



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 214 567**

⑤① Int. Cl.7: **C12N 9/06**
C12N 9/88
C12N 15/77
C12P 13/08

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **97108764 .8**
⑧⑥ Fecha de presentación: **02.06.1997**
⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0811682**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **10.12.1997**

⑤④ Título: **Procedimiento para preparar L-Lisina.**

③⑩ Prioridad: **05.06.1996 JP 14281296**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2004

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2004

⑦③ Titular/es: **Ajinomoto Co., Inc.**
Nº 15-1, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104, JP

⑦② Inventor/es: **Hirano, Seiko;**
Sugimoto, Masakazu;
Nakano, Eiichi;
Izui, Masako.;
Hayakawa, Atsushi;
Yoshihara, Yasuhiko y
Nakamatsu, Tsuyoshi

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 214 567 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar L-lisina.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención hace referencia a un método para producir L-lisina cultivando un microorganismo obtenido modificando una bacteria corineforme utilizada para la producción fermentativa de aminoácidos o similares por medio de una técnica basada en la ingeniería genética.

10 La L-lisina, que se utiliza como aditivo para piensos, es producida normalmente mediante un método fermentativo utilizando una cepa mutante productora de L-lisina perteneciente a las bacterias corineformes.

15 Como para las bacterias corineformes, se describe un plásmido vector que es autónomamente replicable en células bacterianas y tiene un gen marcador de resistencia a fármacos (ver la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.514.502), y un método para introducir un gen en células bacterianas (por ejemplo, Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 2-207791). También se describe la posibilidad de multiplicar una bacteria productora de L-treonina o L-isoleucina utilizando los mecanismos descritos antes (ver las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.452.890 y 4.442.208). En cuanto a la multiplicación de una bacteria productora de L-lisina, se conoce una técnica, 20 en la cual se incorpora un gen que participa en la biosíntesis de L-lisina en un plásmido vector para amplificar el gen en células bacterianas (por ejemplo, Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 56-160997).

25 Entre los genes conocidos para biosíntesis de L-lisina se incluyen, por ejemplo, el gen de la dihidro-picolinato reductasa (Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 7-75578) y el gen de la diaminopimelato deshidrogenasa (Ishino, S. y col., *Nucleic Acids Res.*, 15, 3917 (1.987)), que son genes clonados que participan en la biosíntesis de L-lisina, así como el gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 60-87788), el gen de la dihidropicolinato sintasa (Publicación de Patente Japonesa Núm. 6-55149), y el gen de la diaminopimelato descarboxilasa (Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 60-62994), cuya amplificación afecta a la productividad de L-lisina.

30 Como se ha descrito antes, se han obtenido algunos resultados acertados para mejorar la productividad de la L-lisina por medio de la amplificación de genes para la biosíntesis de L-lisina. Sin embargo, la amplificación de algunos genes disminuye la velocidad de crecimiento de la bacteria aunque la amplificación mejora la productividad de L-lisina, dando como resultado un descenso de la velocidad de producción de L-lisina.

35 No se ha informado de ningún caso en el que se pretenda mejorar el crecimiento intensificando también un gen para la producción de L-lisina. En las presentes circunstancias, no se conoce ningún caso para las bacterias corineformes, en el que se haya tenido éxito en la mejora notable del rendimiento de L-lisina sin moderar el crecimiento, combinando una pluralidad de genes para la biosíntesis de L-lisina.

40 **Compendio de la invención**

Un objeto de la presente invención es mejorar la capacidad productora de L-lisina sin disminuir la velocidad de crecimiento de una bacteria corineforme, intensificando una pluralidad de genes para la biosíntesis de L-lisina 45 combinados en las bacteria corineformes.

50 Cuando la sustancia objetivo es producida fermentativamente utilizando un microorganismo, la velocidad de producción, así como el rendimiento de la sustancia objetivo en relación con la sustancia introducida, es un factor extremadamente importante. La sustancia objetivo puede ser producida de manera relativamente poco costosa aumentando la velocidad de producción por unidad del equipo de fermentación. Por consiguiente, es extremadamente importante desde el punto de vista industrial que el rendimiento fermentativo y la velocidad de producción sean compatibles entre sí. La presente invención propone una solución para el problema descrito antes con el fin de producir fermentativamente L-lisina utilizando una bacteria corineforme.

55 El principio de la presente invención se basa en el hecho de que se puede mejorar el crecimiento de una bacteria corineforme, y se puede mejorar la velocidad de producción de L-lisina de la misma intensificando tanto la secuencia de ADN que codifica la diaminopimelato descarboxilasa (la diaminopimelato descarboxilasa es referida en adelante como "DDC", y el gen que codifica la proteína DDC es referido en adelante como "lysA", si es necesario), como la secuencia que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa (la diaminopimelato deshidrogenasa es referida en adelante como "DDH", y el gen que codifica la proteína DDH es referido en adelante como "ddh", si es necesario) en 60 comparación con el caso en el que estas secuencias de ADN son intensificadas cada una individualmente.

65 Esto es, la presente invención se basa en un vector autónomamente replicable en células de bacterias corineformes, que comprende una secuencia de ADN que codifica una diaminopimelato deshidrogenasa y una secuencia de ADN que codifica una diaminopimelato descarboxilasa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una bacteria corineforme en la cual la actividad intracelular tanto de la diaminopimelato descarboxilasa como de la diaminopimelato deshidrogenasa son aumentadas incrementando

el número de copias de las secuencias de ADN que codifican dichas enzimas, utilizando un promotor potente, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir L-lisina que comprende las etapas de cultivar la bacteria corineforme descrita antes en un medio para permitir que se produzca y se acumule L-lisina en el cultivo, y recoger la L-lisina del cultivo.

Las bacterias corineformes referidas en la presente invención son un grupo de microorganismos definidos en *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, (8a ed., p. 599 (1.974)), que son varillas resistentes al tratamiento con ácido, Gram positivas, aerobias que no tienen capacidad formadora de esporas. Entre las bacterias corineformes se incluyen bacterias pertenecientes al género *Corynebacterium*, bacterias pertenecientes al género *Brevibacterium* que se han clasificado hasta ahora en el género *Brevibacterium* pero se han unido como bacterias pertenecientes al género *Corynebacterium* en la actualidad, y bacterias pertenecientes al género *Brevibacterium* íntimamente relacionadas con el género *Corynebacterium*.

Según la presente invención, la capacidad productora de L-lisina de las bacterias corineformes puede ser mejorada, y la velocidad de crecimiento también puede ser mejorada. La presente invención puede ser aplicada a bacterias productoras de L-lisina normales así como a cepas con una elevada productividad de L-lisina.

Breve explicación de los dibujos

La Fig. 1 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido p299LYSA que porta lysA.

La Fig. 2 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pLYSAB que porta lysA y Brevi.-ori.

La Fig. 3 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pPK4D que porta ddh y Brevi.-ori.

La Fig. 4 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido p399DL que porta ddh y lysA.

La Fig. 5 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pDL que porta ddh, lysA y Brevi.-ori.

La Fig. 6 ilustra un procedimiento de construcción de los plásmidos p399AKYB y p399AK9B que portan cada uno lysC mutante.

La Fig. 7 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pDPRB que porta dapB y Brevi.-ori.

La Fig. 8 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pDPSB que porta dapA y Brevi.-ori.

La Fig. 9 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pCRCAB que porta lysC, dapB y Brevi.-ori.

La Fig. 10 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pCB que porta lysC, dapB y Brevi.-ori.

La Fig. 11 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pAB que porta dapA, dapB y Brevi.-ori.

La Fig. 12 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pCAB que porta lysC mutante, dapA, dapB y Brevi.-ori.

La Fig. 13 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pCABL que porta lysC mutante, dapA, dapB, lysA, y Brevi.-ori.

La Fig. 14 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pCABDL que porta lysC mutante, dapA, dapB, ddh, lysA, y Brevi.-ori.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se explicara con detalle más abajo.

<1> Preparación de genes para la biosíntesis de L-lisina utilizados en la presente invención

Los genes para la biosíntesis de L-lisina utilizados en la presente invención pueden ser obtenidos respectivamente preparando ADN cromosómico de una bacteria como donadora de ADN, construyendo una genoteca de ADN cromosómico utilizando un vector plasmídico o similar, seleccionando una cepa que albergue un gen deseado de la genoteca, y recuperando, a partir de la cepa seleccionada, el ADN recombinante en el cual se ha insertado el gen. El donador de ADN para el gen para la biosíntesis de L-lisina utilizado en la presente invención no está específicamente limitado siempre que el gen deseado para la biosíntesis de L-lisina exprese una proteína enzimática que funcione en las células de la bacteria corineforme. Sin embargo, el donador de ADN es preferiblemente una bacteria corineforme.

Ambos genes lysA y ddh originados a partir de bacterias corineformes tienen secuencias conocidas. Por consi-

ES 2 214 567 T3

guiente, pueden ser obtenidos realizando una amplificación según el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; ver White, T.J. y col., *Trends Genet.*, 5, 185 (1.989)).

5 Cada uno de los genes para la biosíntesis de L-lisina utilizados en la presente invención es obtenible según ciertos métodos ejemplificados más abajo.

(1) Preparación de *lysA* mutante

10 Se puede aislar *lysA* del cromosoma de una bacteria corineforme preparando ADN cromosómico, por ejemplo conforme al método de Saito y Miura (H. Saito y K. Miura, *Biochem. Biophys. Acta*, 72, 619 (1.963)), y amplificando *lysA* conforme la método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; ver White, T.J. y col., *Trends Genet.*, 5, 185 (1.989)). El donador de ADN no está específicamente limitado, no obstante, es ejemplificado por la cepa *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869.

15 En las bacterias corineformes, *lysA* forma un operón junto con *argS* (gen de la arginil-tRNA sintasa), y *lysA* existe aguas abajo de *argS*. La expresión de *lysA* es regulada por un promotor que existe aguas arriba de *argS* (ver *Journal of Bacteriology*, Nov., 7356-7362 (1.993)). Las secuencias de ADN de estos genes son conocidas para *Corynebacterium glutamicum* (ver *Molecular microbiology*, 4(11), 1819-1830 (1.990); *Molecular and General Genetics*, 212, 112-119 (1.988)), basándose en los cuales se pueden preparar cebadores de ADN para la PCR. Tales cebadores de ADN están ejemplificados específicamente por los ADN de 23-meros que tienen respectivamente las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEC ID NUM: 1 en el Listado de Secuencias (correspondiente a los nucleótidos números 11 a 33 de la secuencia de nucleótidos descrita en *Molecular Microbiology*, 4(11), 1819-1830 (1.990)) y en la SEC ID NUM: 2 (correspondiente a los nucleótidos números 1370 a 1392 de la secuencia de nucleótidos descrita en *Molecular and General Genetics*, 212, 112-119 (1.988)).

25 En el Ejemplo descrito más adelante, se utilizó un fragmento de ADN que contenía un promotor, *argS* y *lysA* con el fin de intensificar *lysA*. Sin embargo, *argS* no es esencial para la presente invención. Se permite utilizar un fragmento de ADN en el cual *lysA* está ligado inmediatamente aguas abajo de un promotor.

30 En la SEC ID NUM: 3 se ejemplifican una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene *argS* y *lysA*, y una secuencia de aminoácidos que se ha deducido que es codificada por la secuencia de nucleótidos. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos codificada por *argS* se muestra en la SEC ID NUM: 4, y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos codificada por *lysA* se muestra en la SEC ID NUM: 5. Además de los fragmentos de ADN que codifican estas secuencias de aminoácidos, en la presente invención se pueden utilizar equivalentemente fragmentos de ADN que codifican secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NUM: 5, esto es secuencias de aminoácidos que tienen una mutación basada, por ejemplo en una sustitución, delección, o inserción de uno o más aminoácidos siempre que no haya una influencia sustancial sobre la actividad de DDC.

40 El ADN puede ser sintetizado según el método habitual utilizando un sintetizador de ADN modelo 380B producido por Applied Biosistemas y utilizando el método de la fosfoamidita (ver *Tetrahedron Letters* (1.981), 22, 1859). La PCR se puede realizar utilizando DNA Thermal Cycler Model PJ2000 producido por Takara Shuzo, y utilizando ADN polimerasa Taq según el método designado por el proveedor.

45 Se prefiere ligar *lysA* amplificado mediante PCR al ADN vector autónomamente replicable en células de *E. coli* y/o bacterias corineformes para preparar ADN recombinante, e introducir el ADN recombinante en células de *E. coli* de antemano. Semejante provisión facilita las siguientes operaciones. El vector autónomamente replicable en células de *E. coli* es preferiblemente un vector plasmídico que es preferiblemente autónomamente replicable en las células de un huésped, incluyendo, por ejemplo, pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG399, pHSG398, y RSF1010.

50 Cuando se inserta un fragmento de ADN que tiene la capacidad de permitir que un plásmido sea autónomamente replicable en bacterias corineformes en estos vectores, éstos pueden ser utilizados como lo que se denomina un vector lanzadera autónomamente replicable tanto en *E. coli* como en bacterias corineformes.

55 Entre tales vectores lanzadera se incluyen los siguientes. Los microorganismos que albergan cada uno de los vectores y los números de acceso de las autoridades de consigna internacionales se muestran entre paréntesis.

pHC4: *Escherichia coli* AJ12617 (FERM BP-3532)
60 pAJ655: *Escherichia coli* AJ11882 (FERM BP-136)
Corynebacterium glutamicum SR8201 (ATCC 39135)
pAJ1844: *Escherichia coli* AJ11883 (FERM BP-137)
Corynebacterium glutamicum SR8202 (ATCC 39136)
pAJ611: *Escherichia coli* AJ11884 (FERM BP-138)
65 pAJ3148: *Corynebacterium glutamicum* SR8203 (ATCC 39137)
pAJ440: *Bacillus subtilis* AJ11901 (FERM BP-140)

ES 2 214 567 T3

Estos vectores son obtenibles entre los microorganismos consignados como sigue. Las células recogidas en una fase de crecimiento logarítmico son sometidas a lisis utilizando lisozima y SDS, seguido de separación del producto lisado mediante centrifugación a 30.000 X g para obtener un sobrenadante. Se añade polietilenglicol al sobrenadante, seguido de fraccionamiento y purificación por medio de centrifugación con gradiente de densidad de cloruro de cesio-bromuro de etidio en equilibrio.

Se puede transformar *E. coli* mediante la introducción de un plásmido, por ejemplo conforme al método de D.M. Morrison (*Methods in Enzymology*, 68, 326 (1.979)) o el método en el que las células receptoras son tratadas con cloruro de calcio para incrementar la permeabilidad al ADN (Mandel, M. y Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1.970)).

(2) Preparación de *ddh*

Se puede preparar un fragmento de ADN que contiene *ddh* a partir del cromosoma de una bacteria corineforme por medio de la PCR. El donador de ADN no está específicamente limitado, sin embargo, se ejemplifica mediante la cepa *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869.

Se conoce un gen DDH para *Corynebacterium glutamicum* (Ishino, S. y col., *Nucleic Acids Res.*, 15, 3917 (1.987)), basándose en el cual se pueden preparar cebadores para la PCR. Tales cebadores están ejemplificados específicamente por los ADN de 20-meros que tienen respectivamente las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEC ID NUMS: 6 y 7 del Listado de Secuencias. La síntesis de ADN, la PCR, y la preparación de un plásmido que porte el *ddh* obtenido pueden ser realizadas de la misma manera que las de *lysA* descritas antes.

En la SEC ID NUM: 8 se ilustran una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene *ddh* y la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos. En la Figura 9 sólo se muestra la secuencia de aminoácidos. Además de los fragmentos de ADN que codifican esta secuencia de aminoácidos, en la presente invención se pueden utilizar equivalentemente fragmentos de ADN que codifican secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NUM: 9, esto es, secuencias de aminoácidos que tienen una mutación basada, por ejemplo, en la sustitución, delección, o inserción de uno o más aminoácidos siempre que no haya una influencia sustancial sobre la actividad de DDH.

<2> ADN recombinante y bacteria corineforme de la presente invención

La bacteria corineforme de la presente invención alberga una secuencia de ADN que codifica la diaminopimelato descarboxilasa (*lysA*) y una secuencia de ADN que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa (*ddh*) que están intensificadas. El término "secuencia de ADN intensificada" hace referencia aquí al hecho de que la actividad intracelular de una enzima codificada por la secuencia de ADN es elevada, por ejemplo incrementando el número de copias de un gen, utilizando un promotor fuerte o combinando estos métodos.

La bacteria corineforme para la que se han descrito antes las secuencias de ADN es una bacteria corineforme productora de L-lisina, entre cuyos ejemplos se incluyen las cepas de tipo salvaje y las cepas mutantes artificiales productoras de L-lisina y las bacterias corineformes con una productividad de L-lisina intensificada mediante ingeniería genética. Incluso si la bacteria tiene una productividad de L-lisina baja, la productividad de L-lisina puede ser mejorada intensificando *lysA* y *ddh*. Si la bacteria tiene una productividad de L-lisina elevada, se puede aumentar más la eficacia de la producción de L-lisina intensificando *lysA* y *ddh*.

(1) Cepas productoras de L-lisina pertenecientes a las bacterias corineformes

Entre los ejemplos de la bacteria corineforme utilizada para introducir *lysA* y *ddh* se incluyen, por ejemplo, las siguientes cepas productoras de lisina:

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870;

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806;

Corynebacterium callunae ATCC 15991;

Corynebacterium glutamicum ATCC 13032;

(*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020;

(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869;

(*Corynebacterium lilium*) ATCC 15990;

(*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067;

Corynebacterium melassecola ATCC 17965;

ES 2 214 567 T3

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066;

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068;

5 *Brevibacterium roseum* ATCC 13825;

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240;

10 *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354;

Corynebacterium thermoaminogenes AJ12340 (FERM BP-1539).

Entre otras cepas bacterianas distintas a las descritas antes, las utilizables como huésped en las cuales se van a intensificar *lysA* y *ddh* se incluyen, cepas mutantes que tienen la capacidad de producir L-lisina derivada de las cepas mencionadas antes. Entre tales cepas mutantes artificiales se incluyen las siguientes: cepas mutantes resistentes a S-(2-aminoetil)-cisteína (abreviada en adelante como "AEC") (*Brevibacterium lactofermentum* AJ11082 (NRRL B-11470), Solicitudes de Patente Japonesas Núms. 56-1914, 56-1915, 57-14157, 57-14158, 57-30474, 58-10075, 59-4993, 61-35840, 62-24074, 62-36673, 5-11958, 7-112437, y 7-112438); cepas mutantes que requieren un aminoácido tal como L-homoserina para su crecimiento (Publicaciones de Patente Japonesa Núms. 48-28078 y 56-6499); cepas mutantes que manifiestan resistencia a AEC y requieren aminoácidos tales como L-leucina, L-homoserina, L-prolina, L-serina, L-arginina, L-alanina, y L-valina (Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.708.395 y 3.825.472); cepas mutantes productoras de L-lisina que manifiestan resistencia a DL- α -amino- ϵ -caprolactama, α -amino-laurillactama, análogos de aspartato, fármacos sulfa, quinoides, y N-lauroilleucina; cepas mutantes productoras de L-lisina que manifiestan resistencia a los inhibidores de oxaloacetato Descarboxilasa o enzimas del sistema respiratorio (Solicitudes de Patentes Japonesas Abiertas a la Inspección Pública Núms. 50-53588, 50-31093, 52-102498, 53-9394, 53-86089, 55-9783, 55-9759, 56-32995 y 56-39778, y Publicaciones de Patentes Japonesas Núms. 53-43591 y 53-1833); cepas mutantes productoras de L-lisina que requieren inositol o ácido acético (Solicitudes de Patentes Japonesas Abiertas a la Inspección Pública Núms. 55-9784 y 56-8692); cepas mutantes productoras de L-lisina que manifiestan sensibilidad al ácido fluoropirúvico o a temperaturas no menores de 34°C (Solicitudes de Patentes Japonesas Abiertas a la Inspección Pública Núms. 55-9783 y 53-86090); y cepas mutantes de producción pertenecientes al género *Brevibacterium* o *Corynebacterium* que manifiestan resistencia al etilenglicol y producen L-lisina (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.411.997).

35 (2) *Bacteria corineforme productora de L-lisina que tiene una productividad de L-lisina intensificada por recombinación genética*

La velocidad de producción de L-lisina puede ser mejorada adicionalmente intensificando *lysA* y *ddh*, si se ha intensificado la producción de L-lisina en la bacteria corineforme mediante ingeniería genética, por ejemplo, introduciendo un gen codificador de una enzima que tiene una mutación que ocasiona la desensibilización en la inhibición de la retroalimentación, cuya enzima de tipo salvaje es sometida a inhibición de la retroalimentación entre las enzimas que participan en la biosíntesis de la L-lisina, o intensificando un gen para la biosíntesis de la L-lisina distinta de *lysA* y *ddh*.

Entre las bacterias corineformes con la productividad de L-lisina intensificada se incluye una bacteria corineforme que alberga una secuencia de ADN que codifica una aspartoquinasa que es desensibilizada en la inhibición de la retroalimentación por la L-lisina y la L-treonina (una aspartoquinasa es referida en adelante como "AK", un gen que codifica una proteína AK es referido en adelante como "*lysC*", y un gen que codifica una proteína AK que es desensibilizada en la inhibición de la retroalimentación por la L-lisina y la L-treonina, si es necesario), y una secuencia de ADN intensificada que codifica una dihidropicolato reductasa (una dihidropicolinato reductasa es referida en adelante como "DDPR", y un gen que codifica una proteína DDPR es referido en adelante como "*dapB*", si es necesario), y una bacteria corineforme que alberga adicionalmente una secuencia de ADN intensificada que codifica una dihidropicolinato sintasa (una dihidropicolinato sintasa es referida en adelante como "DDPS", y un gen que codifica una proteína DDPS es referido en adelante como "*dapB*", si es necesario). Cada uno de los genes para la biosíntesis de la L-lisina utilizado en la presente invención es obtenible según ciertos métodos ejemplificados más abajo.

(i) *Preparación de lysC mutante*

Un fragmento de ADN que contiene *lysC* mutante puede ser preparado a partir de una cepa mutante en la que la inhibición de retroalimentación sinérgica de la actividad AK por la L-lisina y la L-treonina es sustancialmente desensibilizada (Publicación Internacional Núm. WO 94/25605). Semejante cepa mutante puede ser obtenida, por ejemplo, a partir de un grupo de células que se originan a partir de una cepa de tipo salvaje de una bacteria corineforme sometida a un tratamiento de mutación tal como radiación ultravioleta y tratamiento con un agente mutante tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. La actividad AK puede ser medida utilizando un método descrito por Miyajima, R. y col., *The Journal of Biochemistry* (1.986), 63(2), 139-148. La más preferida como cepa mutante es la representada por una bacteria productora de L-lisina AJ3445 (FERM P-1944) derivada mediante un tratamiento de mutación de una cepa de tipo salvaje de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 (cuyo nombre actual cambiado es *Corynebacterium glutamicum*).

ES 2 214 567 T3

Alternativamente, lysC mutante también es obtenible mediante tratamiento de mutación *in vitro* de ADN plasmídico que contiene lysC de tipo salvaje. En otro aspecto, se conoce específicamente información sobre la mutación para desensibilizar la inhibición de retroalimentación sinérgica sobre AK por la Lisina o la L-treonina (Publicación Internacional Núm. WO 94/25605). Por consiguiente, también se puede preparar lysC mutante a partir de lysC de tipo salvaje basándose en la información según el método de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo.

Se puede preparar un fragmento de ADN que contiene lysC a partir del cromosoma de una bacteria corineforme por medio de la PCR. Los cebadores de ADN son ejemplificados por ADN de hebra sencilla de 23 meros y 21 meros que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID NUMS: 10 y 11 del Listado de Secuencias con el fin de amplificar, por ejemplo, una región de aproximadamente 1.643 pb que codifica lysC basándose en una secuencia conocida para *Corynebacterium glutamicum* (ver *Molecular Microbiology* (1.991), 5(5), 1197-1204; *Mol. Gen. Genet.* (1.990), 224, 317-324). La síntesis de ADN, la PCR, y la preparación de un plásmido que porta el lysC obtenido se pueden realizar de la misma manera que las de lysA descritas antes.

Se obtiene lysC de tipo salvaje cuando se aísla lysC a partir de una cepa de tipo salvaje AK, mientras el lysC mutante se obtiene cuando se aísla lysC de una cepa mutante AK según el método descrito antes.

Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene lysC de tipo salvaje se muestra en la SEC ID NUM: 12 del Listado de Secuencias. A partir de la secuencia de nucleótidos se deduce una secuencia de aminoácidos de la subunidad α de la proteína AK de tipo salvaje, y se muestra en la SEC ID NUM: 13 del Listado de Secuencias junto con la secuencia de ADN. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID NUM: 14. De la secuencia de nucleótidos del ADN se deduce una secuencia de aminoácidos de la subunidad β de la proteína AK de tipo salvaje, y se muestra en la SEC ID NUM: 15 del Listado de Secuencias junto con la secuencia de ADN. Sólo se muestra la secuencia de aminoácidos en la SEC ID NUM: 16. En cada una de las subunidades, se utiliza GTG como codón de iniciación, y el correspondiente aminoácido es representado por metionina. Sin embargo, esta representación hace referencia a metionina, valina, o formilmetionina.

El lysC mutante utilizado en la presente invención no está específicamente limitado siempre que codifique AK en el que la inhibición de retroalimentación sinérgica por L-lisina y L-treonina sea desensibilizada. Sin embargo, el mutante lysC esta ejemplificado por uno que incluye una mutación en la cual un resto alanina 279° contado desde el extremo N-terminal se cambia por un resto aminoácido distinto de alanina y otro resto aminoácido en la subunidad α , y un resto alanina 30° se cambia por un resto aminoácido distinto de alanina y otro resto aminoácido en la subunidad β de la secuencia de aminoácidos de AK de tipo salvaje. La secuencia de aminoácidos de AK de tipo salvaje incluye específicamente la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NUM: 14 del Listado de Secuencias como subunidad α , y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NUM: 16 del Listado de Secuencias como subunidad β .

Entre los preferidos como restos aminoácido distintos de alanina y otros distintos del aminoácido ácido se incluyen los restos treonina, arginina, cisteína, fenilalanina, prolina, serina, tirosina, y valina.

El codón correspondiente al resto aminoácido que va a ser sustituido no está específicamente limitado por su tipo siempre que codifique el resto aminoácido. Se supone que la secuencia de aminoácidos de AK de tipo salvaje poseída puede diferir ligeramente dependiendo de la diferencia en las especies bacterianas y las cepas bacterianas. Las AK, que tienen mutaciones, basadas por ejemplo en sustituciones, deleciones, o inserciones de uno o más restos aminoácido en una o más posiciones irrelevantes para la actividad enzimática descritas antes, también pueden ser utilizadas para la presente invención. Otras AK, que tienen mutaciones basadas, por ejemplo, en sustituciones, deleciones, o inserciones de uno o más restos aminoácido distintos, también pueden ser utilizadas siempre que no se ejerza una influencia sustancial sobre la actividad AK, y sobre la desensibilización de la inhibición por retroalimentación sinérgica por L-lisina y L-treonina.

Una cepa AJ12691 obtenida introduciendo un plásmido p399AK9B con lysC mutante en una cepa AJ12036 (FERM BP-734) como cepa de tipo salvaje de *Brevibacterium lactofermentum* ha sido consignada el 10 de Abril de 1.992 con el número de acceso FERM BP-12918 en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón), transferido a una consigna internacional basándose en el Tratado de Budapest el 10 de Febrero de 1.995, y consignado con el número de acceso FERM BP-4999.

(ii) Preparación de dapB

Se puede preparar un fragmento de ADN que contenga dapB a partir del cromosoma de una bacteria corineforme por medio de la PCR. El donador de ADN no está específicamente limitado, sin embargo, es ejemplificado por la cepa *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869.

Se conoce una secuencia de ADN que codifica DDPR para *Brevibacterium lactofermentum* (*Journal of Bacteriology*, 175(9), 2743-2749 (1.993)), sobre cuya base se pueden preparar cebadores de ADN para la PCR. Tales cebadores de ADN son ejemplificados específicamente por ADN de 23-meros que tienen respectivamente las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID NUMS: 21 y 22 del Listado de Secuencias. La síntesis de ADN, la PCR, y la

ES 2 214 567 T3

preparación de un plásmido que porta el dapB obtenido se pueden realizar de la misma manera que las de lysC descritas antes.

5 En la SEC ID NUM: 23 se ilustran una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene dapB y una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos. En la SEC ID NUM: 24 se muestra solamente la secuencia de aminoácidos. Además de los fragmentos de ADN que codifican esta secuencia de aminoácidos, en la presente invención se pueden utilizar equivalentemente fragmentos de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NUM: 24, esto es secuencias de aminoácidos que tienen mutaciones basadas, por ejemplo, en la sustitución, delección, o inserción de uno o más aminoácidos siempre que no haya una
10 influencia sustancial sobre la actividad DDPR.

Una cepa AJ13107 transformante obtenida introduciendo un plásmido pCRDAPB que porta dapB obtenido en el Ejemplo descrito más adelante en una cepa JM109 de *E. coli* ha sido consignada internacionalmente desde el 26 de Mayo de 1.995 con el número de acceso FERM BP-5114 en el National Institute of Bioscience and Human Technology
15 of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón), basándose en el Tratado de Budapest.

(iii) Preparación de dapA

20 Se puede preparar un fragmento de ADN que contenga dapA a partir del cromosoma de una bacteria corineforme por medio de la PCR. El donador de ADN no está específicamente limitado, sin embargo, es ejemplificado por la cepa *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869.

Se conoce una secuencia de ADN que codifica DDPS para *Corynebacterium glutamicum* (ver *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6421 (1.990)); Núm. de acceso EMBL X53993 sobre cuya base se pueden preparar cebadores de ADN para la PCR. Tales cebadores de ADN son ejemplificados específicamente por ADN de 23-meros que tienen respectivamente las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID NUMS: 17 y 18 del Listado de Secuencias. La síntesis de ADN, la PCR, y la preparación de un plásmido que porta el dapA obtenido se pueden realizar de la misma manera que las de lysC descritas antes.
25

30 En la SEC ID NUM: 19 se ejemplifican una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene dapA y una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos. En la SEC ID NUM: 20 se muestra solamente la secuencia de aminoácidos. Además de los fragmentos de ADN que codifican esta secuencia de aminoácidos, en la presente invención se pueden utilizar equivalentemente fragmentos de ADN que codifican secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la misma secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NUM: 20, esto es secuencias de aminoácidos que tienen mutaciones basadas, por ejemplo, en la sustitución, delección, o inserción de uno o más aminoácidos siempre que no haya una influencia sustancial sobre la actividad DDPS.
35

Una cepa AJ13106 transformante obtenida introduciendo un plásmido pCRDAPA que porta dapA obtenido en el Ejemplo descrito más adelante en una cepa JM109 de *E. coli* ha sido consignada internacionalmente desde el 26 de Mayo de 1.995 con el número de acceso FERM BP-5113 en el National Institute of Bioscience and Human Technology
40 of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón), basándose en el Tratado de Budapest.

45 En una realización especificada, con el fin de intensificar lysA y ddh en la bacteria corineforme productora de L-lisina descrita antes, los genes son introducidos en el huésped utilizando un vector plasmídico, un transposón o un vector de fago o similar. Tras la introducción, se espera realizar la intensificación hasta cierto punto utilizando un vector de tipo bajo número de copias. Sin embargo, se prefiere utilizar un vector de tipo múltiples copias. Entre semejantes vectores se incluyen, por ejemplo, vectores plasmídicos, pAJ655, pAJ1844, pAJ611, pAJ3148, y pAJ440 descritos antes. Además, se describen transposones derivados de bacterias corineformes en las Publicaciones Internacionales Números. WO 92/02627 y WO 93/18151; Publicación de Patente Europea Núm. 445385; Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 6-46867; Vertes, A.A. y col., *Mol. Microbiol.*, 11, 739-746 (1.994); Bonamy, C., y col., *Mol. Microbiol.*, 14, 571-581 (1.994); Vertes, A.A. y col., *Mol. Gen. Genet.*, 245, 397-405 (1.994); Jagar, W. y col., *FERMS Microbiology Letters*, 126, 1-6 (1.995); Solicitudes de Patente Japonesas Abiertas a la Inspección Pública Números. 7-107976 y 7-327680 y similares.
50
55

Una bacteria corineforme con lysA y ddh intensificados según la presente invención puede ser obtenida, por ejemplo, introduciendo, en una bacteria corineforme huésped, un ADN recombinante que contiene lysA y ddh y que es autónomamente replicable en células de bacterias corineformes. El ADN recombinante puede ser obtenido, por ejemplo, insertando lysA y ddh en un vector tal como un vector plasmídico, transposón o vector de fago como se ha descrito antes.
60

Cada uno de los genes lysA y ddh pueden ser introducidos sucesivamente en el huésped utilizando diferentes vectores respectivamente. Por otra parte, se pueden introducir juntas dos especies de genes utilizando un único vector. Cuando se utilizan vectores diferentes, los genes pueden ser introducidos en cualquier orden, sin embargo, se prefiere utilizar vectores que tengan un mecanismo distribución y hospedaje estable en el huésped, y que sean capaces de co-existir entre sí.
65

ES 2 214 567 T3

En el caso en el que se utiliza un plásmido como vector, el ADN recombinante puede ser introducido en el huésped conforme al método del pulso eléctrico (Sugimoto y col., Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 2-207791). La amplificación de un gen utilizando un transposón puede ser realizada introduciendo un plásmido que porte un transposón en la célula huésped e induciendo la transposición del transposón.

Asimismo, cuando se introducen *lysC* mutante, *dapA* y *dapB* en una bacteria corineforme, cada uno de los genes y *lysA* y *ddh* pueden ser introducidos sucesivamente en el huésped utilizando diferentes vectores respectivamente o, alternativamente, dos o más especies de genes pueden ser introducidas juntas utilizando un único vector.

<3> Método para producir L-lisina

Se puede producir eficazmente L-lisina cultivando, en un medio apropiado, la bacteria corineforme que comprende los genes intensificados para la biosíntesis de L-lisina descritos antes para permitir que se produzca L-lisina y se acumule en el cultivo, y recoger la L-lisina del cultivo.

El medio que se va a utilizar está ejemplificado por un medio habitual que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos, y opcionalmente otros componentes orgánicos.

En cuanto a la fuente de carbono, es posible utilizar azúcares tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melazas, y producto hidrolizado de almidón; y ácidos orgánicos tales como ácido fumárico, ácido cítrico, y ácido succínico.

En cuanto a la fuente de nitrógeno, es posible utilizar sales de amonio inorgánicas tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, y fosfato de amonio; nitrógeno orgánico tal como producto hidrolizado de soja; gas amoníaco; y amoníaco acuoso.

En cuanto a las fuentes de nutrientes vestigiales orgánicos, éstas contienen deseablemente sustancias tales como vitamina B₁ y L-homoserina o extracto de levadura o similar en cantidades apropiadas. Si es necesario, se añaden en pequeñas cantidades, además de los anteriores, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, ión hierro, ión manganeso etcétera.

El cultivo se lleva preferiblemente a cabo en condiciones aerobias durante aproximadamente 30 a 90 horas. La temperatura de cultivo se controla preferiblemente de 25°C a 37°C, y el pH se controla preferiblemente de 5 a 8 durante el cultivo. Se pueden utilizar sustancias inorgánicas u orgánicas, ácidas o alcalinas, o gas amoníaco o similares para el ajuste del pH. La L-lisina puede ser recogida del cultivo combinando un método de resina de intercambio iónico, un método de precipitación, y otros métodos conocidos.

Ejemplos

La presente invención se explicará más específicamente más abajo haciendo referencia a los Ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de lysA a partir de Brevibacterium lactofermentum

<1> Preparación de *lysA* y construcción del plásmido que porta *lysA*

Se utilizó una cepa de tipo salvaje ATCC 13869 de *Brevibacterium lactofermentum* como donador de ADN cromosómico. El ADN cromosómico fue preparado a partir de la cepa ATCC 13869 con un método habitual. Un fragmento de ADN que contenía *argS*, *lysA*, y un promotor de un operón que los contenía fue amplificado a partir del ADN cromosómico según la PCR. Como cebadores de ADN utilizados para la amplificación, se emplearon ADN sintéticos de 23-meros que tenían secuencias de nucleótidos conocidas mostradas en las SEC ID NUMS: 1 y 2 del Listado de Secuencias respectivamente con el fin de amplificar una región de aproximadamente 3,6 kb que codificaba la arginil-tRNA sintasa y DDC basándose en la secuencia conocida para *Corynebacterium glutamicum* (ver *Molecular Microbiology*, 4(11), 1819-1830 (1.990); *Molecular and General Genetics*, 212, 112-119 (1.988)).

Se sintetizó ADN según un método habitual utilizando un sintetizador de ADN modelo 380B producido por Applied Biosystems y utilizando el método de la fosfoamidita (ver *Tetrahedron Letters* (1.981), 22, 1859).

El gen fue amplificado mediante PCR utilizando DNA Thermal Cycler Model PJ2000 producido por Takara Shuzo, y utilizando ADN polimerasa de Taq según el método designado por el proveedor. Se utilizó pHSG399 como vector de clonación para el fragmento génico amplificado de 3.579 pb. pHSG399 fue digerido con una enzima de restricción *SmaI* (producida por Takara Shuzo), y fue ligado con el fragmento de ADN que contenía *lysA* amplificado. El plásmido obtenido como se ha descrito antes, que tenía *lysA* originado a partir de ATCC 13869, fue denominado p399LYSA.

Se extrajo un fragmento de ADN que contenía *lysA* sometiendo a digestión p399LYSA con *KpnI* (producida por Takara Shuzo) y *BamHI* (producida por Takara Shuzo). Este fragmento de ADN fue ligado con pHSG299 que había sido digerido con *KpnI* y *BamHI*. El plásmido obtenido fue denominado p299LYSA. El procedimiento de construcción de p299LYSA se muestra en la Fig. 1.

ES 2 214 567 T3

Un fragmento de ADN (referido en adelante como "Brevi.-ori") que tenía la capacidad de hacer un plásmido autónomamente replicable en bacterias pertenecientes al género *Corynebacterium* fue introducido en p299LYSA para preparar plásmidos que portaban *lysA* autónomamente replicable en bacterias pertenecientes al género *Corynebacterium*. Brevi.-ori fue preparado a partir de un vector plasmídico pHK4 que contenía Brevi.-ori y autónomamente replicable en células tanto de *E. coli* como en bacterias pertenecientes al género *Corynebacterium*. Se construyó pHK4 mediante digestión de pHC4 con KpnI (producida por Takara Shuzo) y BamHI (producida por Takara Shuzo), extrayendo un fragmento Brevi.-ori, y ligándolo con pHSG298 que también había sido digerido con KpnI y BamHI (ver la Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 5-7491). pHK4 confiere resistencia a la kanamicina al huésped. La *Escherichia coli* HB101 que albergaba pHK4 fue denominada *Escherichia coli* AJ13136, y depositada el 1 de Agosto de 1.995 con el número de acceso FERM BP-5186 en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón).

pHK4 fue digerido con una enzima de restricción BamHI, y los extremos escindidos se volvieron romos. La formación de extremos romos se realizó utilizando un estuche DNA Blunting (producido por Takara Shuzo) según el método designado. Tras la formación de extremos romos, se ligó un conector KpnI fosforilado (producido por Takara Shuzo) para realizar una modificación de manera que el fragmento de ADN correspondiente a la porción Brevi.-ori pudiera ser escindido de pHK4 mediante digestión con KpnI solo. Este plásmido fue digerido con KpnI, y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado fue ligado con p299LYSA que había sido digerido solo con KpnI para preparar un plásmido que portaba *lysA* autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido preparado fue denominado pLYSAB. El procedimiento de producción de pLYSAB se muestra en la Fig. 2.

<2> Determinación de la secuencia de nucleótidos de *lysA* de *Brevibacterium lactofermentum*

Se preparó ADN plasmídico de p299LYSA, y se realizó la determinación de la secuencia de nucleótidos según el método de Sanger y col. (por ejemplo, F. Sanger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5463 (1.977)). En la SEC ID NUM: 3 se muestran la secuencia de nucleótidos determinada y la secuencia de aminoácidos que se ha deducido que es codificada por la secuencia de nucleótidos. En relación con la secuencia de nucleótidos, se muestran en las SEC ID NUMS: 4 y 5, respectivamente, una secuencia de aminoácidos codificada por argS y una secuencia de aminoácidos codificada por lysA.

Ejemplo 2

Preparación de *ddh* a partir de *Brevibacterium lactofermentum*

Se obtuvo un gen *ddh* amplificando el gen *ddh* del ADN cromosómico de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 según el método de la PCR utilizando dos cebadores oligonucleotídicos (SEC ID NUMS: 6, 7) preparados basándose en una secuencia de nucleótidos conocida de un gen *ddh* de *Corynebacterium glutamicum* (Ishino, S. y col., *Nucleic Acids Res.*, 15, 3917 (1.987)). El fragmento de ADN amplificado obtenido fue sometido a digestión con EcoT22I y AvaI, y los extremos escindidos se hicieron romos. Después de eso, el fragmento fue insertado en un sitio SmaI de pMW119 para obtener un plásmido pDDH.

A continuación, pDDH fue digerido con SalI y EcoRI, seguido de la formación de extremos romos. Después de eso, el fragmento obtenido fue ligado con pUC18 que había sido digerido con SmaI. El plásmido así obtenido fue denominado pUC18DDH.

Se introdujo Brevi.-ori en pUC18DDH para construir un plásmido que portaba *ddh* autónomamente replicable en bacterias corineformes. pHK4 fue digerido con enzimas de restricción KpnI y BamHI, y los extremos escindidos se hicieron romos. La formación de extremos romos se realizó utilizando el estuche DNA Blunting (producido por Takara Shuzo) según el método designado. Tras la formación de extremos romos, se ligó un conector PstI fosforilado (producido por Takara Shuzo) de manera que fuera insertado en el sitio PstI de pHSG299. El plásmido construido como se ha descrito antes, fue denominado pPK4. A continuación, pUC18DDH fue digerido con XbaI y KpnI, y el fragmento generado fue ligado con pPK4 que había sido digerido con KpnI y XbaI. De este modo se construyó un plásmido que portaba *ddh* autónomamente replicable en bacterias corineformes. Este plásmido fue denominado pPK4D. El procedimiento de construcción de pPK4D se muestra en la Fig. 3.

Ejemplo 3

Construcción del plásmido que porta tanto *ddh* como *lysA*

El plásmido pUC18DDH que portaba *ddh* fue digerido con EcoRI y después se hicieron romos los extremos y se sometieron a digestión adicionalmente con XbaI para extraer un fragmento de ADN que contenía *ddh*. Este fragmento *ddh* fue ligado con el plásmido p399LYSA que portaba *lysA* que había sido digerido con BamHI y después se hicieron romos los extremos y se sometió a digestión adicionalmente con XbaI. El plásmido obtenido fue denominado p399DL. El procedimiento de construcción de p399DL se muestra en la Fig. 4.

A continuación, se introdujo Brevi.-ori en p399DL. pHK4 fue digerido con XbaI y BamHI, y los extremos escindidos se hicieron romos. Tras la formación de los extremos romos, se ligó un conector XbaI fosforilado para

ES 2 214 567 T3

realizar una modificación de manera que el fragmento de ADN correspondiente a la porción Brevi.-ori pudiera ser escindido de pHK4 mediante digestión solo con XbaI, y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado fue ligado con p399DL que también había sido digerido con XbaI para construir un plásmido que contenía ddh y lysA autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido fue denominado pDL. El procedimiento de construcción de pDL se muestra en la Fig. 5.

Ejemplo 4

Preparación de lysC mutante, dapB y dapB a partir de Brevibacterium lactofermentum

<1> Preparación del Gen lysC de tipo salvaje y del Gen lysC Mutante a partir de *Brevibacterium lactofermentum*

(1) Preparación de los lysC de tipo salvaje y mutante y preparación de plásmidos que los portan

Se utilizaron una cepa de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, y una cepa mutante productora de L-lisina AJ3445 (FERM BP-1944) obtenida de la cepa ATCC 13689 mediante un tratamiento de mutación como donadores de ADN cromosómico. La cepa AJ3445 había sido sometida a mutación de manera que lysC se cambiaba para que implicara una desensibilización sustancial de la inhibición concertada por lisina y treonina (*Journal of Biochemistry*, 68, 701-710 (1.970)).

Un fragmento de ADN que contenía lysC fue amplificado a partir de ADN cromosómico según el método de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa; ver White, T.J. y col., *Trends Genet.*, 5, 185 (1.989)). En cuanto a los cebadores de ADN utilizados para la amplificación, se sintetizaron ADN de hebra sencilla de 23 meros y 21 meros que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID NUMS: 10 y 11 con el fin de amplificar una región de aproximadamente 1.643 pb que codificaba lysC basándose en una secuencia conocida para *Corynebacterium glutamicum* (ver *Molecular Microbiology* (1.991), 5(5), 1197-1204; y *Mol. Gen. Genet.* (1.990), 224, 317-324).

El fragmento génico amplificado de 1.643 pb fue confirmado mediante electroforesis en gel de agarosa. Después de eso, el fragmento separado por escisión del gel fue purificado según un método habitual, y fue digerido con las enzimas de restricción NruI (producida por Takara Shuzo) y EcoRI (producida por Takara Shuzo).

Se utilizó pHSG399 (ver Takeshita, S. y col., *Gen* (1.987), 61, 63-74) como vector de clonación para el fragmento génico. pHSG399 fue digerido con las enzimas de restricción SmaI (producida por Takara Shuzo) y EcoRI, y fue ligado con el fragmento lysC amplificado. El ADN fue ligado utilizando un estuche de ligadura de ADN (producido por Takara Shuzo) según un método designado. De este modo se prepararon plásmidos, en los cuales los fragmentos lysC amplificados a partir de los cromosomas de *Brevibacterium lactofermentum* estaban ligados con pHSG399 respectivamente. El plásmido que portaba lysC de ATCC 13869 (cepa de tipo salvaje) fue denominado p399AKY, y el plásmido que portaba lysC de AJ3463 (bacteria productora de L-lisina) fue denominado p399AK9.

Se introdujo Brevi.-ori en p399AKY y p399AK9 respectivamente para construir plásmidos que portaban lysC autónomamente replicable en bacterias corineformes.

pHK4 fue digerido con las enzimas de restricción KpnI y BamHI (producidas por Takara Shuzo), y los extremos escindidos se hicieron romos. La formación de extremos romos se realizó utilizando un estuche DNA Blunting (producido por Takara Shuzo) según el método designado. Tras la formación de los extremos romos, se ligó un conector BamHI fosforilado (producido por Takara Shuzo) para realizar una modificación de manera que el fragmento de ADN correspondiente a la porción Brevi.-ori pudiera ser escindido de pHK4 mediante digestión sólo con BamHI. Este plásmido fue digerido con BamHI, y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado fue ligado con p399AKY y p399AK9 que también habían sido digeridos con BamHI para preparar los plásmidos que portaban lysC autónomamente replicable en bacterias corineformes.

El plásmido que portaba el gen lysC de tipo salvaje originado a partir de p399AKY fue denominado p399AKYB, y el plásmido que portaba el gen lysC mutante originado a partir de p399AK9 fue denominado p399AK9B. El procedimiento de construcción de p399AK9B y p399AKYB se muestra en la Fig. 6. La cepa AJ12691 obtenida introduciendo el plásmido lysC mutante p399AK9B en una cepa de tipo salvaje de *Brevibacterium lactofermentum* (AJ12036, FERM BP-734) fue consignada el 10 de Abril de 1.992 con el número de acceso FERM P-12198 en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón), transferido a una consigna internacional basándose en el Tratado de Budapest el 10 de Febrero de 1.995, y consignado con el número de acceso FERM BP-4999.

(2) Determinación de las secuencias de nucleótidos de lysC de tipo salvaje y lysC mutante de *Brevibacterium lactofermentum*

El plásmido p399AKY que contenía lysC de tipo salvaje y el plásmido p399AK9 que contenía lysC mutante fueron preparados a partir de los respectivos transformantes para determinar las secuencias de nucleótidos de los lysC de tipo salvaje y mutante. La determinación de la secuencia de nucleótidos se realizó según el método de Sanger y col. (por ejemplo, F. Sanger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 5463 (1.977)).

ES 2 214 567 T3

La secuencia de nucleótidos de *lysC* de tipo salvaje codificada por p399AKY se muestra en la SEC ID NUM: 12 del Listado de Secuencias. Por otra parte, la secuencia de nucleótidos de *lysC* mutante codificada por 399AK9 tenía solo la mutación de un nucleótido de manera que la G 1051^a se cambiaba por A en la SEC ID NUM: 12 en comparación con *lysC* de tipo salvaje. Se sabe que *lysC* de *Corynebacterium glutamicum* tiene dos subunidades (α , β) codificadas en un marco de lectura idéntico de una hebra de ADN idéntica (ver Kalinowsky, J. y col., *Molecular Microbiology* (1.991) 5(5), 1197-1204). A juzgar por la homología, se espera que el gen secuenciado aquí tenga dos subunidades (α , β) codificadas en un marco de lectura idéntico en una hebra de ADN idéntica.

Una secuencia de aminoácidos de la subunidad α de la proteína AK de tipo salvaje deducida de la secuencia de nucleótidos del ADN se muestra en la SEC ID NUM: 13 junto con la secuencia de ADN. En la SEC ID NUM: 14 solo se muestra la secuencia de aminoácidos. En la SEC ID NUM: 15 se muestra la secuencia de aminoácidos de la subunidad β de la proteína AK de tipo salvaje junto con el ADN. En la SEC ID NUM: 16 sólo se muestra la secuencia de aminoácidos. En cada una de las subunidades, se utiliza GTG como codón de iniciación, y el aminoácido correspondiente está representado por la metionina. Sin embargo, esta representación hace referencia a metionina, valina, o formilmetionina.

Por otra parte, la mutación de la secuencia de *lysC* mutante representa la existencia de una sustitución de un resto aminoácido tal como el resto alanina 279 de la subunidad α es intercambiado por un resto treonina, y un resto alanina 30 de la subunidad β es intercambiado por un resto treonina en la secuencia de aminoácidos de la proteína AK de tipo salvaje (SEC ID NUM: 14, 16).

<2> Preparación de *dapB* de *Brevibacterium lactofermentum*

(1) Preparación de *dapB* y construcción del plásmido que porta *dapB*

Se utilizó una cepa de tipo salvaje ATCC 13869 de *Brevibacterium lactofermentum* como donador de ADN cromosómico. El ADN cromosómico fue preparado a partir de la cepa ATCC 13869 según el método habitual. Se amplificó un fragmento de ADN que contenía *dapB* a partir del ADN cromosómico según la PCR. Como cebadores de ADN utilizados para la amplificación, se sintetizaron ADN de 23 meros que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID NUMS: 21 y 22 del Listado de Secuencias respectivamente con el fin de amplificar una región de aproximadamente 2,0 kb que codificaba DDPR basándose en la secuencias conocida para *Brevibacterium lactofermentum* (ver *Journal of Bacteriology*, 157(9), 2743-2749 (1.993)]. Las síntesis de ADN y PCR se realizaron de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se utilizó pCR-Script (producido por Invitrogen) como vector de clonación para el fragmento génico amplificado de 2.001 pb, y se ligó con el fragmento de *dapB* amplificado. De este modo se construyó un plásmido, en el cual el fragmento *dapB* de 2.001 pb amplificado a partir del cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* era ligado con pCR-Script. El plásmido obtenido como se ha descrito antes, que tenía *dapB* originado a partir de ATCC 13869, fue denominado pCRDAPB. Una cepa AJ13107 transformante obtenida introduciendo pCRDAPB en *E. coli* JM109 ha sido consignada internacionalmente desde el 16 de Mayo de 1.995 con el número de acceso FERM BP-5114 en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón) basándose en el Tratado de Budapest.

Un fragmento de 1.101 pb que contenía un gen estructural de DDPR fue extraído mediante digestión de pCRDAPB con EcoRV y SphI. Este fragmento fue ligado con pHSG399 que había sido digerido con HincII y SphI para preparar un plásmido. El plásmido preparado fue denominado p399DPR.

Se introdujo Brevi.-ori en el p399DPR preparado para construir un plásmido que llevaba *dapB* autónomamente replicable en bacterias corineformes. pHK4 fue digerido con una enzima de restricción KpnI (producida por Takara Shuzo), y los extremos escindido se hicieron romos. La formación de extremos romos se realizó utilizando un estuche DNA Blunting (producido por Takara Suzo) según el método designado. Tras la formación de extremos romos, se ligó un conector BamHI fosforilado (producido por Takara Shuzo) para realizar una modificación de manera que el fragmento de ADN correspondiente a la porción Brevi.-ori pudiera ser escindido de pHK4 mediante digestión solamente con BamHI. Este plásmido fue digerido con BamHI, y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado fue ligado con p399DPR que también había sido digerido con BamHI para preparar un plásmido que contenía *dapB* autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido preparado fue denominado pDPRB. El procedimiento de construcción de pDPRB se muestra en la Fig. 7.

(2) Determinación de la secuencia de nucleótidos de *dapB* a partir de *Brevibacterium lactofermentum*

Se preparó ADN plasmídico a partir de la cepa AJ13107 que albergaba p399DPR, y se determinó su secuencia de nucleótidos de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1. En la SEC ID NUM: 23 se muestran la secuencia de nucleótidos determinada y una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos. En la SEC ID NUM: 24 se muestra solamente la secuencia de aminoácidos.

65

ES 2 214 567 T3

<3> Preparación de *dapA* a partir de *Brevibacterium lactofermentum*

(1) Preparación de *dapA* y construcción del plásmido que porta *dapA*

5 Se utilizó una cepa de tipo salvaje ATCC 13869 de *Brevibacterium lactofermentum* como donador de ADN cromosómico. El ADN cromosómico fue preparado a partir de la cepa ATCC 13869 según el método habitual. Se amplificó un fragmento de ADN que contenía *dapA* a partir del ADN cromosómico según la PCR. Como cebadores de ADN utilizados para la amplificación, se sintetizaron ADN de 23 meros que tenían las secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID NUMS: 17 y 18 del Listado de Secuencias respectivamente con el fin de amplificar una región de aproximadamente 1,5 kb que codificaba DDPS basándose en la secuencia conocida para *Corynebacterium glutamicum* (ver *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6421 (1.990); Núm. de acceso EMBL X53993). Las síntesis de ADN y la PCR se realizaron de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 1. Se utilizó pCR1000 (producido por Invitrogen, ver *Bio/Technology*, 9, 657-663 (1.991)) como vector de clonación para el fragmento génico amplificado de 1.411 pb, y se ligó con el fragmento de *dapA* amplificado. La ligadura de ADN se llevó a cabo utilizando un estuche de ligadura de ADN (producido por Takara Shuzo) según el método designado. De este modo se construyó un plásmido, en el cual el fragmento *dapA* de 1.411 pb amplificado a partir del cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* era ligado con pCR1000. El plásmido obtenido como se ha descrito antes, que tenía *dapA* originado a partir de ATCC 13869, fue denominado pCRDAPA.

20 Una cepa AJ13106 transformante obtenida introduciendo pCRDAPA en la cepa de *E. coli* JM109 ha sido consignada internacionalmente desde el 26 de Mayo de 1.995 con el número de acceso FERM BP-5113 en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of Ministry of International Trade and Industry (código postal: 305, 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón) basándose en el Tratado de Budapest.

25 Se introdujo Brevi.-ori en el pCRDAPA preparado para construir un plásmido que llevaba *dapA* autónomamente replicable en bacterias corineformes. pHK4 fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *BamHI* (producidas por Takara Shuzo), y los extremos escindidos se hicieron romos. La formación de extremos romos se realizó utilizando un estuche DNA Blunting (producido por Takara Shuzo) según el método designado. Tras la formación de extremos romos, se ligó un conector *SmaI* fosforilado (producido por Takara Shuzo) para realizar una modificación de manera que el fragmento de ADN correspondiente a la porción Brevi.-ori pudiera ser escindido de pHK4 mediante digestión solamente con *SmaI*. Este plásmido fue digerido con *SmaI*, y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado fue ligado con pCRDAPA que también había sido digerido con *SmaI* para preparar un plásmido que contenía *dapA* autónomamente replicable en bacterias corineformes. Este plásmido fue denominado pDPSB. El procedimiento de construcción de pDPSB(Km^r) se muestra en la Fig. 8.

(2) Determinación de la secuencia de nucleótidos de *dapS* a partir de *Brevibacterium lactofermentum*

40 El ADN plasmídico fue preparado a partir de la cepa AJ13106 que albergaba pCRDAPA, y su secuencia de nucleótidos fue determinada de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1. En la SEC ID NUM: 19 se muestran la secuencia de nucleótidos determinada y una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos. En la SEC ID NUM: 20 se muestra solamente la secuencia de aminoácidos.

<4> Construcción del plásmido que porta tanto *lysC* mutante como *dapA*

45 Se construyó un plásmido que portaba *lysC* mutante, *dapA*, y el origen de replicación de una bacteria corineforme a partir del plásmido pCRDAPA que portaba *dapA* y el plásmido p399AK9B que portaba *lysC* mutante y Brevi.-ori. p399AK9B fue completamente digerido con *SalI*, y después se hicieron romos los extremos. Un conector *EcoRI* fue ligado con él para construir un plásmido en el cual el sitio *SalI* estaba modificado a un sitio *EcoRI*. El plásmido obtenido fue denominado p399AK9BSE. El *lysC* mutante y Brevi.-ori fueron escindidos como un fragmento mediante digestión parcial de p399AK9BSE con *EcoRI*. Este fragmento fue ligado con pCRDAPA que había sido digerido con *EcoRI*. El plásmido obtenido fue denominado pCRCAB. Este plásmido es autónomamente replicable en *E. coli* y bacterias corineformes, y proporciona al huésped resistencia a la kanamicina, portando el plásmido tanto *lysC* mutante como *dapA*. El procedimiento de construcción de pCRCAB se muestra en la Fig. 9.

<5> Construcción del plásmido que porta tanto *lysC* mutante como *dapB*

55 Se construyó un plásmido que portaba *lysC* mutante y *dapB* a partir del plásmido p399AK9 que portaba *lysC* mutante y el plásmido p399DPR que portaba *dapB*. Se extrajo un fragmento de 1.101 pb que contenía un gen estructural de DDRP mediante digestión de p399DPR con *EcoRV* y *SphI*. Este fragmento fue ligado con p399AK9 que había sido digerido con *SalI* y después se habían hecho romos los extremos y se habían digerido adicionalmente con *SphI* para construir un plásmido que portaba tanto el *lysC* mutante como *dapB*. Este plásmido fue denominado p399AKDDPR.

65 A continuación, se introdujo Brevi.-ori en el p399AKDDPR. El plásmido pHK4 que contenía Brevi.-ori fue digerido con una enzima de restricción *KpnI* (producida por Takara Shuzo), y los extremos escindidos se volvieron romos. La formación de extremos romos se realizó utilizando un estuche DNA Blunting (producido por Takara Shuzo) según el método designado. Tras la formación de extremos romos, se ligó un conector *BamHI* fosforilado (producido por Takara Shuzo) para realizar una modificación de manera que el fragmento de ADN correspondiente a la porción Brevi.-ori

ES 2 214 567 T3

podría ser escindido de pHK4 mediante digestión sólo con BamHI. Este plásmido fue digerido con BamHI, y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado fue ligado con p399AKDDPR que también había sido digerido con BamHI para construir un plásmido que portaba el lysC mutante y dapB autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido fue denominado pCB. El procedimiento de construcción de pCB se muestra en la Fig. 10.

5 <6> *Construcción del plásmido que porta tanto dapA como dapB*

El plásmido pCRDAPA que portaba dapA fue digerido con KpnI y EcoRI para extraer un fragmento de ADN que contenía dapA y el fragmento fue ligado con el plásmido vector pHSG399 que había sido digerido con KpnI y EcoRI. El plásmido obtenido fue denominado p399DPS.

Por otra parte, el plásmido pCRDAPB que portaba dapB fue digerido con SacII y EcoRI para extraer un fragmento de ADN de 2,0 kb que contenía una región que codificaba DDPR y el fragmento fue ligado con p399DPS que había sido digerido con SacII y EcoRI para construir un plásmido que portaba tanto dapA como dapB. El plásmido obtenido fue denominado p399AB.

A continuación, se introdujo Brevi.-ori en p399AB. pHK4 que portaba Brevi.-ori fue digerido con una enzima de restricción BamHI (producida por Takara Shuzo), y los extremos escindidos se volvieron romos. La formación de extremos romos se realizó utilizando un estuche DNA Blunting (producido por Takara Shuzo) según el método designado. Tras la formación de extremos romos, se ligó un conector KpnI fosforilado (producido por Takara Shuzo) para realizar una modificación de manera que el fragmento de ADN correspondiente a la porción Brevi.-ori pudiera ser escindido de pHK4 mediante digestión solamente con KpnI. Este plásmido fue digerido con KpnI, y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado fue ligado con p399AB que también había sido digerido con KpnI para construir un plásmido que portaba dapA y dapB autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido fue denominado pAB. El procedimiento de construcción de pAB se muestra en la Fig. 11.

<7> *Construcción del plásmido que porta lysC mutante, dapA, y dapB juntos*

Se sometió a digestión p399DPS con EcoRI y SphI seguido de la formación de extremos romos para extraer un fragmento génico dapA. Este fragmento fue ligado con p399AK9 que había sido digerido con SalI y sus extremos se habían vuelto romos para construir un plásmido p399CA en el cual coexistían lysC mutante y dapA.

El plásmido pCRDAPB que portaba dapB fue digerido con EcoRI y sus extremos se volvieron romos, seguido de digestión con SacI para extraer un fragmento de ADN de 2,0 kb que comprendía dapB. El plásmido p399CA que portaba dapA y lysC mutante fue digerido con SpeI y sus extremos se volvieron romos, y después de eso fue digerido con SacI y ligado con el fragmento dapB extraído para obtener un plásmido que portaba lysC mutante, dapA, y dapB. Este plásmido fue denominado p399CAB.

A continuación, se introdujo Brevi.-ori en p399CAB. El plásmido pHK4 que portaba Brevi.-ori fue digerido con una enzima de restricción BamHI (producida por Takara Shuzo), y los extremos escindidos se volvieron romos. La formación de extremos romos se realizó utilizando un estuche DNA Blunting (producido por Takara Shuzo) según el método designado. Tras la formación de extremos romos, se ligó un conector KpnI fosforilado (producido por Takara Shuzo) para realizar una modificación de manera que el fragmento de ADN correspondiente a la porción Brevi.-ori pudiera ser escindido de pHK4 mediante digestión solamente con KpnI. Este plásmido fue digerido con KpnI, y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado fue ligado con p399CAB que también había sido digerido con KpnI para construir un plásmido que portaba lysC mutante, dapA y dapB juntos autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido fue denominado pCAB. El procedimiento de construcción de pCAB se muestra en la Fig. 12.

50 <8> *Construcción del plásmido que portaba lysC mutante, dapA, dapB, y lysA juntos*

El plásmido p299LYSA que portaba lysA fue digerido con KpnI y BamHI y sus extremos se volvieron romos, y después se extrajo un fragmento génico lysA. Este fragmento fue ligado con pCAB que había sido digerido con HpaI (producido por Takara Shuzo) y sus extremos se volvieron romos para construir un plásmido que portaba lysC mutante, dapA, dapB, y lysA juntos autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido fue denominado pACBL. El procedimiento de construcción de pACBL se muestra en la Fig. 13. Se observa que el fragmento génico lysA está insertado en un sitio HpaI en un fragmento de ADN que contiene el gen dapB de pACBL, no obstante, el sitio HpaI está localizado aguas arriba de un promotor para el gen dapB (nucleótidos números 611 a 616 de la SEC ID NUM: 23), y el gen dapB no está dividido.

<9> *Construcción del plásmido que porta lysC mutante, dapA, dapB, ddh, y lysA juntos*

pHSG299 fue digerido con XbaI y KpnI, y fue ligado con p399DL, que portaba ddh y lysA que había sido digerido con XbaI y KpnI. El plásmido construido fue denominado p299DL. p299DL fue digerido con XbaI y KpnI y sus extremos se volvieron romos. Tras la formación de extremos romos, se extrajo un fragmento de ADN que portaba ddh y lysA. Este fragmento de ADN fue ligado con el plásmido pCAB que portaba lysC mutante, dapA, y dapB juntos que había sido digerido con HpaI y cuyos extremos se habían vuelto romos para construir un plásmido que portaba lysC

ES 2 214 567 T3

mutante, *dapA*, *dapB*, *lysA* y *ddh* juntos autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido fue denominado pCABDL. El procedimiento de construcción de pCABDL se muestra en la Fig. 14.

Ejemplo 5

5

Introducción de los plásmidos que portan los genes para la biosíntesis de L-lisina en una bacteria productora de L-lisina de Brevibacterium lactofermentum

10 Los plásmidos que portaban los genes para la biosíntesis de L-lisina construidos como se ha descrito antes, esto es, pLYSAB(Cm^r), pPK4D(Cm^r), p399AK9B(Cm^r), pPDSB(Km^r), pDPRB(Cm^r), pCRCAB(Km^r), pAB(Cm^r), pDL(Cm^r), pCB(Cm^r), pCAB(Cm^r), pCABL(Cm^r), y pCABDL(Cm^r) fueron introducidos en una bacteria productora de L-lisina AJ11082 (NRRL B-11470) de *Brevibacterium lactofermentum* respectivamente. La cepa AJ11082 tiene la propiedad de ser resistente a AEC. Los plásmidos fueron introducidos según el método del pulso eléctrico (Sugimoto y col., Solicitud de Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública Núm. 2-207791). Los transformantes fueron
15 seleccionados basándose en los marcadores de resistencia a fármacos poseídos por los respectivos plásmidos. Los transformantes fueron seleccionados en un medio completo que contenía 5 µg/ml de cloramfenicol cuando se introducía un plásmido que portaba un gen de resistencia al cloramfenicol, o los transformantes fueron seleccionado en un medio completo que contenía 25 µg/ml de kanamicina cuando se introducía un plásmido que portaba un gen de resistencia a la kanamicina.

20

Ejemplo 6

Producción de L-lisina

25 Cada uno de los transformantes obtenidos en el Ejemplo 5 fue cultivado en un medio productor de L-lisina para evaluar su productividad de L-lisina. El medio productor de L-lisina tenía la siguiente composición.

Medio productor de L-lisina

30 Se disolvieron los siguientes componentes distintos de carbonato de calcio (por litro) para realizar un ajuste del pH de 8,0 con KOH. El medio fue esterilizado a 115°C durante 15 minutos, y se añadió al medio esterilizado carbonato de calcio (50 g) que había sido esterilizado por separado en aire caliente en estado seco.

35	Glucosa	100 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
	Biotina	500 µg
40	Tiamina	2.000 µg
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
	MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
	Nicotinamida	5 mg
45	Producto hidrolizado de proteína (Mamenou)	30 ml
	Carbonato de calcio	50 g

50 Cada uno de los diversos tipos de los transformantes y la cepa de origen fueron inoculados en el medio que tenía la composición descrita antes para realizar el cultivo a 31,5°C con sacudimiento oscilante. La cantidad de L-lisina producida al cabo de 40 ó 72 horas de cultivo, y el crecimiento al cabo de 72 horas (DO₅₆₂) se muestran la Tabla 1. En la Tabla, *lysC** representa *lysC* mutante. El crecimiento fue determinado cuantitativamente midiendo la DO a 560 nm tras diluir 101 veces.

55

60

65

ES 2 214 567 T3

TABLA 1

Acumulación de L-lisina tras un cultivo de 40 ó 72 horas

5	<u>Cepa</u>	<u>Gen</u>	<u>Cantidad de</u>		<u>Crecimiento</u>
10	<u>Bacteriana/ plásmido</u>	<u>Introducido</u>	<u>L-lisina producida</u>		<u>(DO₅₆₂/101)</u>
			<u>(g/l)</u>		
			<u>Tras 40 h</u>	<u>Tras 72 h</u>	
15	AJ11082		22,0	29,8	0,450
	AJ11082/pLYSAB	<u>lysA</u>	19,8	32,5	0,356
	AJ11082/pPK4D	<u>cdh</u>	19,0	33,4	0,330
20	AJ11082/p399AK9B	<u>lysC*</u>	16,8	34,5	0,398
	AJ11082/pDPSB	<u>dapA</u>	18,7	33,8	0,410
	AJ11082/pDPRB	<u>dapB</u>	19,9	29,9	0,445
25	AJ11082/pCRCAB	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u>	19,7	36,5	0,360
	AJ11082/pAB	<u>dapA</u> , <u>dapB</u>	19,0	34,8	0,390
30	AJ11082/pDL	<u>lysA</u> , <u>ddh</u>	23,3	31,6	0,440
	AJ11082/pCB	<u>lysC*</u> , <u>dapB</u>	23,3	35,0	0,440
	AJ11082/pCAB	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u>			
35		<u>dapB</u>	23,3	31,6	0,440
	AJ11082/pCABL	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u> ,			
		<u>dapB</u> , <u>lysA</u>	26,2	46,5	0,379
40	AJ11082/pCABDL	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u> ,			
		<u>dapB</u> , <u>lysA</u> ,			
		<u>ddh</u>	26,5	47,0	0,409
45					

50 Como se ha mostrado antes, cuando lysA, ddh, lysC mutante, dapA, o dapB eran intensificados individualmente, la cantidad de L-lisina producida al cabo de 72 horas de cultivo era mayor o equivalente a la producida por la cepa de origen, sin embargo, la cantidad de L-lisina producida al cabo de 40 horas de cultivo era menor que la producida por la cepa de origen. Es decir, la velocidad de producción de L-lisina disminuía en el cultivo durante un corto período de tiempo. De un modo similar, cuando se intensificaban lysC mutante y dapA, o dapA y dapB combinados, la cantidad de L-lisina producida al cabo de 72 horas de cultivo era mayor que la producida por la cepa de origen, no obstante, la cantidad de L-lisina producida al cabo de 40 horas de cultivo era más pequeña que la producida por la cepa de origen. De este modo la velocidad de producción de L-lisina disminuía.

55 Por otra parte, cuando sólo se intensificaban lysA y ddh combinados, el crecimiento mejoraba, la velocidad de producción de L-lisina se restauraba con éxito en el corto período de cultivo, y la cantidad de L-lisina acumulada también mejoraba en el cultivo durante un período largo.

60 Asimismo, en el caso de la cepa en la que dapB era intensificado junto con lysC mutante, y en el caso de la cepa en la que dapA así como estos genes eran intensificados simultáneamente, el crecimiento mejoraba y la velocidad de producción de L-lisina aumentaba en comparación con la cepa de origen. En el caso de la cepa en la que estos tres genes eran intensificados simultáneamente, tanto la velocidad de producción de L-lisina como la cantidad de L-lisina acumulada mejoraban adicionalmente intensificando adicionalmente lysA y ddh.

REIVINDICACIONES

5 1. Un vector autónomamente replicable en células de bacterias corineformes, que comprende tanto una secuencia de ADN que codifica una diaminopimelato descarboxilasa, como una secuencia de ADN que codifica una diaminopimelato deshidrogenasa.

10 2. El vector según la reivindicación 1, donde dicha secuencia de ADN que codifica la diaminopimelato descarboxilasa codifica una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NUM: 5 del Listado de Secuencias, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NUM: 5.

15 3. El vector según la reivindicación 1, donde dicha secuencia de ADN que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID NUM: 9 del Listado de Secuencias, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID NUM: 9.

20 4. Una bacteria corineforme en la que la actividad intracelular tanto de la diaminopimelato descarboxilasa como la de la diaminopimelato deshidrogenasa son incrementadas aumentando el número de copias de las secuencias de ADN que codifican dichas enzimas, utilizando un promotor potentes, o una combinación de los mismos.

25 5. La bacteria corineforme según la reivindicación 4, que es transformada mediante la introducción del vector definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

30 6. Un método para producir L-lisina que comprende las etapas de cultivar dicha bacteria corineforme definida en la reivindicación 4 ó 5 en un medio, para permitir que se produzca y se acumule L-lisina en un cultivo, y recoger la L-lisina del cultivo.

35
40
45
50
55
60

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

FIG. 1

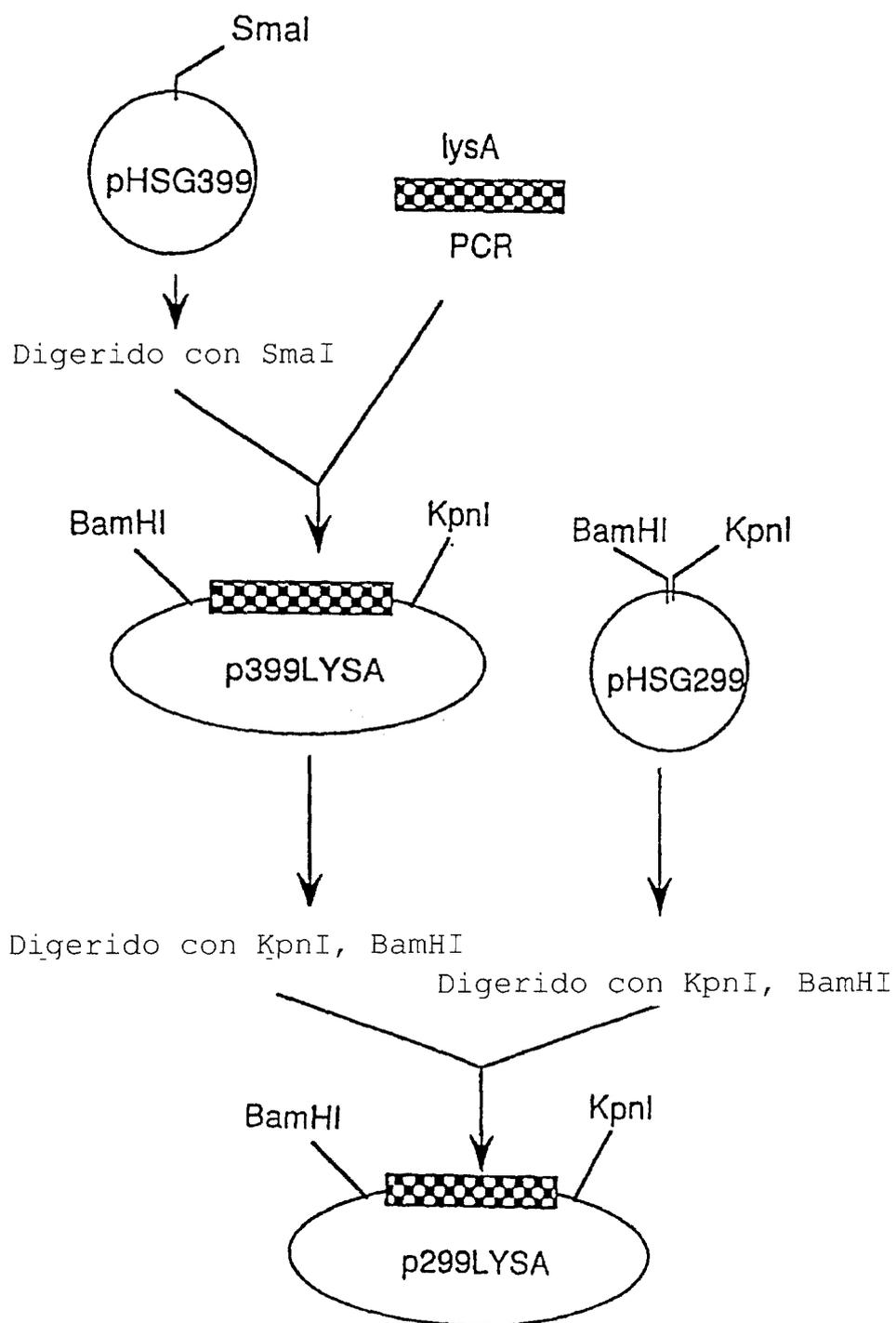


FIG. 2

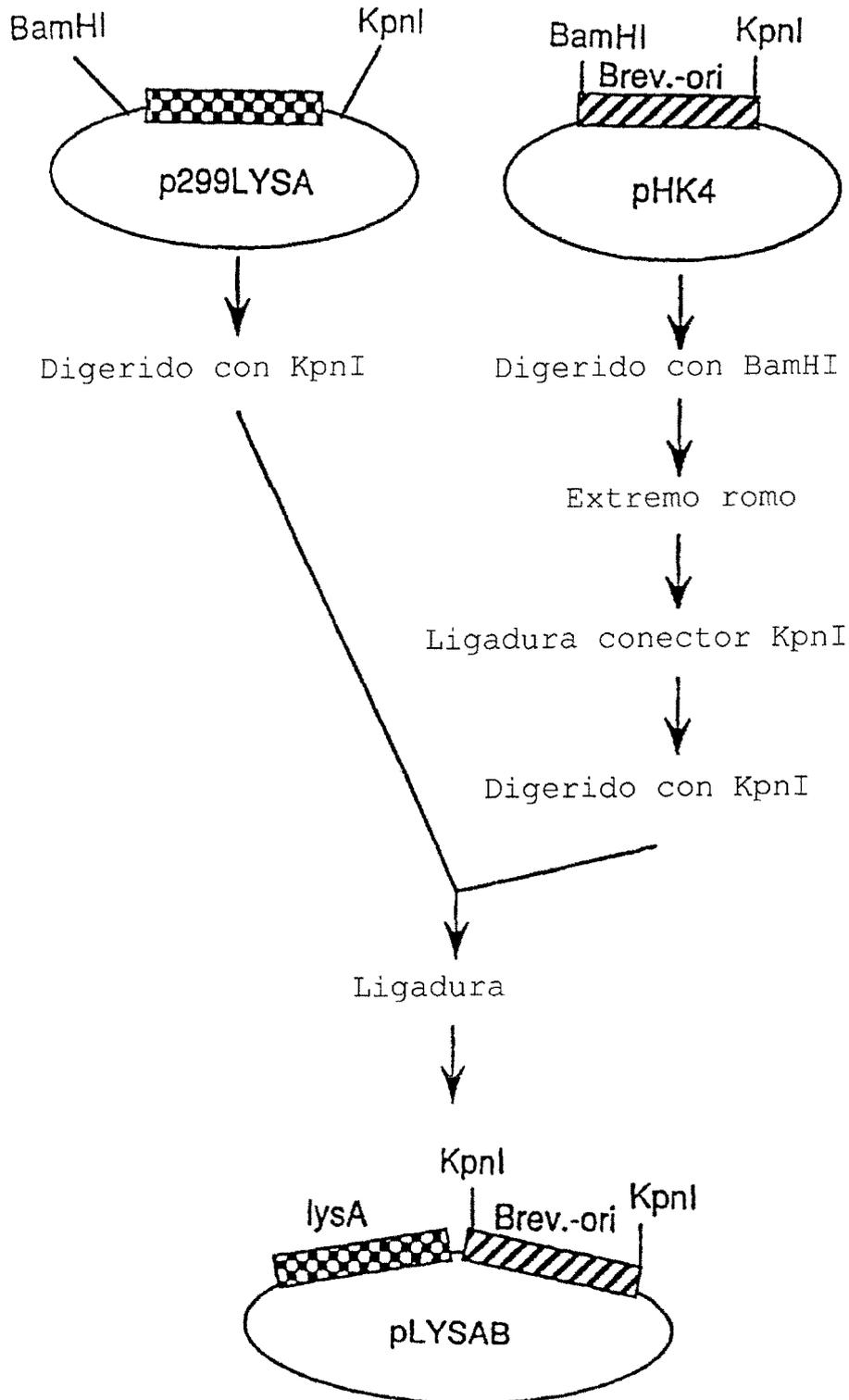


FIG. 3

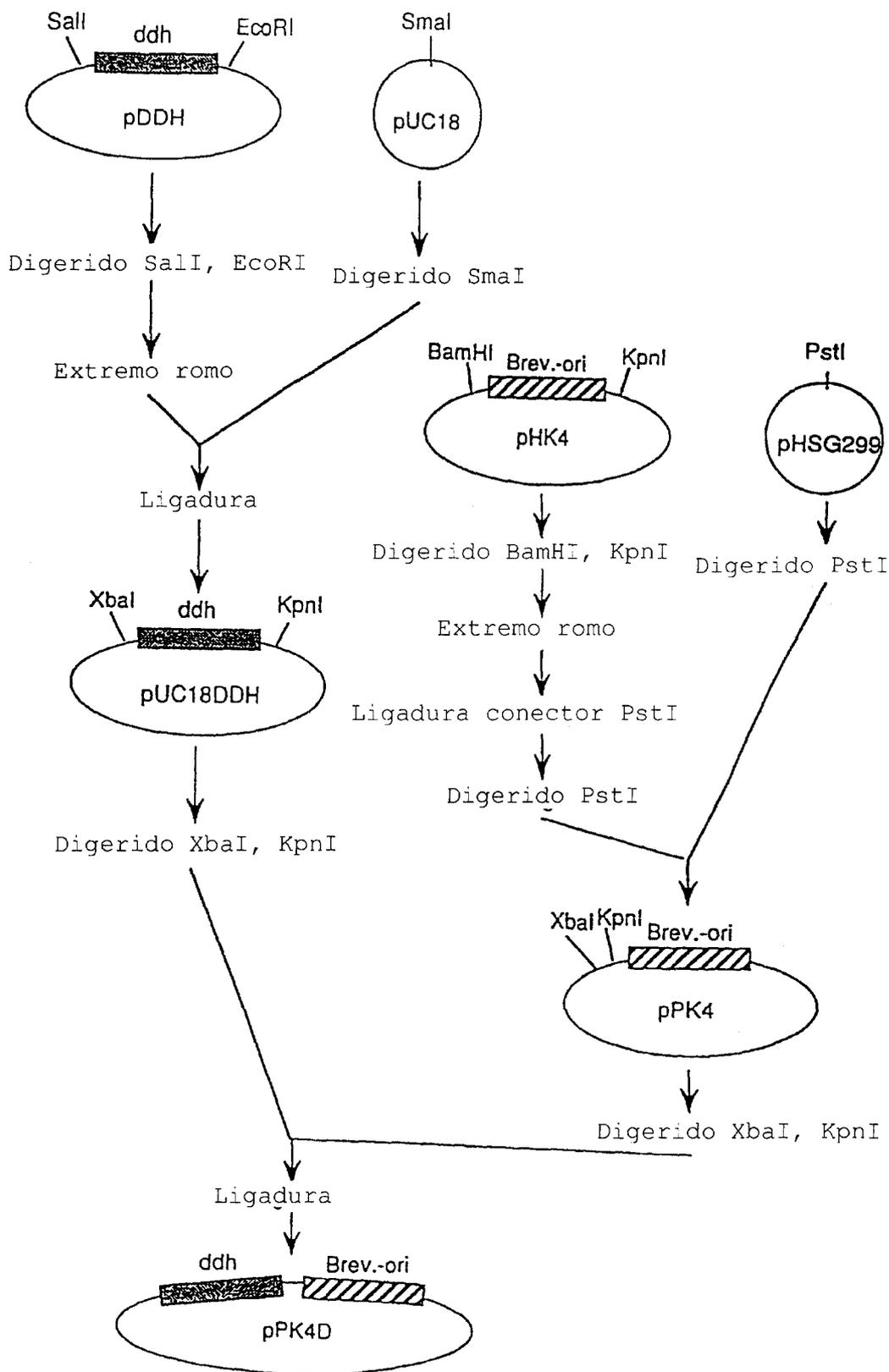


FIG. 4

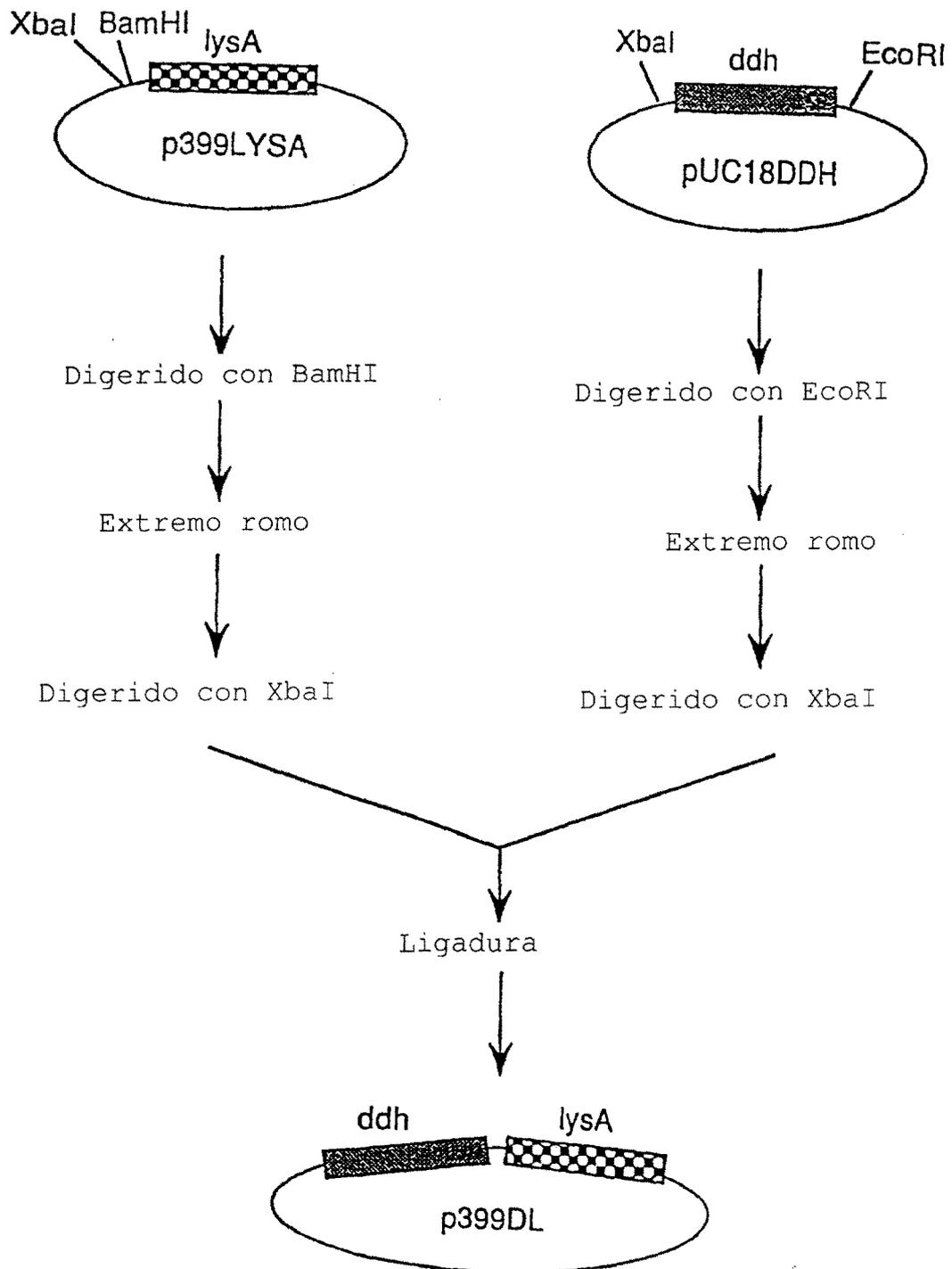


FIG. 5

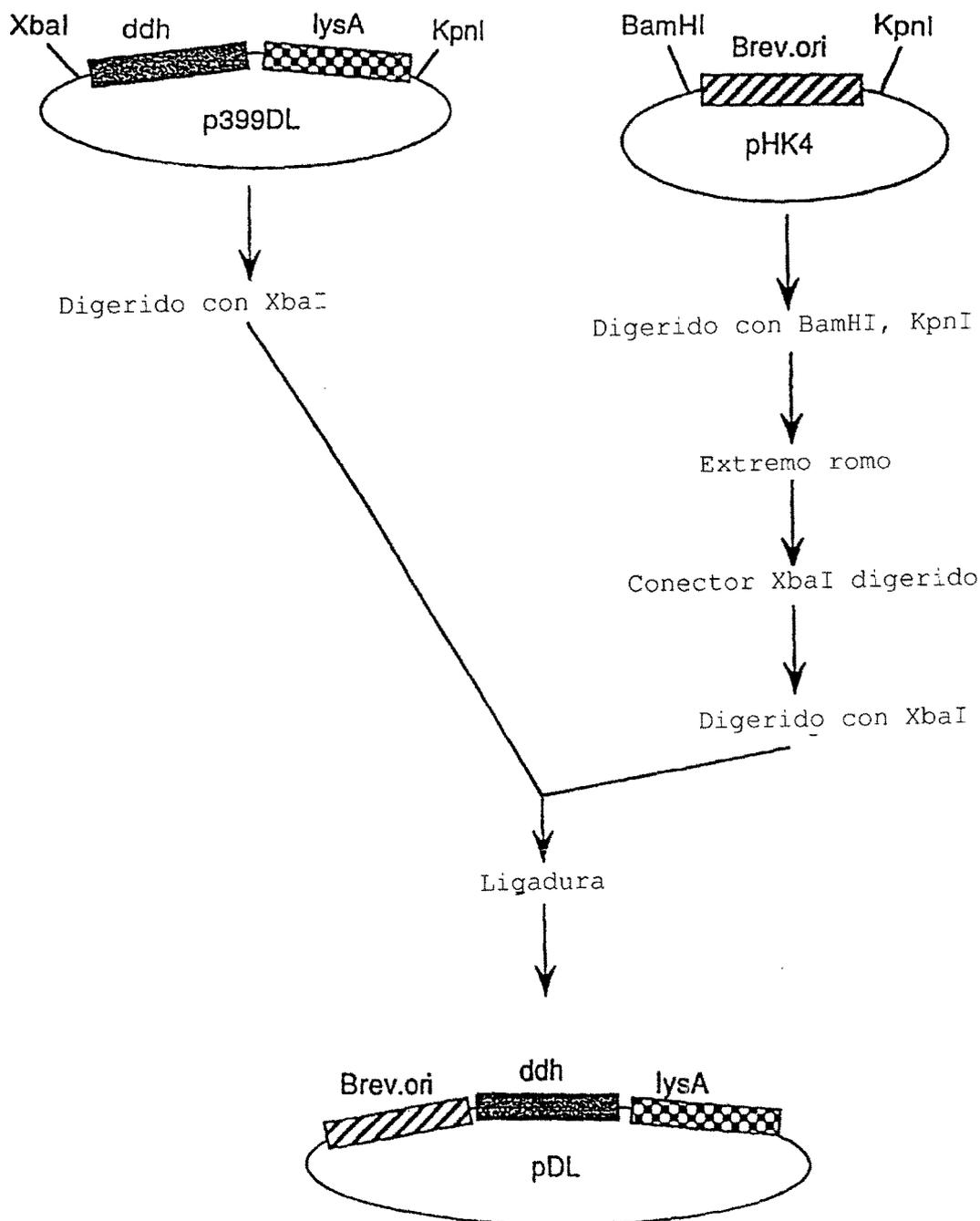


FIG. 6

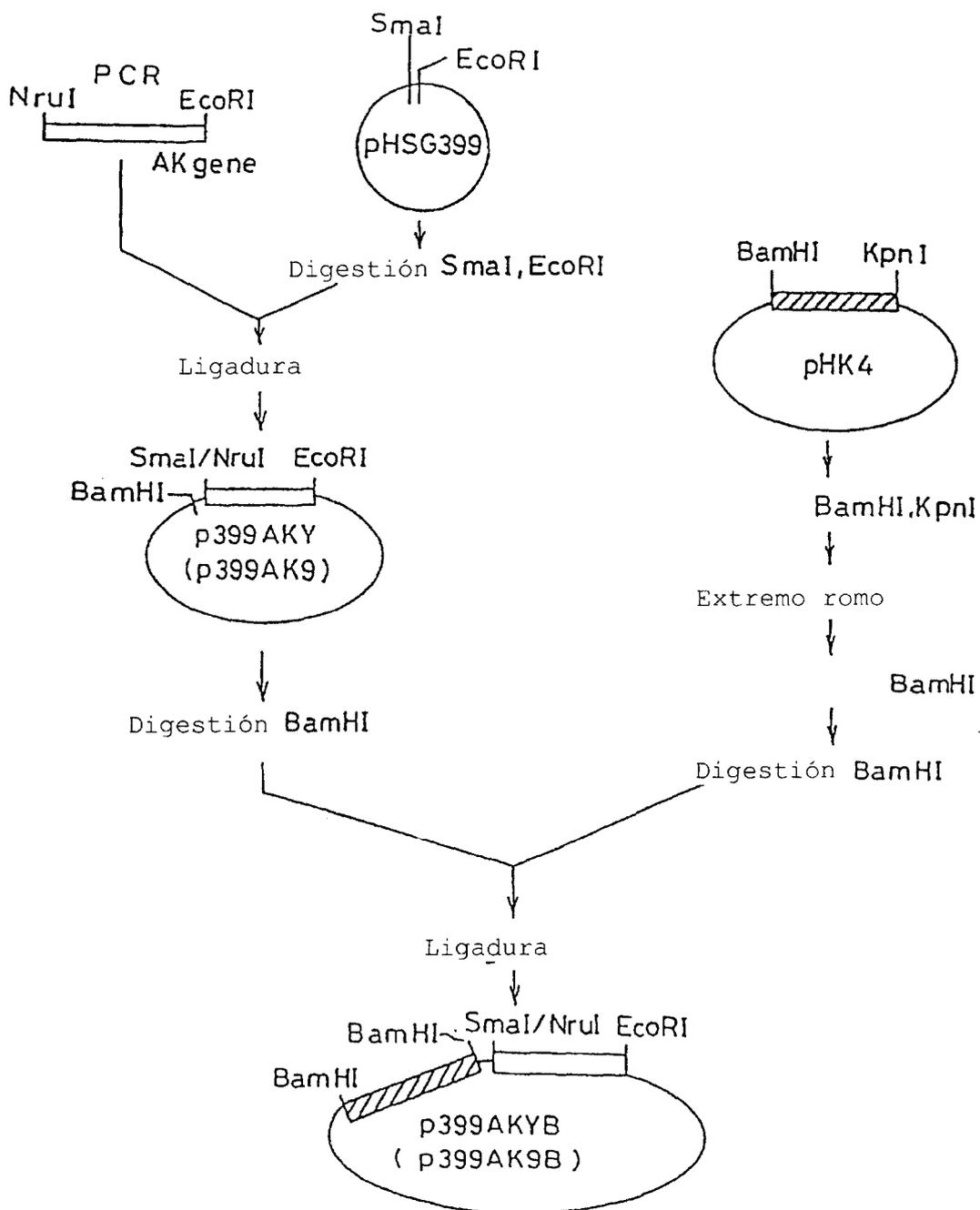


FIG. 7

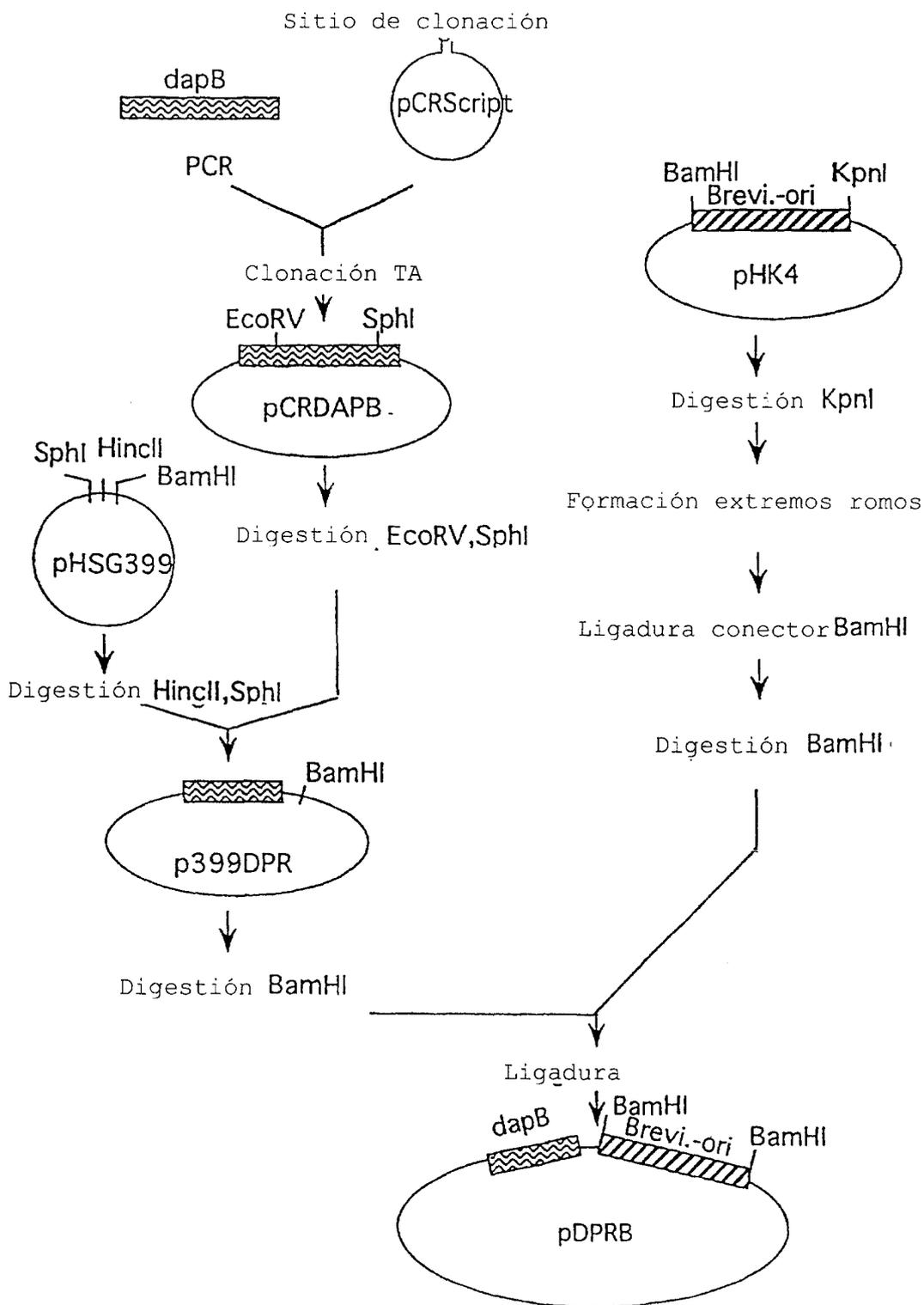


FIG. 8

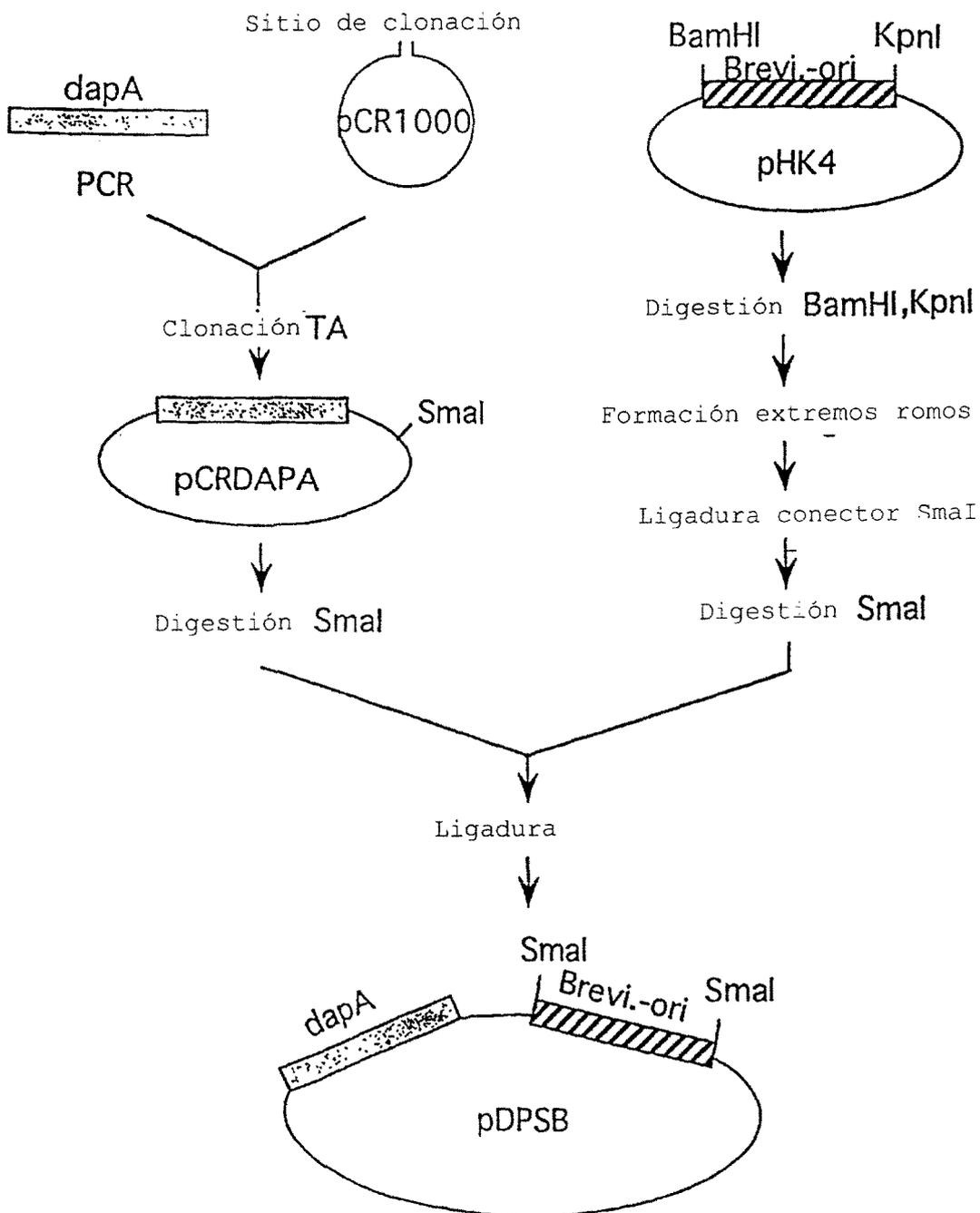


FIG. 9

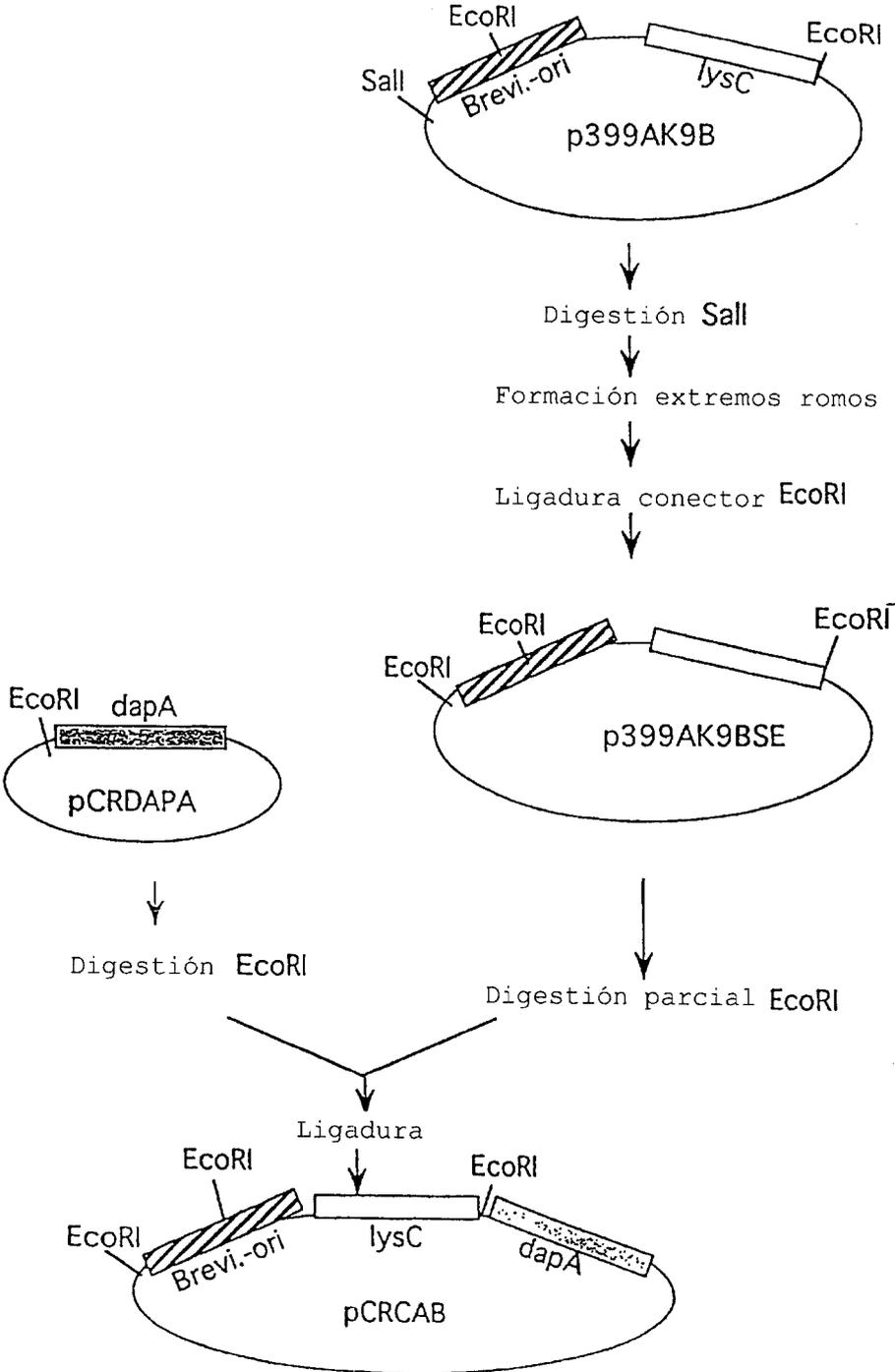


FIG. 10

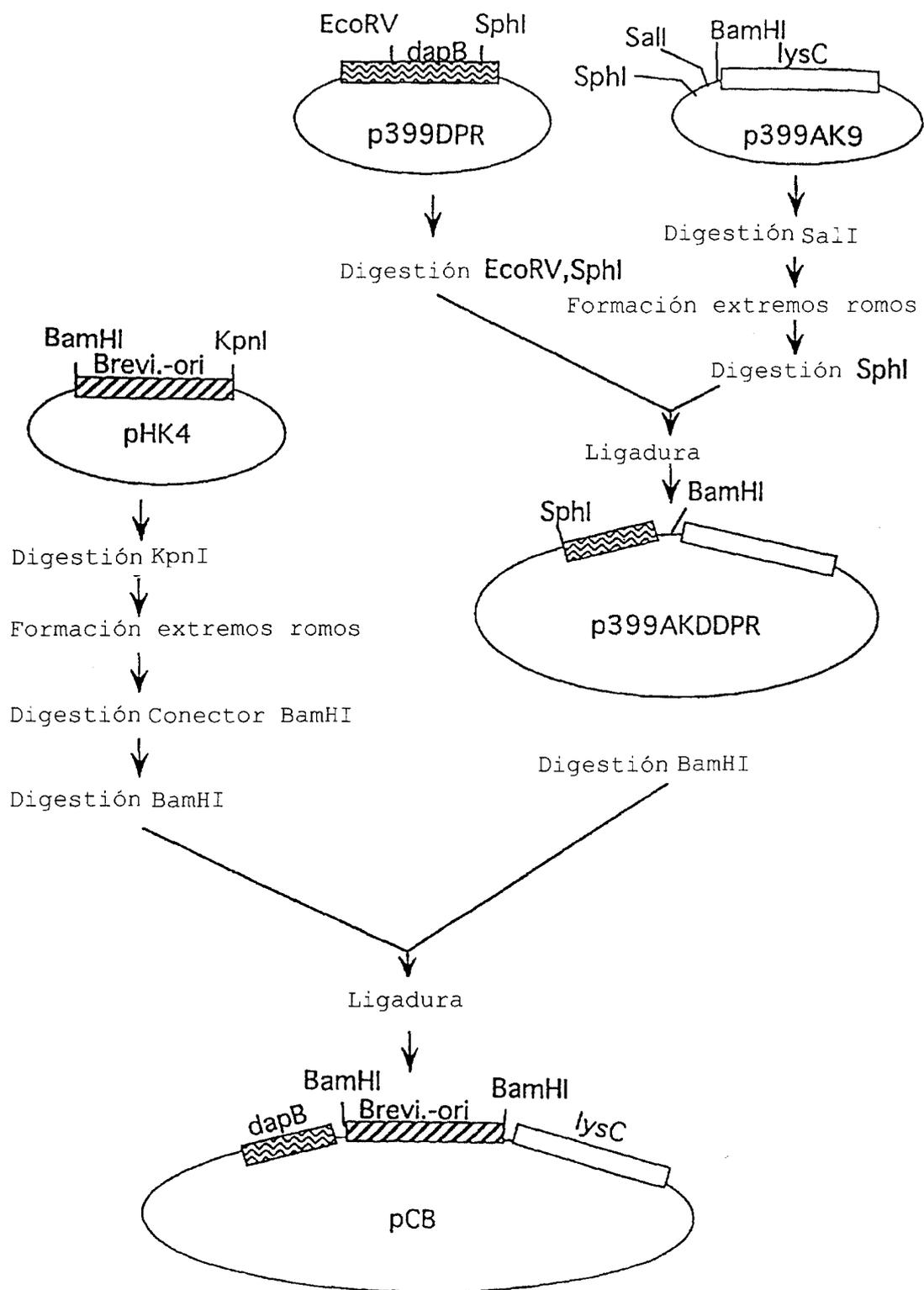


FIG. 11

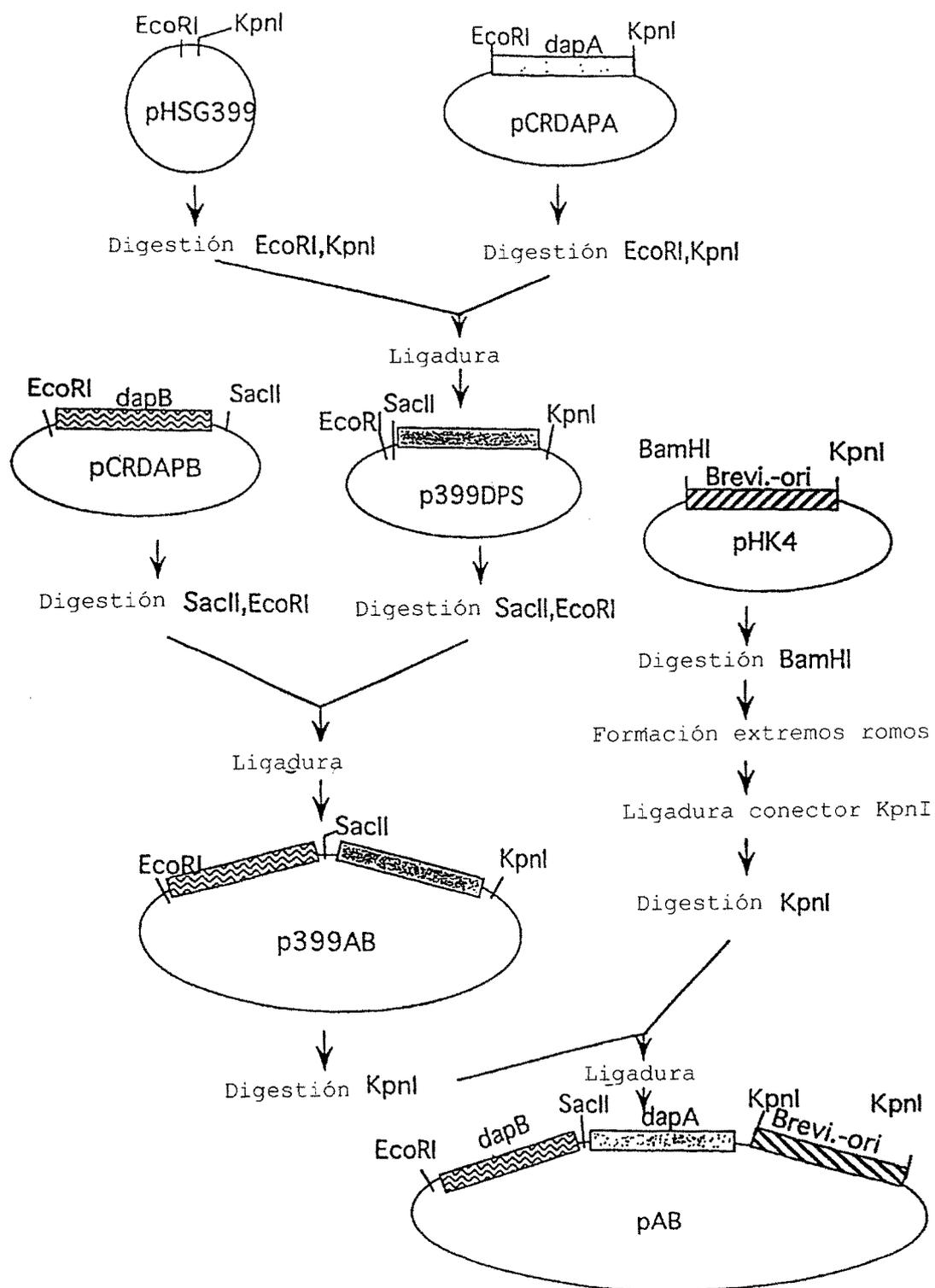


FIG. 12

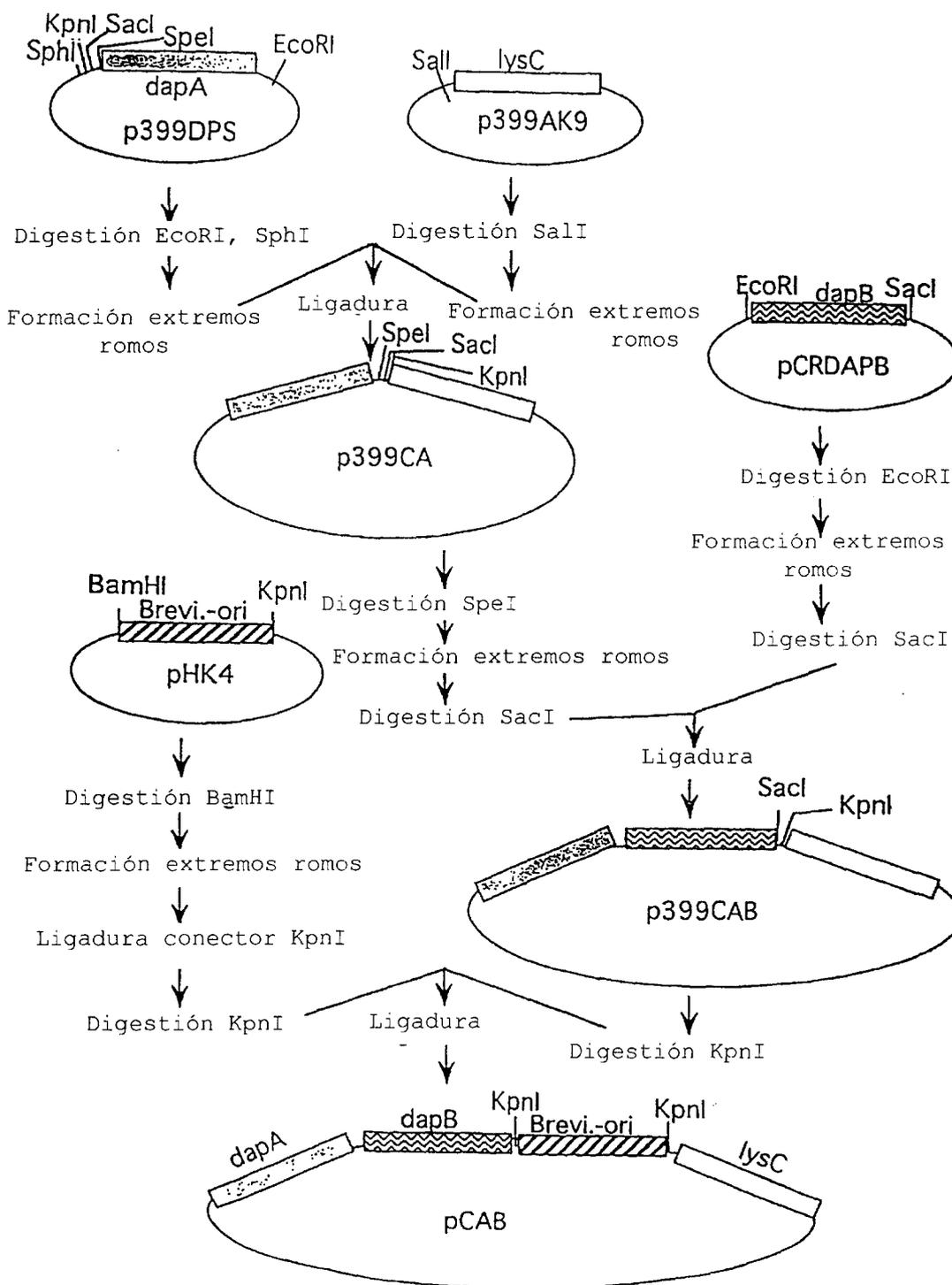


FIG. 13

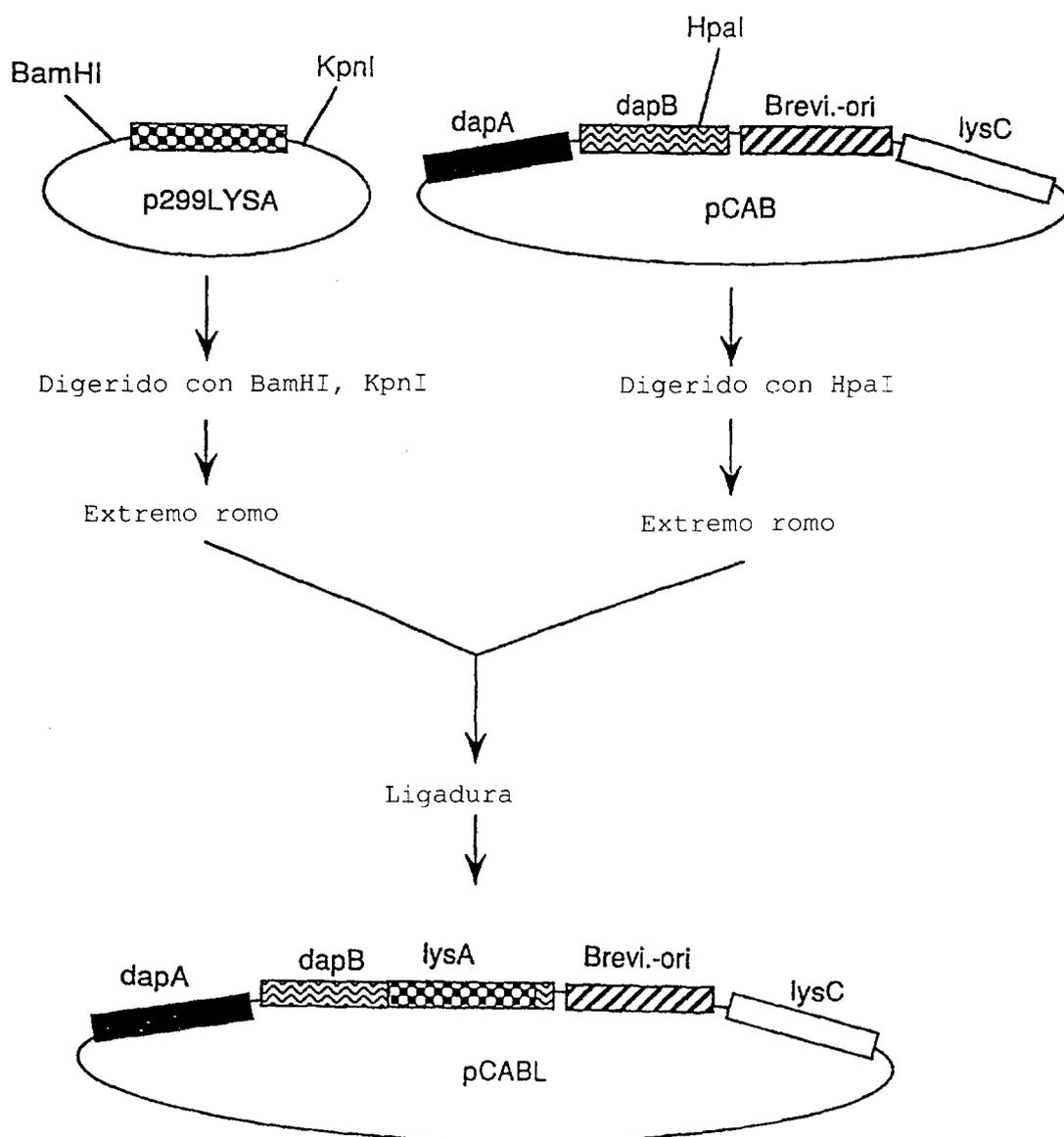
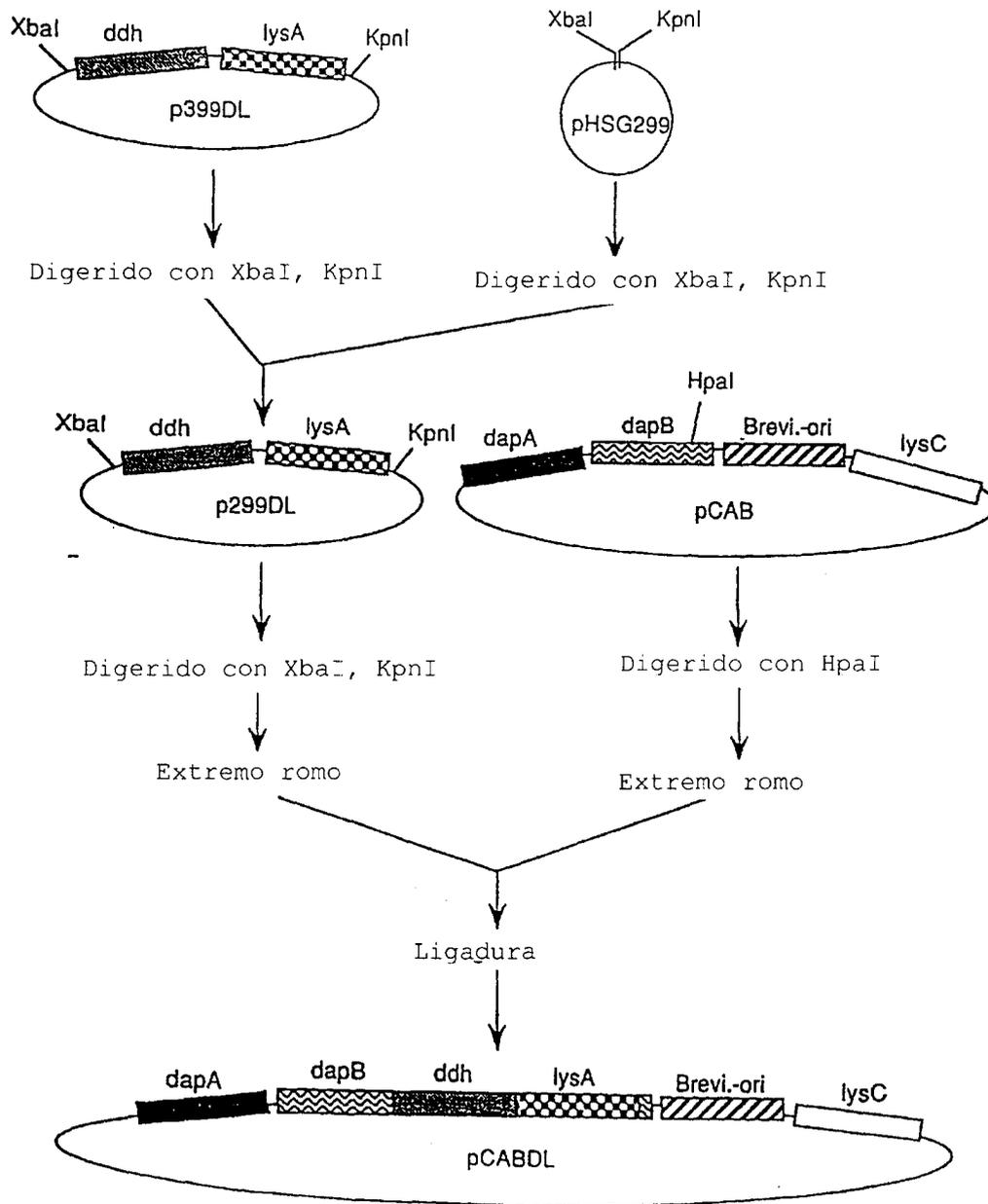


FIG. 14



ES 2 214 567 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: AJINOMOTO CO., LTD.
(ii) TITULO DE LA INVENCION: MÉTODO PARA PRODUCIR L-LISINA
(iii) NUMERO DE SECUENCIAS: 24
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
(A) DESTINATARIO:
(B) CALLE:
(C) CIUDAD:
15 (E) PAÍS
(F) CÓDIGO POSTAL:
- (v) FORMA LEGIBLE CON ORDENADOR:
20 (A) TIPO MEDIO: Disco flexible
(B) ordenador: PC compatible con IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOPORTE LÓGICO: PatentIn Release #0,1, Versión #1.30
- 25 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
(A) NUMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE SOLICITUD:
(C) CLASIFICACIÓN:
- 30 (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
(A) NUMERO DE SOLICITUD: JP 8-142812
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 05-JUN-1996
- 35 (viii) INFORMACIÓN DEL AGENTE/APODERADO:
(A) NOMBRE:
(B) NUMERO DE REGISTRO:
- 40 (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:
(A) TELÉFONO:
(B) FAX:

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 1

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
50 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
(D) TIPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: desc= "ADN Sintético"
- 55 (iv) ANTI-SENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 1:

60 GTGGAGCCGA CCATTCCGCG AGG

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 2

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 23 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla

ES 2 214 567 T3

(D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: desc= "ADN Sintético"

5

(iv) ANTI-SENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 2:

10

CCAAAACCGC CCTCCACGGC GAA

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15

(A) LONGITUD: 3579 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble

(D) TIPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN Genómico

(vi) FUENTE ORIGINAL:

25

(A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*

(B) CEPA: ATCC 13869

(ix) RASGOS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 533..2182

30

(ix) RASGOS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 2188..3522

35

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 3:

40

45

50

55

60

65

ES 2 214 567 T3

5 GCA AAC CCA ACC GGA CCT ATT CAC CTT GGC GGA ACC CGC TGG GCT GCC 967
 Ala Asn Pro Thr Gly Pro Ile His Leu Gly Gly Thr Arg Trp Ala Ala
 130 135 140 145
 10 GTG GGT GAC TCT TTG GGT CGT GTG CTG GAG GCT TCC GGC GCG AAA GTG 1015
 Val Gly Asp Ser Leu Gly Arg Val Leu Glu Ala Ser Gly Ala Lys Val
 150 155 160
 15 ACC CGC GAA TAC TAC TTC AAC GAT CAC GGT CGC CAG ATC GAT CGT TTC 1063
 Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg Phe
 165 170 175
 20 GCT TTG TCC CTT CTT GCA GCG GCG AAG GGC GAG CCA ACG CCA GAA GAC 1111
 Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Glu Pro Thr Pro Glu Asp
 180 185 190
 25 GGT TAT GGC GGC GAA TAC ATT AAG GAA ATT GCG GAG GCA ATC GTC GAA 1159
 Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val Glu
 195 200 205
 30 AAG CAT CCT GAA GCG TTG GCT TTG GAG CCT GCC GCA ACC CAG GAG CTT 1207
 Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu Leu
 210 215 220 225
 35 TTC CGC GCT GAA GGC GTG GAG ATG ATG TTC GAG CAC ATC AAA TCT TCC 1255
 Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser Ser
 230 235 240
 40 CTG CAT GAG TTC GGC ACC GAT TTC GAT GTC TAC TAC CAC GAG AAC TCC 1303
 Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn Ser
 245 250 255
 45 CTG TTC GAG TCC GGT GCG GTG GAC AAG GCC GTG CAG GTG CTG AAG GAC 1361
 Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys Asp
 260 265 270
 50 AAC GGC AAC CTG TAC GAA AAC GAG GGC GCT TGG TGG CTG CGT TCC ACC 1399
 Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser Thr
 275 280 285
 55 GAA TTC GGC GAT GAC AAA GAC CGC GTG GTG ATC AAG TCT GAC GGC GAC 1447
 Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly Asp
 290 295 300 305
 60 GCA GCC TAC ATC GCT GGC GAT ATC GCG TAC GTG GCT GAT AAG TTC TCC 1495
 Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe Ser
 310 315 320

65

ES 2 214 567 T3

5	CTC TAC GGC TCC GAA TAC GAC GCC CGC GTA GTA TCC CGC TTC GCC GAA Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu 350 355 360	3270
10	GGA GAC CCA GTA AGC ACC CGC ATC GTG GGC TCC CAC TGC GAA TCC GGC Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly 365 370 375	3318
15	GAT ATC CTG ATC AAC GAT GAA ATC TAC CCA TCT GAC ATC ACC AGC GGC Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly 380 385 390	3366
20	GAC TTC CTT GCA CTC GCA GCC ACC GGC GCA TAC TGC TAC GCC ATG AGC Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser 395 400 405	3414
25	TCC CGC TAC AAC GCC TTC ACA CGG CCC GCC GTC GTG TCC GTC CGC GCT Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala 410 415 420 425	3462
30	GGC AGC TCC CGC CTC ATG CTG CGC CGC GAA ACG CTC GAC GAC ATC CTC Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu 430 435 440	3510
35	TCA CTA GAG GCA TAACGCTTTT CGACGCCTGA CCCC GCCCTT CACCTTCGCC Ser Leu Glu Ala 445	3562
40	GTGGAGGGCG GTTTTGG	3579

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 550 pares de bases
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: Proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 4:

50	Met Thr Pro Ala Asp Leu Ala Thr Leu Ile Lys Glu Thr Ala Val Glu 1 5 10 15	
55	Val Leu Thr Ser Arg Glu Leu Asp Thr Ser Val Leu Pro Glu Gln Val 20 25 30	
60	Val Val Glu Arg Pro Arg Asn Pro Glu His Gly Asp Tyr Ala Thr Asn 35 40 45	
65		

ES 2 214 567 T3

5 Ile Ala Leu Gln Val Ala Lys Lys Val Gly Gln Asn Pro Arg Asp Leu
 50 55 60
 Ala Thr Trp Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Asp Asp Ala Ile Asp Ser
 65 70 75 80
 10 Ala Glu Ile Ala Gly Pro Gly Phe Leu Asn Ile Arg Leu Ala Ala Ala
 85 90 95
 Ala Gln Gly Glu Ile Val Ala Lys Ile Leu Ala Gln Gly Glu Thr Phe
 15 100 105 110
 Gly Asn Ser Asp His Leu Ser His Leu Asp Val Asn Leu Glu Phe Val
 115 120 125
 20 Ser Ala Asn Pro Thr Gly Pro Ile His Leu Gly Gly Thr Arg Trp Ala
 130 135 140
 Ala Val Gly Asp Ser Leu Gly Arg Val Leu Glu Ala Ser Gly Ala Lys
 25 145 150 155 160
 Val Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg
 165 170 175
 30 Phe Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Lys Gly Glu Pro Thr Pro Glu
 180 185 190
 Asp Gly Tyr Gly Gly Glu Tyr Ile Lys Glu Ile Ala Glu Ala Ile Val
 35 195 200 205
 Glu Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu
 40 210 215 220
 Leu Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser
 225 230 235 240
 45 Ser Leu His Glu Phe Gly Thr Asp Phe Asp Val Tyr Tyr His Glu Asn
 245 250 255
 Ser Leu Phe Glu Ser Gly Ala Val Asp Lys Ala Val Gln Val Leu Lys
 50 260 265 270
 Asp Asn Gly Asn Leu Tyr Glu Asn Glu Gly Ala Trp Trp Leu Arg Ser
 275 280 285
 55 Thr Glu Phe Gly Asp Asp Lys Asp Arg Val Val Ile Lys Ser Asp Gly
 290 295 300
 Asp Ala Ala Tyr Ile Ala Gly Asp Ile Ala Tyr Val Ala Asp Lys Phe
 60 305 310 315 320
 Ser Arg Gly His Asn Leu Asn Ile Tyr Met Leu Gly Ala Asp His His
 325 330 335
 65

ES 2 214 567 T3

5 Gly Tyr Ile Ala Arg Leu Lys Ala Ala Ala Ala Ala Leu Gly Tyr Lys
 340 345 350
 Pro Glu Gly Val Glu Val Leu Ile Gly Gln Met Val Asn Leu Leu Arg
 355 360 365
 10 Asp Gly Lys Ala Val Arg Met Ser Lys Arg Ala Gly Thr Val Val Thr
 370 375 380
 Leu Asp Asp Leu Val Glu Ala Ile Gly Ile Asp Ala Ala Arg Tyr Ser
 15 385 390 395 400
 Leu Ile Arg Ser Ser Val Asp Ser Ser Leu Asp Ile Asp Leu Gly Leu
 20 405 410 415
 Trp Glu Ser Gln Ser Ser Asp Asn Pro Val Tyr Tyr Val Gln Tyr Gly
 420 425 430
 25 His Ala Arg Leu Cys Ser Ile Ala Arg Lys Ala Glu Thr Leu Gly Val
 435 440 445
 Thr Glu Glu Gly Ala Asp Leu Ser Leu Leu Thr His Asp Arg Glu Gly
 30 450 455 460
 Asp Leu Ile Arg Thr Leu Gly Glu Phe Pro Ala Val Val Lys Ala Ala
 465 470 475 480
 35 Ala Asp Leu Arg Glu Pro His Arg Ile Ala Arg Tyr Ala Glu Glu Leu
 485 490 495
 Ala Gly Thr Phe His Arg Phe Tyr Asp Ser Cys His Ile Leu Pro Lys
 40 500 505 510
 Val Asp Glu Asp Thr Ala Pro Ile His Thr Ala Arg Leu Ala Leu Ala
 45 515 520 525
 Ala Ala Thr Arg Gln Thr Leu Ala Asn Ala Leu His Leu Val Gly Val
 50 530 535 540
 Ser Ala Pro Glu Lys Met
 545 550

55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 60 (A) LONGITUD: 445 aminoácidos
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 5:

ES 2 214 567 T3

(ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico
 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "ADN Sintético"

(vi) ANTISENTIDO: SI

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NUM: 7:

TGCCCCTCGA GCTAAATTAG

20

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 8

(i) CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1034 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 15 (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN Genómico

20 (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*
- (B) CEPA: ATCC 13869

25 (ix) RASGOS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 61..1020

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 8:

30 ATGCATCTCG GTAAGCTCGA CCAGGACAGT GCCACCACAA TTTTGGAGGA TTACAAGAAC 60
 ATG ACC AAC ATC CGC GTA GCT ATC GTG GGC TAC GGA AAC CTG GGA CGC 108
 35 Met Thr Asn Ile Arg Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Arg
 1 5 10 15
 AGC GTC GAA AAG CTT ATT GCC AAG CAG CCC GAC ATG GAC CTT GTA GGA 156
 40 Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly
 20 25 30
 ATC TTC TCG CGC CGG GCC ACC CTC GAC ACA AAG ACG CCA GTC TTT GAT 204
 45 Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp
 35 40 45

50

55

60

65

ES 2 214 567 T3

	GTC GCC GAC GTG GAC AAG CAC GCC GAC GAC GTG GAC GTG CTG TTC CTG	252
	Val Ala Asp Val Asp Lys His Ala Asp Asp Val Asp Val Leu Phe Leu	
5	50 55 60	
	TGC ATG GGC TCC GCC ACC GAC ATC CCT GAG CAG GCA CCA AAG TTC GCG	300
	Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala	
10	65 70 75 80	
	CAG TTC GCC TGC ACC GTA GAC ACC TAC GAC AAC CAC CGC GAC ATC CCA	348
	Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro	
15	85 90 95	
	CGC CAC CGC CAG GTC ATG AAC GAA GCC GCC ACC GCA GCC GGC AAC GTT	396
	Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val	
20	100 105 110	
	GCA CTG GTC TCT ACC GGC TGG GAT CCA GGA ATG TTC TCC ATC AAC CGC	444
	Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg	
25	115 120 125	
	GTC TAC GCA GCG GCA GTC TTA GCC GAG CAC CAG CAG CAC ACC TTC TGG	492
	Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp	
30	130 135 140	
	GGC CCA GGT TTG TCA CAG GGC CAC TCC GAT GCT TTG CGA CGC ATC CCT	540
	Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro	
35	145 150 155 160	
	GGC GTT CAA AAG GCA GTC CAG TAC ACC CTC CCA TCC GAA GAC GCC CTG	588
	Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu	
40	165 170 175	
	GAA AAG GCC CGC CGC GGC GAA GCC GGC GAC CTT ACC GGA AAG CAA ACC	636
	Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr	
45	180 185 190	
	CAC AAG CGC CAA TGC TTC GTG GTT GCC GAC GCG GCC GAT CAC GAG CGC	684
	His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg	
50	195 200 205	
	ATC GAA AAC GAC ATC CGC ACC ATG CCT GAT TAC TTC GTT GGC TAC GAA	732
	Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu	
55	210 215 220	
	GTC GAA GTC AAC TTC ATC GAC GAA GCA ACC TTC GAC TCC GAG CAC ACC	780
	Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr	
60	225 230 235 240	

60

65

ES 2 214 567 T3

Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val
 100 105 110
 5 Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg
 115 120 125
 Val Tyr Ala Ala Ala Val Leu Ala Glu His Gln Gln His Thr Phe Trp
 10 130 135 140
 Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro
 145 150 155 160
 15 Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu
 165 170 175
 Glu Lys Ala Arg Arg Gly Glu Ala Gly Asp Leu Thr Gly Lys Gln Thr
 20 180 185 190
 His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg
 195 200 205
 25 Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu
 210 215 220
 Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr
 30 225 230 235 240
 Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly
 245 250 255
 35 Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp
 260 265 270
 Phe Thr Ala Ser Ser Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met
 40 275 280 285
 Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro
 290 295 300
 45 Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val
 305 310 315 320

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla

(D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCION: /desc = "ADN Sintético"

(vi) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NUM: 10:

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTT

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 11

ES 2 214 567 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "ADN Sintético"

(vi) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NUM: 11:

ACGGAATTCA ATCTTACGGC C

21

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 12

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1643 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN Genómico

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*
- (B) CEPA: ATCC 13869

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 12:

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAT TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAAGTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTCCCT CGCTTGAGAG TGCAGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTCTGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
GAACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGCTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480

ES 2 214 567 T3

	GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCGCCAC	540
	GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACCG GGTCTGTGTC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600
5	AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCCACCACG	660
	TTGGGTCGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGCCTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720
	GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCGCG CATCGTTCCT	780
	AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACTTGC TGCTGTTGGC	840
10	TCCAAGATT TGGTCTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTG CATTCAATGT GCCACTTCGC	900
	GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
	CCTGTGGAAG AAGCAGTCCT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC	1020
15	GTTCTGGGTA TTTCCGATAA GCCAGGCGAG GCTGCCAAGG TTTTCCGTGC GTTGGCTGAT	1080
	GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTCTGCGAG AACGTCTCCT CTGTGGAAGA CGGCACCACC	1140
	GACATCACGT TCACCTGCCC TCGCGCTGAC GGACGCCGTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG	1200
20	CTTCAGGTT AGGGCAACTG GACCAATGTG CTTTACGACG ACCAGGTCGG CAAAGTCTCC	1260
	CTCGTGGGTG CTGGCATGAA GTCTCACCCA GGTGTTACCG CAGAGTTCAT GGAAGCTCTG	1320
	CGCGATGTCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCCACCTCTG AGATCCGCAT TTCCGTGCTG	1380
25	ATCCGTGAAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCATTGC ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC	1440
	GGCGAAGACG AAGCCGTCGT TTATGCAGGC ACCGGACGCT AAAGTTTTAA AGGAGTAGTT	1500
	TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTCCGCCAG GTTATGCGCA	1560
30	CCCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCAGCTG AACTGTTCG TTTCTTTGCT TCCCGCGTT	1620
	CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC	1643

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 13

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1643 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN Genómico

45 (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*
- (B) CEPA: ATCC 13869

50 (ix) RASGOS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACION: 217..1482

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 13:

55

60

65

ES 2 214 567 T3

	TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTA AAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60
	TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCTGT	120
5	GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
	GTAAGTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG	234
	Met Ala Leu Val Val Gln	
	1 5	
10	AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC	282
	Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val	
	10 15 20	
15	GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT	330
	Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val	
	25 30 35	
20	GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA	378
	Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala	
	40 45 50	
25	GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG	426
	Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu	
	55 60 65 70	
30	ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC GTC GCC ATG GCT ATT GAG	474
	Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu	
	75 80 85	
35	TCC CTT GGC GCA GAA GCT CAA TCT TTC ACT GGC TCT CAG GCT GGT GTG	522
	Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val	
	90 95 100	
40	CTC ACC ACC GAG CGC CAC GGA AAC GCA CGC ATT GTT GAC GTC ACA CCG	570
	Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro	
	105 110 115	
45	GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC AAG ATC TGC ATT GTT GCT	618
	Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala	
	120 125 130	
50	GGT TTT CAG GGT GTT AAT AAA GAA ACC CGC GAT GTC ACC ACG TTG GGT	666
	Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly	
	135 140 145 150	
55	CGT GGT GGT TCT GAC ACC ACT GCA GTT GCG TTG GCA GCT GCT TTG AAC	714
	Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Asn	
	155 160 165	

60

65

ES 2 214 567 T3

GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC 1338
 Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn
 360 365 370
 5 ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT 1386
 Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg
 375 380 385 390
 10 GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG 1434
 Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln
 395 400 405
 15 CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA 1482
 Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg
 410 415 420
 20 AGTTTAAAG GAGTAGTTT ACAATGACCA CCATCGCAGT TGTTGGTGCA ACCGGCCAGG 1542
 TCGCCAGGT TATGCGCACC CTTTGGGAAG AGCGCAATT CCCAGCTGAC ACTGTTCGTT 1602
 TCTTGCTTC CCCGCGTCC GCAGGCCGTA AGATTGAATT C 1643

25 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 421 aminoácidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 14:

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 40 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30
 45 Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45
 50 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 55 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95
 60
 65

ES 2 214 567 T3

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 5 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125
 Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 10 130 135 140
 Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160
 15 Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175
 Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 20 180 185 190
 Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 25 195 200 205
 Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220
 Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
 30 225 230 235 240
 Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
 35 245 250 255
 Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
 260 265 270
 40 Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
 275 280 285
 Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
 45 290 295 300
 Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg
 305 310 315 320
 50 Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
 325 330 335
 Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
 55 340 345 350
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 60 355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
 370 375 380

65

ES 2 214 567 T3

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 16:

```

5      Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala
      1          5          10          15
      Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys
10     20          25          30
      Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu
      35          40          45
15     Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr
      50          55          60
      Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu
20     65          70          75          80
      Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly
      85          90          95
25     Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr
      100         105         110
      Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu
30     115         120         125
      Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp
      130         135         140
35     Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly
      145         150         155         160
      Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg
40     165         170
  
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- 50 (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "ADN Sintético"

(iv) ANTISENTIDO: NO

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 17:

GTCGACGGAT CGCAAATGGC AAC

23

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 18

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TIPOLOGIA: lineal

ES 2 214 567 T3

- (ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "ADN Sintético"

(iv) ANTISENTIDO: SI

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 18:

GGATCCTTGA GCACCTTGCG CAG

23

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 19

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1411 pares de bases
15 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
(D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN Genómico

20 (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*
(B) CEPA: ATCC 13689

25 (ix) RASGOS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
(B) LOCALIZACIÓN: 311..1213

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 19:

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 214 567 T3

	CTCTCGATAT CGAGAGAGAA GCAGCGCCAC GGTITTTCCGG TGATTTTGAG ATTGAAACTT	60
	TGGCAGACGG ATCGCAAATG GCAACAAGCC CGTATGTCAT GGACTTTTAA CGCAAAGCTC	120
5	ACACCCACGA GCTAAAAATT CATATAGTTA AGACAACATT TTTGGCTGTA AAAGACAGCC	180
	GTAAAAACCT CTTGCTCATG TCAATTGTTC TTATCGGAAT GTGGCTTGGG CGATTGTTAT	240
	GCAAAAAGTTG TTAGGTTTTT TGCGGGGTTG TTTAACCCCC AAATGAGGGA AGAAGGTAAC	300
10	CTTGAACTCT ATG AGC ACA GGT TTA ACA GCT AAG ACC GGA GTA GAG CAC	349
	Met Ser Thr Gly Leu Thr Ala Lys Thr Gly Val Glu His	
	1 5 10	
15	TTC GGC ACC GTT GGA GTA GCA ATG GTT ACT CCA TTC ACG GAA TCC GGA	397
	Phe Gly Thr Val Gly Val Ala Met Val Thr Pro Phe Thr Glu Ser Gly	
	15 20 25	
20	GAC ATC GAT ATC GCT GCT GGC CGC GAA GTC GCG GCT TAT TTG GTT GAT	445
	Asp Ile Asp Ile Ala Ala Gly Arg Glu Val Ala Ala Tyr Leu Val Asp	
	30 35 40 45	
25	AAG GGC TTG GAT TCT TTG GTT CTC GCG GGC ACC ACT GGT GAA TCC CCA	493
	Lys Gly Leu Asp Ser Leu Val Leu Ala Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro	
	50 55 60	
30	ACG ACA ACC GCC GCT GAA AAA CTA GAA CTG CTC AAG GCC GTT CGT GAG	541
	Thr Thr Thr Ala Ala Glu Lys Leu Glu Leu Leu Lys Ala Val Arg Glu	
	65 70 75	
35	GAA GTT GGG GAT CGG GCG AAC GTC ATC GCC GGT GTC GGA ACC AAC AAC	589
	Glu Val Gly Asp Arg Ala Asn Val Ile Ala Gly Val Gly Thr Asn Asn	
	80 85 90	
40	ACG CGG ACA TCT GTG GAA CTT GCG GAA GCT GCT GCT TCT GCT GGC GCA	637
	Thr Arg Thr Ser Val Glu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ser Ala Gly Ala	
	95 100 105	
45	GAC GGC CTT TTA GTT GTA ACT CCT TAT TAC TCC AAG CCG AGC CAA GAG	685
	Asp Gly Leu Leu Val Val Thr Pro Tyr Tyr Ser Lys Pro Ser Gln Glu	
	110 115 120 125	
50	GGA TTG CTG GCG CAC TTC GGT GCA ATT GCT GCA GCA ACA GAG GTT CCA	733
	Gly Leu Leu Ala His Phe Gly Ala Ile Ala Ala Ala Thr Glu Val Pro	
	130 135 140	
55	ATT TGT CTC TAT GAC ATT CCT GGT CGG TCA GGT ATT CCA ATT GAG TCT	781
	Ile Cys Leu Tyr Asp Ile Pro Gly Arg Ser Gly Ile Pro Ile Glu Ser	
	145 150 155	
60	GAT ACC ATG AGA CGC CTG AGT GAA TTA CCT ACC ATT TTG GCG GTC AAG	829
	Asp Thr Met Arg Arg Leu Ser Glu Leu Pro Thr Ile Leu Ala Val Lys	
	160 165 170	

65

ES 2 214 567 T3

	GAC GCC AAG GGT GAC CTC GTT GCA GCC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACG	877
5	Asp Ala Lys Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr 175 180 185	
	GGA CTT GCC TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT	925
10	Gly Leu Ala Trp Tyr Ser Gly Asp Asp Pro Leu Asn Leu Val Trp Leu 190 195 200 205	
	GCT TTG GGC GGA TCA GGT TTC ATT TCC GTA ATT GGA CAT GCA GCC CCC	973
15	Ala Leu Gly Gly Ser Gly Phe Ile Ser Val Ile Gly His Ala Ala Pro 210 215 220	
	ACA GCA TTA CGT GAG TTG TAC ACA AGC TTC GAG GAA GGC GAC CTC GTC	1021
20	Thr Ala Leu Arg Glu Leu Tyr Thr Ser Phe Glu Glu Gly Asp Leu Val 225 230 235	
	CGT GCG CGG GAA ATC AAC GCC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GCC CAA	1069
25	Arg Ala Arg Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln 240 245 250	
	GGT CGC TTG GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT CTG CGT CTG CAG	1117
30	Gly Arg Leu Gly Gly Val Ser Leu Ala Lys Ala Ala Leu Arg Leu Gln 255 260 265	
	GGC ATC AAC GTA GGA GAT CCT CGA CTT CCA ATT ATG GCT CCA AAT GAG	1165
35	Gly Ile Asn Val Gly Asp Pro Arg Leu Pro Ile Met Ala Pro Asn Glu 270 275 280 285	
	CAG GAA CTT GAG GCT CTC CGA GAA GAC ATG AAA AAA GCT GGA GTT CTA	1213
40	Gln Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu 290 295 300	
	TAAATATGAA TGATTCCCGA AATCGCGGCC GGAAGGTTAC CCGCAAGGCG GCCCACCAGA	1273
	AGCTGGTCAG GAAAACCATC TGGATACCCC TGTCTTTCAG GCACCAGATG CTTCTCTAA	1333
45	CCAGAGCGCT GTAAAAGCTG AGACCGCCGG AAACGACAAT CGGGATGCTG CGCAAGGTGC	1393
	TCAAGGATCC CAACATTC	1411

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 301 aminoácidos

55 (B) TIPO: aminoácido

(D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 20:

65

ES 2 214 567 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 21

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "ADN Sintético"

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 21:

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAA

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 22

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: sencilla
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "ADN Sintético"

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 22:

CGGTTCATCG CCAAGTTTTT CTT

23

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NUM: 23

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2001 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CUALIDAD DE LA HEBRA: doble
- (D) TIPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLECULA: ADN Genómico

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*
- (B) CEPA: ATCC 13869

(ix) RASGOS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 730..1473

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 23:

ES 2 214 567 T3

(A) LONGITUD: 248 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TIPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLECULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NUM: 24:

```

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

```