cys Asp Leu Asn Lys Asp Arg Ala Ala Gly Asp Cys Leu Asp Leu Glu
35 40 45

Asp Met Thr Tyr Phe Thr Gly Gln Thr Lys Leu Arg Ala Gly Asp Tyr
50 55 60

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

Arg Lys Pro Gly Glu Ser Arg Leu Asp Leu Ile Lys Lys Asn Glu Ala
85 90 95

Ile Leu Arg Ser Ile Val Asp Pro Val Val Ala Ser Gly Phe Ser Gly
100 105 110

Ile Phe Val Val Ser Ala Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr Thr Leu Thr
115 120 125

Gln Lys Leu Ser Gly Phe Pro Lys Lys Arg Val Ile Gly Thr Gly Thr
130 135 140

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

Val Pro Ile Glu Ser Val Asn Ala Trp Val Leu Gly Glu His Gly Asp
165 170 175

Ser Ser Phe Glu Asn Phe Ser Ser Ala Val Val Asn Gly Lys Pro Leu
180 185 190

Leu Asp Tyr Pro Gly Met Thr Glu Ala Ala Leu Asp Glu Ile Glu Ala
195 200 205

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

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

Glu Asn Asn Asp Leu Ala Leu Pro Leu Ser Ala Pro Leu His Gly Glu
245 250 255

Tyr Gly Ile Lys Asp Glu Ile Tyr Leu Gly Thr Leu Ala Ile Ile Asn
260 265 270

Gly Gln Gly Ile Ser His Val Leu Glu Leu Pro Leu Asn Asp Ser Glu
275 280 285

Leu Ala Lys Met Arg Ala Ser Ala Ala Thr Ile Lys Ala Thr Leu Asp
290 295 300

Ser Leu Gly
305

<210> 63
<211> 325
<212> PRT
< 213> Lactococcus lactis

<400> 63

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Val Lys Asn
                325
```

<210> 64
<211> 1014
<212> ADN
<213> Lactobacillus helveticus LDH

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1014)

<400> 64

```
atg aca aag gtt ttt gct tac gct att cga aaa gac gaa gaa cca ttc          48
Met Thr Lys Val Phe Ala Tyr Ala Ile Arg Lys Asp Glu Glu Pro Phe
1               5                   10                  15

ttg aat gaa tgg aag gaa gct cac aag gat atc gat gtt gat tac act          96
Leu Asn Glu Trp Lys Glu Ala His Lys Asp Ile Asp Val Asp Tyr Thr
            20                  25                  30

gat aaa ctt ttg act cct gaa act gct aag cta gct aag ggt gct gac         144
Asp Lys Leu Leu Thr Pro Glu Thr Ala Lys Leu Ala Lys Gly Ala Asp
        35                  40                  45

ggt gtt gtt gtt tac caa caa tta gac tac act gca gat act ctt caa         192
Gly Val Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Ala Asp Thr Leu Gln
    50                  55                  60

gct tta gca gac gct ggc gta act aag atg tca tta cgt aac gtt ggt         240
Ala Leu Ala Asp Ala Gly Val Thr Lys Met Ser Leu Arg Asn Val Gly
65                  70                  75                  80

gtt gac aac att gat atg gac aag gct aag gaa tta ggt ttc caa att         288
Val Asp Asn Ile Asp Met Asp Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe Gln Ile
                85                  90                  95

acc aat gtt cct gtt tac tca cca aac gct att gct gaa cat gct gct         336
Thr Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu His Ala Ala
            100                 105                 110

att cag gct gca cgt gta tta cgt caa gac aag cgc atg gac gaa aag         384
Ile Gln Ala Ala Arg Val Leu Arg Gln Asp Lys Arg Met Asp Glu Lys
        115                 120                 125

atg gct aaa cgt gac tta cgt tgg gca cca act atc ggc cgt gaa gtt         432
Met Ala Lys Arg Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Val
    130                 135                 140

cgt gac caa gtt gtc ggt gtt gtt ggt act ggt cac att ggt caa gta         480
Arg Asp Gln Val Val Gly Val Val Gly Thr Gly His Ile Gly Gln Val
145                 150                 155                 160

ttt atg cgt att atg gaa ggt ttc ggt gca aag gtt att gct tac gat         528
Phe Met Arg Ile Met Glu Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Ala Tyr Asp
                165                 170                 175

atc ttc aag aac cca gaa ctt gaa aag aag ggt tac tac gtt gac tca         576
Ile Phe Lys Asn Pro Glu Leu Glu Lys Lys Gly Tyr Tyr Val Asp Ser
            180                 185                 190

ctt gac gac ttg tac aag caa gct gat gta att tca ctt cac gta cca         624
Leu Asp Asp Leu Tyr Lys Gln Ala Asp Val Ile Ser Leu His Val Pro
```

```
                195                 200                 205

gat gtt cca gct aac gtt cac atg atc aac gac aag tca atc gct gaa        672
Asp Val Pro Ala Asn Val His Met Ile Asn Asp Lys Ser Ile Ala Glu
    210                 215                 220

atg aaa gac ggc gtt gta att gta aac tgc tca cgt ggt cga ctt gtt        720
Met Lys Asp Gly Val Val Ile Val Asn Cys Ser Arg Gly Arg Leu Val
225                 230                 235                 240

gac act gac gct gta atc cgt ggt ttg gac tca ggc aag atc ttc ggc        768
Asp Thr Asp Ala Val Ile Arg Gly Leu Asp Ser Gly Lys Ile Phe Gly
                245                 250                 255

ttc gtt atg gat act tac gaa gac gaa gtt ggt gta ttt aac aag gat        816
Phe Val Met Asp Thr Tyr Glu Asp Glu Val Gly Val Phe Asn Lys Asp
            260                 265                 270

tgg gaa ggt aaa gaa ttc cca gac aag cgt ttg gca gac tta att gat        864
Trp Glu Gly Lys Glu Phe Pro Asp Lys Arg Leu Ala Asp Leu Ile Asp
        275                 280                 285

cgt cca aac gta ttg gta act cca cac acc gcc ttc tac act act cac        912
Arg Pro Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr His
    290                 295                 300

gct gta cgt aac atg gtt gtt aag gca ttc aac aac aac ttg aag tta        960
Ala Val Arg Asn Met Val Val Lys Ala Phe Asn Asn Asn Leu Lys Leu
305                 310                 315                 320

atc aac ggc gaa aag cca gat tct cca gtt gct ttg aac aag aac aag       1008
Ile Asn Gly Glu Lys Pro Asp Ser Pro Val Ala Leu Asn Lys Asn Lys
                325                 330                 335

ttt taa                                                             1014
Phe
```

< 210> 65
<211> 337
<212> PRT
<213> Lactobacillus helveticus LDH

<400> 65

```
Met Thr Lys Val Phe Ala Tyr Ala Ile Arg Lys Asp Glu Glu Pro Phe
1               5                  10                  15

Leu Asn Glu Trp Lys Glu Ala His Lys Asp Ile Asp Val Asp Tyr Thr
            20                  25                  30

Asp Lys Leu Leu Thr Pro Glu Thr Ala Lys Leu Ala Lys Gly Ala Asp
        35                  40                  45

Gly Val Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Ala Asp Thr Leu Gln
    50                  55                  60

Ala Leu Ala Asp Ala Gly Val Thr Lys Met Ser Leu Arg Asn Val Gly
```

65 70 75 80

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

Thr Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu His Ala Ala
100 105 110

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

Met Ala Lys Arg Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Val
130 135 140

Arg Asp Gln Val Val Gly Val Val Gly Thr Gly His Ile Gly Gln Val
145 150 155 160

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

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

Leu Asp Asp Leu Tyr Lys Gln Ala Asp Val Ile Ser Leu His Val Pro
195 200 205

Asp Val Pro Ala Asn Val His Met Ile Asn Asp Lys Ser Ile Ala Glu
210 215 220

Met Lys Asp Gly Val Val Ile Val Asn Cys Ser Arg Gly Arg Leu Val
225 230 235 240

Asp Thr Asp Ala Val Ile Arg Gly Leu Asp Ser Gly Lys Ile Phe Gly
245 250 255

Phe Val Met Asp Thr Tyr Glu Asp Glu Val Gly Val Phe Asn Lys Asp
260 265 270

Trp Glu Gly Lys Glu Phe Pro Asp Lys Arg Leu Ala Asp Leu Ile Asp
275 280 285

Arg Pro Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr His
290 295 300

Ala Val Arg Asn Met Val Val Lys Ala Phe Asn Asn Asn Leu Lys Leu
305 310 315 320

```
Ile Asn Gly Glu Lys Pro Asp Ser Pro Val Ala Leu Asn Lys Asn Lys
                325                 330                 335

Phe
```

<210> 66
<211> 996
<212> ADN
<213> Leuconostoc mesenteroides LDH

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (996)

<400> 66

```
atg aag att ttt gct tac ggc att cgt gat gat gaa aag cca tca ctt   48
Met Lys Ile Phe Ala Tyr Gly Ile Arg Asp Asp Glu Lys Pro Ser Leu
1               5                  10                  15

gaa gaa tgg aaa gcg gct aac cca gag att gaa gtg gac tac aca caa   96
Glu Glu Trp Lys Ala Ala Asn Pro Glu Ile Glu Val Asp Tyr Thr Gln
            20                  25                  30

gag cta ttg aca cct gaa aca gtt aag ttg gct gag gga tca gat tca  144
Glu Leu Leu Thr Pro Glu Thr Val Lys Leu Ala Glu Gly Ser Asp Ser
        35                  40                  45

gct gtt gtt tac caa caa ctg gac tat aca cgt gaa aca ttg aca gct  192
Ala Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Arg Glu Thr Leu Thr Ala
    50                  55                  60

tta gct aac gtt ggt ggt act aac ttg tca ttg cgt aac gtt ggt aca  240
Leu Ala Asn Val Gly Gly Thr Asn Leu Ser Leu Arg Asn Val Gly Thr
65                  70                  75                  80

gat aac att gat ttt gat gca gca cgt gaa ttt aac ttt aac att tca  288
Asp Asn Ile Asp Phe Asp Ala Ala Arg Glu Phe Asn Phe Asn Ile Ser
                85                  90                  95

aat gtt cct gtt tat tca cca aat gct att gca gaa cac tca atg att  336
Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu His Ser Met Ile
            100                 105                 110

caa tta tct cgt ttg cta cgt cgc acg aaa gca ttg gat gcc aaa att  384
Gln Leu Ser Arg Leu Leu Arg Arg Thr Lys Ala Leu Asp Ala Lys Ile
        115                 120                 125

gct aag cac gac ttg cgc tgg gca cca aca att gga cgt gaa atg cgt  432
Ala Lys His Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Met Arg
    130                 135                 140

atg caa aca gtt ggt gtt att ggt aca ggc cat att ggc cgt gtt gct  480
Met Gln Thr Val Gly Val Ile Gly Thr Gly His Ile Gly Arg Val Ala
145                 150                 155                 160

att aac att ttg aaa ggc ttt ggg gca aag gtt att gct tat gat aag  528
Ile Asn Ile Leu Lys Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Ala Tyr Asp Lys
                165                 170                 175
```

```
tac cca aat gct gaa ttg caa gca gaa ggt ttg tac gtt gac aca tta        576
Tyr Pro Asn Ala Glu Leu Gln Ala Glu Gly Leu Tyr Val Asp Thr Leu
            180                 185                 190

gac gaa tta tat gca caa gct gat gca att tca ttg tat gtt cct ggt        624
Asp Glu Leu Tyr Ala Gln Ala Asp Ala Ile Ser Leu Tyr Val Pro Gly
        195                 200                 205

gtg cct gaa aac cat cat cta atc aat gca gag gct att gct aag atg        672
Val Pro Glu Asn His His Leu Ile Asn Ala Glu Ala Ile Ala Lys Met
    210                 215                 220

aat gat ggc gtg gtt atc atg aat gct gcg cgt ggt aat ttg atg gac        720
Asn Asp Gly Val Val Ile Met Asn Ala Ala Arg Gly Asn Leu Met Asp
225                 230                 235                 240

att gat gct att att gat ggt ttg aat tct ggt aag att tca gac ttc        768
Ile Asp Ala Ile Ile Asp Gly Leu Asn Ser Gly Lys Ile Ser Asp Phe
                245                 250                 255

ggt atg gac gtt tat gaa aat gaa gtt ggc ttg ttc aat gaa gat tgg        816
Gly Met Asp Val Tyr Glu Asn Glu Val Gly Leu Phe Asn Glu Asp Trp
            260                 265                 270

tct ggt aaa gaa ttc cca gat gct aag att gct gac ttg att tca cgc        864
Ser Gly Lys Glu Phe Pro Asp Ala Lys Ile Ala Asp Leu Ile Ser Arg
        275                 280                 285

gaa aat gta ttg gtt acg cca cat acg gct ttc tat aca act aaa gct        912
Glu Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Ala
    290                 295                 300

gtt cta gaa atg gtt cac caa tca ttt gat gca gca gtt gct ttc gcc        960
Val Leu Glu Met Val His Gln Ser Phe Asp Ala Ala Val Ala Phe Ala
305                 310                 315                 320

aaa ggt gag aag cca gct att gct gtt gaa tat taa                       996
Lys Gly Glu Lys Pro Ala Ile Ala Val Glu Tyr
                325                 330
```

<210> 67
<211> 331
<212> PRT
<213> Leuconostoc mesenteroides LDH

<400> 67

```
Met Lys Ile Phe Ala Tyr Gly Ile Arg Asp Asp Glu Lys Pro Ser Leu
1               5                  10                  15

Glu Glu Trp Lys Ala Ala Asn Pro Glu Ile Glu Val Asp Tyr Thr Gln
            20                  25                  30

Glu Leu Leu Thr Pro Glu Thr Val Lys Leu Ala Glu Gly Ser Asp Ser
        35                  40                  45

Ala Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Arg Glu Thr Leu Thr Ala
    50                  55                  60
```

```
Leu Ala Asn Val Gly Gly Thr Asn Leu Ser Leu Arg Asn Val Gly Thr
65                  70                  75                  80

Asp Asn Ile Asp Phe Asp Ala Ala Arg Glu Phe Asn Phe Asn Ile Ser
                85                  90                  95

Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asn Ala Ile Ala Glu His Ser Met Ile
            100                 105                 110

Gln Leu Ser Arg Leu Leu Arg Arg Thr Lys Ala Leu Asp Ala Lys Ile
        115                 120                 125

Ala Lys His Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Met Arg
    130                 135                 140

Met Gln Thr Val Gly Val Ile Gly Thr Gly His Ile Gly Arg Val Ala
145                 150                 155                 160

Ile Asn Ile Leu Lys Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Ala Tyr Asp Lys
                165                 170                 175

Tyr Pro Asn Ala Glu Leu Gln Ala Glu Gly Leu Tyr Val Asp Thr Leu
            180                 185                 190

Asp Glu Leu Tyr Ala Gln Ala Asp Ala Ile Ser Leu Tyr Val Pro Gly
        195                 200                 205

Val Pro Glu Asn His His Leu Ile Asn Ala Glu Ala Ile Ala Lys Met
    210                 215                 220

Asn Asp Gly Val Val Ile Met Asn Ala Ala Arg Gly Asn Leu Met Asp
225                 230                 235                 240

Ile Asp Ala Ile Ile Asp Gly Leu Asn Ser Gly Lys Ile Ser Asp Phe
                245                 250                 255

Gly Met Asp Val Tyr Glu Asn Glu Val Gly Leu Phe Asn Glu Asp Trp
            260                 265                 270

Ser Gly Lys Glu Phe Pro Asp Ala Lys Ile Ala Asp Leu Ile Ser Arg
        275                 280                 285

Glu Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr Lys Ala
    290                 295                 300

Val Leu Glu Met Val His Gln Ser Phe Asp Ala Ala Val Ala Phe Ala
305                 310                 315                 320
```

Lys Gly Glu Lys Pro Ala Ile Ala Val Glu Tyr
325 330

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria metanotrófica obligada que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una deshidrogenasa de lactato (LDH), en donde la bacteria metanotrófica es capaz de convertir metano en lactato.

2. La bacteria metanotrófica de la reivindicación 1, en donde la bacteria metanotrófica se selecciona del grupo que consiste en un metanotrofo Tipo I, un metanotrofo Tipo II y un metanotrofo Tipo X.

3. Las bacterias metanotróficas de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde las bacterias metanotróficas se seleccionan de entre el grupo que consiste en un *Metilococcus,* un *Metilomonas,* un *Metilobacter,* un *Metilosinus,* un *Metilomicrobium,* un *Metanomonas,* un *Metilacidiphilum* y *Metiloacida.*

4. La bacteria metanotrófica de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la bacteria metanotrófica se selecciona del grupo que consiste en Metilococcus capsulatus (Bath)*, Metilomonas metanica 16a, Metilosinus trichosporium* OB3b, *Metilosinus sporium, Metilomonas metanica, Metilomonas albus, Metilobathyumulatumumum, Metilobacterumulatum, Metilobacterum, Metilobacterum, Metilobacterium capsula, Metilomonas* sp. AJ-3670, *Metilacidiphilum infernorum, Metilacidiphilum fumariolicum, Metiloacida kamchatkensis* y *Metilomicrobium alcaliphilum.*

5. La bacteria metanotrófica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la bacteria metanotrófica se selecciona de Metilococcus capsulatus (Bath) o *Metilosinus trichosporium* OB3b.

6. La bacteria metanotrófica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el ácido nucleico heterólogo:

(a) codifica una deshidrogenasa de lactato que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85% idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 57 y 58;
(b) codifica una deshidrogenasa de lactato que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 57 y 58; o
(c) comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37, 39, 41, 43, 45 y 47.

7. Las bacterias metanotróficas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la molécula de ácido nucleico heterólogo codifica una LDH de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en *Actinomyces viscosus, Acinonyx jubatus, Archilochus colubris, Bacillus anthracis, Bacillus caldolyticus, Bacillus coagulans, Bacillus megaterium, Bacillus stearothermophilus* (Q9p4b6) (también conocido como *Geobacillus stearothermophilus)*, *Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis, Bacteroides pectinophilus, Bifidobacterium longum, Bos taurus, Canis familiaris, Canis lupus, Deinococcus radiodurans, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Equusferus, Felis catus, Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces maxxianus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus casei, Lactobacillus casei. torquens, Lactobacillus delbrueckii* (incluyendo *subsp. bulgaricus)*, *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactococcus lactis, Listeria monocytogenes, Plasmodium falciparum, Plasmodium ovale, Thermus thermophilus, Mus musculus, Oryctolagus cuniculus, Pediococcus acidilactici, Taeniopygia guttata, Rattus norvegicus, Rhizopus oryzae, Staphylococcus aureus* y *Streptococcus bovis.*

8. La bacteria metanotrófica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica LDH es un codón optimizado para la expresión en la bacteria metanotrófica.

9. Un método para producir lactato, que comprende el cultivo de bacterias metanotróficas de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en presencia de una materia prima de carbono que comprende metano en condiciones suficientes para producir lactato, en donde la bacteria metanotrófica convierte metano en lactato.

10. El método de la reivindicación 9, en donde la materia prima de carbono es gas natural.

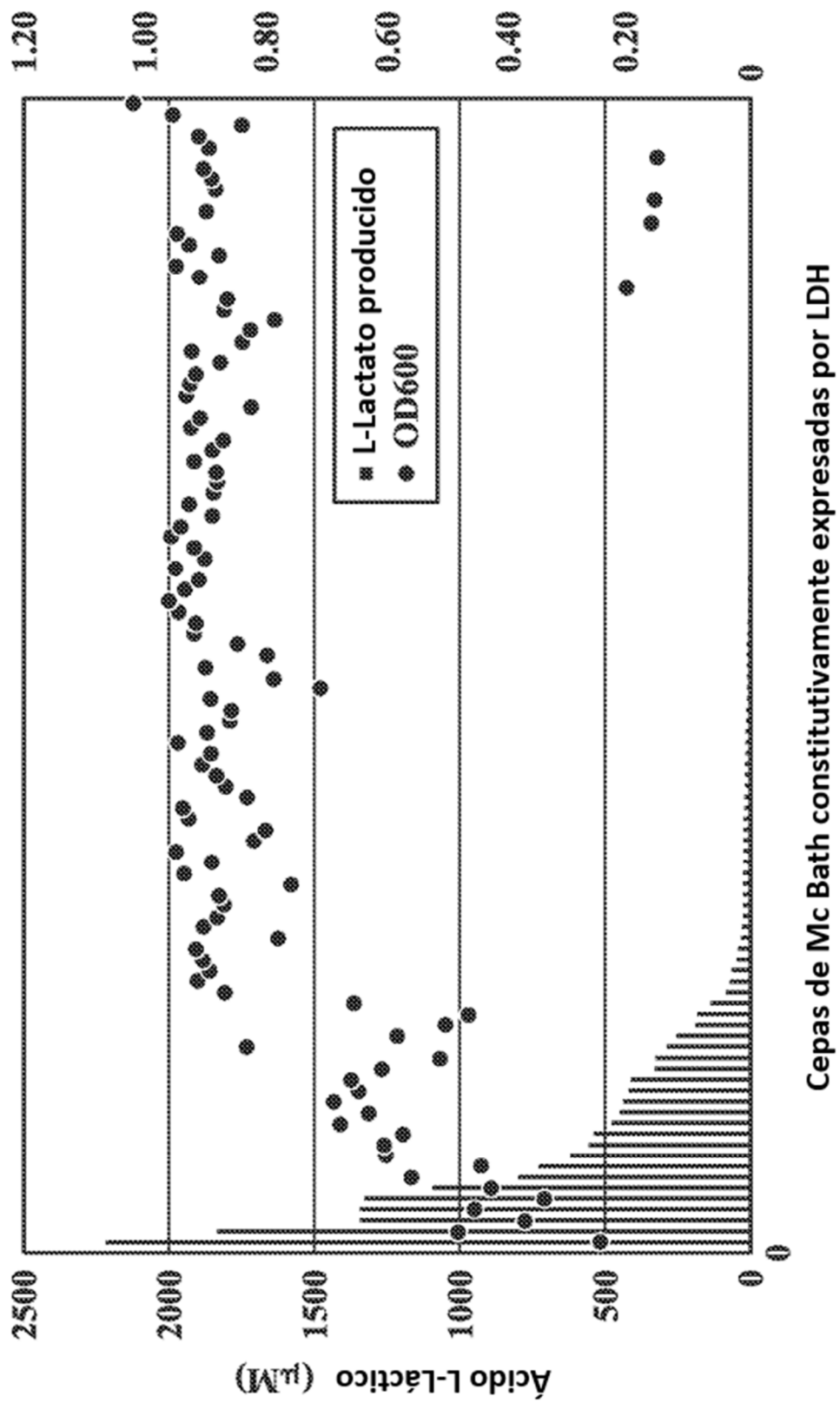
Ácido L-Láctico (μM)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0
L-Lactato producido
OD600
Cepas de Mc Bath constitutivamente expresadas por LDH

FIG. 1

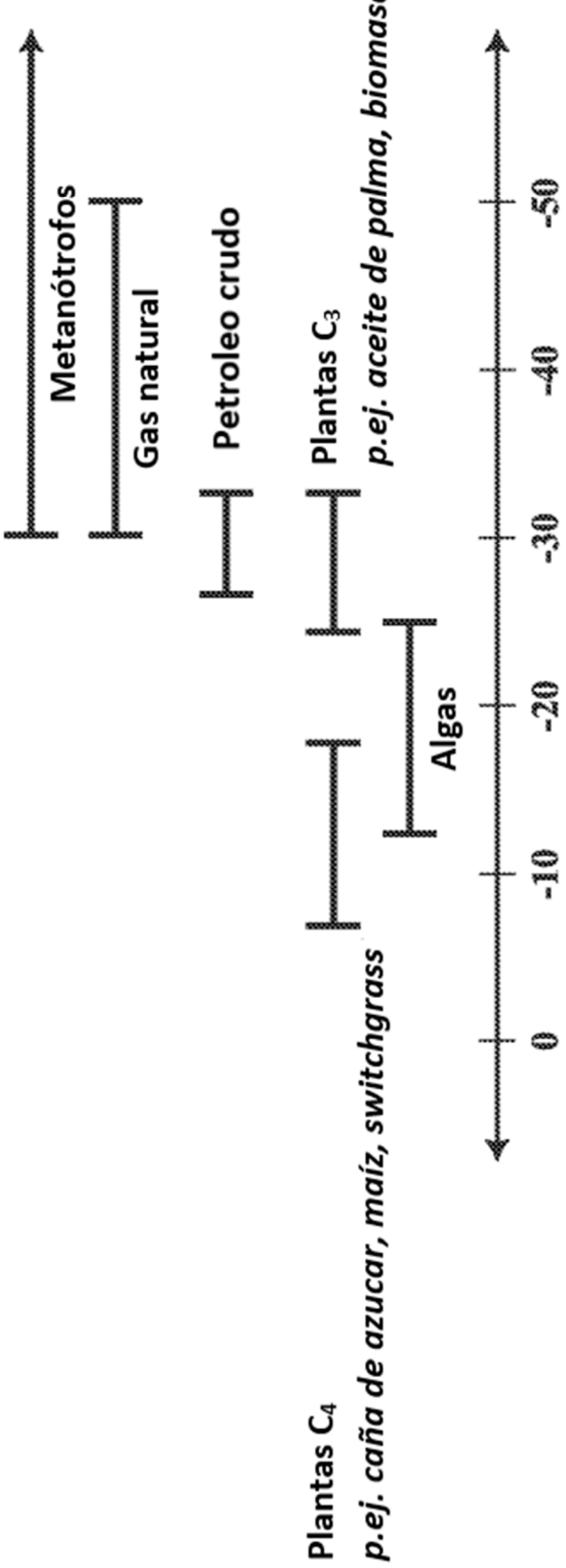
Metanótrofos
Gas natural
Petroleo crudo
Plantas C_3
p.ej. aceite de palma, biomasa leñosa
Algas
Plantas C_4
p.ej. caña de azucar, maíz, switchgrass
0
-10
-20
-30
-40
-50
$\delta^{13}C$ (‰)

FIG.2

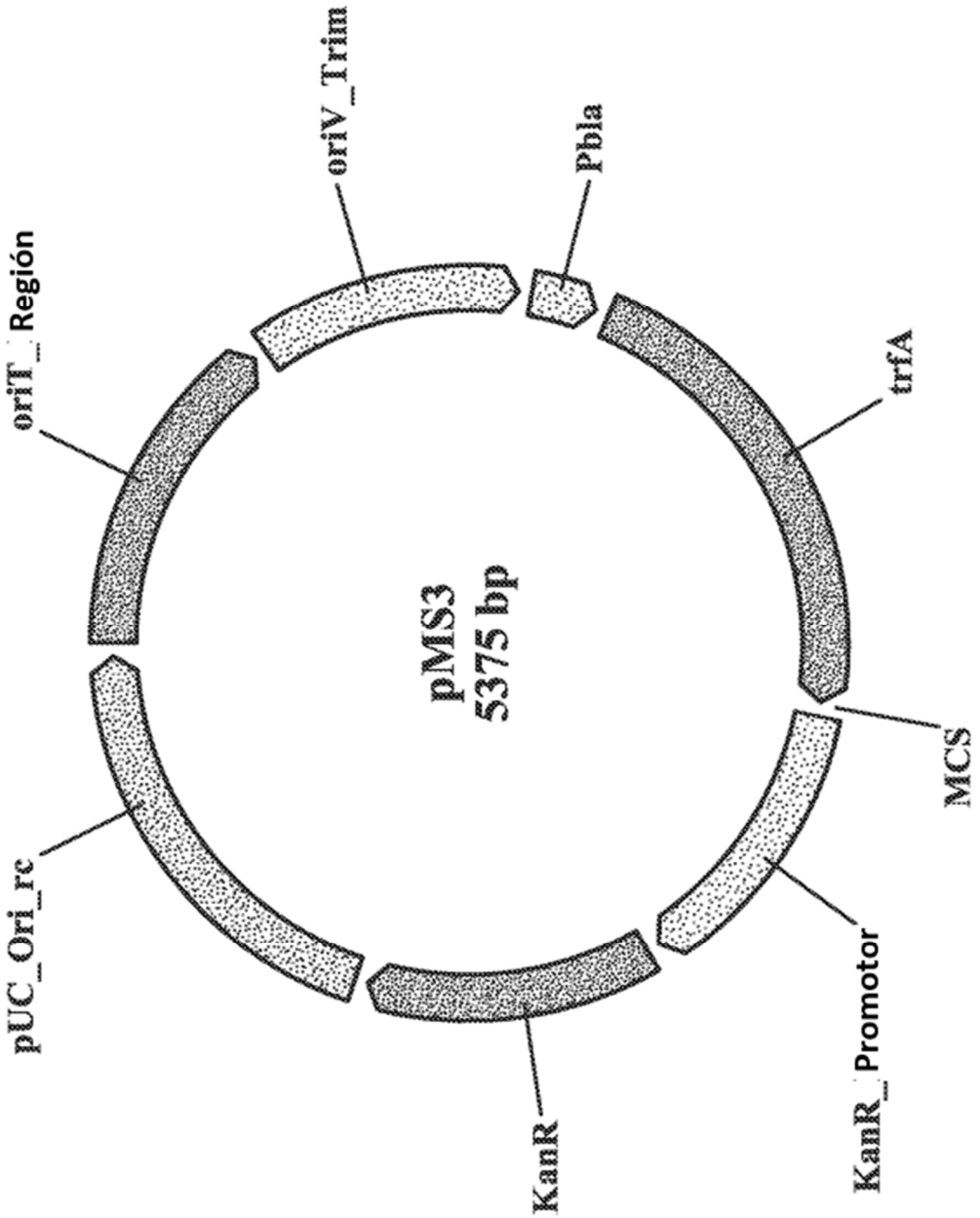
pMS3
5375 bp
oriV_Trim
Pbla
trfA
MCS
KanR_Promotor
KanR
pUC_Ori_rc
oriT_Región

FIG.3