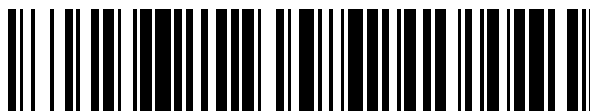


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 863**

51 Int. Cl.:

C12N 15/77 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **96916305 .4**

96 Fecha de presentación: **05.06.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0841395**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.1998**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE L-LISINA.**

30 Prioridad:
07.06.1995 JP 14061495

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.02.2012

73 Titular/es:
Ajinomoto Co., Inc.
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8315, JP

72 Inventor/es:
OTSUNA, Seiko;
SUGIMOTO, Masakazu;
IZUI, Masako;
HAYAKAWA, Atsushi;
NAKANO, Eiichi;
KOBAYASHI, Masaki;
YOSHIHARA, Yasuhiko y
NAKAMATSU, Tsuyoshi

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 373 863 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de L-lisina.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de L-lisina cultivando un microorganismo obtenido modificando una bacteria corineforme usada para producción fermentativa de aminoácidos o similares por medio de una técnica basada en ingeniería genética.

Técnica anterior

La L-lisina, que se usa como un aditivo del forraje, se produce usualmente por un procedimiento fermentativo usando una cepa mutante de producción de L-lisina que pertenece a las bacterias corineformes. Diversas bacterias que producen L-lisina conocidas en la actualidad son aquellas creadas por mutación artificial partiendo de cepas de tipo silvestre que pertenecen a las bacterias corineformes.

En cuanto a las bacterias corineformes, se ha desvelado un plásmido vector que es autónomamente replicable en células bacterianas y tiene un gen marcador de resistencia a fármacos (véase Patente de los Estados Unidos N.º 4,514,502) y un procedimiento para introducir un gen en células bacterianas (por ejemplo, Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 2-207791). Hay también revelada una posibilidad para reproducir una bacteria que produzca L-treonina- o L-isoleucina usando las técnicas según se describen anteriormente (véanse Patentes de Estados Unidos N.ºs 4.452.890 y 4.442.208). En cuanto a la cría de una bacteria que produce L-lisina, se conoce una técnica, en la que un gen que participa en la biosíntesis de L-lisina se incorpora a un plásmido de vector para amplificar el gen en las células bacterianas (por ejemplo, Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 56-160997).

Los genes conocidos para biosíntesis de L-lisina incluyen, por ejemplo, un gen de dihidrodipicolinato reductasa (Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 7-75578) y un gen de diaminopimelato deshidrogenasa (Ishino, S. y cols., Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)) en los que está clonado un gen biosíntesis de L-lisina, así como un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 60-87788), un gen de dihidrodipicolinato sintasa (Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 6-55149) y un gen de diaminopimelato descarboxilasa (Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 60-62994) en los que la amplificación de un gen afecta a la productividad de L-lisina.

En cuanto a las enzimas que participan en la biosíntesis de L-lisina, se conoce un caso de una enzima que sufre inhibición de retroalimentación cuando se usa como un tipo silvestre. En este caso, la productividad de L-lisina se mejora introduciendo un gen de enzima que tenga tal mutación que la inhibición de retroalimentación esté desensibilizada. Aquellos conocidos como un gen tal incluyen específicamente, por ejemplo, un gen de aspartocinasa (Panfleto de Publicación Internacional de WO 94/25605).

Como se describe anteriormente, ciertos resultados exitosos se han obtenido por medio de amplificación de genes por el sistema de biosíntesis de L-lisina, o por introducción de genes mutantes. Por ejemplo, una bacteria corineforme, que alberga un gen de aspartocinasa mutante con inhibición concertada desensibilizada por lisina y treonina, produce una cantidad considerable de L-lisina (aproximadamente 25 g/l). Sin embargo, esta bacteria sufre disminución de la velocidad de crecimiento comparada con una bacteria que alberga gen de aspartocinasa no mutante. Se informó también que la productividad de L-lisina se mejora introduciendo adicionalmente un gen de dihidropicolinato sintasa además de un gen de aspartocinasa mutante (Applied and Environmental Microbiology, 57 (6), 1746-1752 (1991)). Sin embargo, una bacteria tal sufre la disminución adicional en velocidad de crecimiento.

En cuanto al gen de dihidropicolinato reductasa, se ha demostrado que la actividad de dihidropicolinato reductasa está incrementada en una bacteria corineforme en la que se ha introducido el gen, sin embargo, no está incluido ningún informe para la influencia en productividad de L-lisina (Patente japonesa abierta a inspección pública N.º 7-75578).

En las circunstancias presentes, no se conoce ningún caso para la bacteria corineforme, en la que cualquiera haya tenido éxito en mejora remarcable en rendimiento de L-lisina sin restringir crecimiento combinando una pluralidad de genes para biosíntesis de L-lisina. No se ha comunicado ningún caso en el que se desee mejorar el crecimiento potenciando un gen para biosíntesis de L-lisina también.

Revelación de la invención

Un objeto de la presente invención es mejorar la capacidad de producir L-lisina y la velocidad de crecimiento de una bacteria corineforme usando materiales genéticos de secuencias de ADN que codifican cada una para aspartocinasa (de ahora en adelante referida como "AK", con la condición de que un gen que codifica para una proteína AK se refiera de ahora en adelante como "lysC", si es necesario), dihidrodipicolinato reductasa (de ahora en adelante referida como "DDPR", con la condición de que un gen que codifica para una proteína DDPR se refiera de ahora en adelante como "dapB", si es necesario), dihidrodipicolinato sintasa (de ahora en adelante abreviada

como "DDPS", con la condición de que un gen que codifica para una proteína DDPS se refiere de ahora en adelante como "dapA", si es necesario), diaminopimelato descarboxilasa (de ahora en adelante referida como "DDC", con la condición de que un gen que codifica para una proteína DDC se refiere de ahora en adelante como "lysA", si es necesario), y diaminopimelato deshidrogenasa (de ahora en adelante referida como "DDH", con la condición de que un gen que codifica para una proteína DDH se refiere de ahora en adelante como "ddh", si es necesario) que son enzimas importantes para biosíntesis de L-lisina en células de bacterias corineformes.

Cuando una sustancia objetivo se produce fermentativamente usando un microorganismo, la velocidad de producción, así como el rendimiento de la sustancia objetivo en relación a un material introducido, es un factor extremadamente importante. Una sustancia objetivo se puede producir de forma remarcablemente económica incrementando la velocidad de producción por una unidad de equipamiento de fermentación. De acuerdo con ello, es industrialmente extremadamente importante que el rendimiento fermentativo y la velocidad de producción sean compatibles el uno con la otra. La presente invención propone una solución para el problema como se describe anteriormente con el fin de producir fermentativamente L-lisina usando una bacteria corineforme.

El principio de la presente invención está basado en el hecho que el crecimiento de una bacteria corineforme puede mejorarse y la velocidad de producción de L-lisina de la misma se puede llevar a cabo realizando potenciación en tanto que combinamos dauB con lysC mutante (de ahora en adelante referido simplemente como "mutante lysC", si es necesario) que codifica AK mutante (de ahora en adelante referida simplemente como "mutante AK", si es necesario) en la que la inhibición concertada por lisina y treonina está desensibilizada, según se compara con un caso en el que lysC está potenciada individualmente y en el que la velocidad de producción de L-lisina se puede mejorar adicionalmente en una manera por etapas potenciando sucesivamente dapA, lysA y ddh.

Concretamente, la presente invención radica en un vector autónomamente replicable en células de bacterias corineformes, que comprenden una secuencia de ADN que codifica para una aspartocinasa en la que la inhibición por retroalimentación por L-lisina y L-treonina está desensibilizada y una secuencia de ADN que codifica una dihidrodipicolinato reductasa obtenida de una bacteria corineforme. La presente invención proporciona un vector que comprende adicionalmente una secuencia de ADN que codifica para una dihidropicolinato sintasa, además de cada una de las secuencias de ADN descritas anteriormente. La presente invención proporciona un vector que comprende adicionalmente una secuencia de ADN que codifica para una diaminopimelato descarboxilasa, además de las tres secuencias de ADN descritas anteriormente. La presente invención proporciona un vector adicional que comprende una secuencia de ADN que codifica para una diaminopimelato deshidrogenasa, además de las cuatro secuencias de ADN descritas anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una bacteria corineforme que comprende una secuencia de ADN potenciada que codifica para una aspartocinasa en la que la inhibición por retroalimentación por L-lisina y L-treonina está desensibilizada y que comprende una secuencia de ADN potenciada codificada por una dihidropicolinato reductasa, en la que el ADN está potenciado incrementando el número de copias de un gen, usando un promotor fuerte, o combinando estos medios.

La presente invención proporciona una bacteria corineforme que comprende adicionalmente ADN que codifica para una dihidropicolinato sintasa en la bacteria corineforme mencionada anteriormente. La presente invención proporciona una bacteria corineforme adicional que comprende adicionalmente ADN potenciado que codifica para una diaminopimelato descarboxilasa en la bacteria corineforme mencionada anteriormente, además de los tres ADN descritos anteriormente. La presente invención proporciona una bacteria corineforme adicional que comprende codificación de ADN para una diaminopimelato deshidrogenasa en la bacteria corineforme mencionada anteriormente, además de los cuatro ADN descritos anteriormente.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para producir L-lisina comprendiendo las etapas de cultivar una cualquiera de las bacterias corineformes descritas anteriormente en un medio apropiado, producir y acumular L-lisina en un cultivo de las bacterias y recoger L-lisina del cultivo.

Las bacterias corineformes referidas en la presente invención son un grupo de microorganismos según se definen en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª ed., p. 599 (1974), que son bacilos gram-positivos que no tienen resistencia a ácidos y que no tienen capacidad de formar esporas. Las bacterias corineformes incluyen bacterias que pertenecen al género Corynebacterium, bacterias que pertenecían al género Brevibacterium que han sido clasificadas hasta ahora dentro del género Brevibacterium pero que actualmente se han unido como bacterias que pertenecen al género Corynebacterium y las bacterias que pertenecen al género Brevibacterium estrechamente relacionadas con bacterias que pertenecen al género Corynebacterium.

La presente invención se explicará en detalle a continuación.

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

Los genes para biosíntesis de L-lisina usados en la presente invención se obtienen respectivamente preparando ADN cromosómico a partir de una bacteria como un donante de ADN, construyendo una biblioteca de ADN cromosómico usando un vector de plásmido o similar, seleccionando una cepa que albergue un gen deseado y

recuperando, de la cepa seleccionada, ADN recombinante en el que se ha insertado el gen. El donante de ADN para el gen para biosíntesis de L-lisina usado en la presente invención no está limitado específicamente con la condición de que el gen deseado para biosíntesis de L-lisina expresa una proteína enzimática que funciona en células de bacterias corineformes. Sin embargo, el donante de ADN es preferentemente una bacteria corineforme.

- 5 Todos los genes de lysC, dapA y dapB que se originan a partir de bacterias corineformes tienen secuencias conocidas. De acuerdo con ello, pueden obtenerse llevando a cabo amplificación de acuerdo con el procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véase White, T. J. y cols., Trends Genet., 5, 185 (1989))

Cada uno de los genes para biosíntesis de L-lisina usados en la presente invención es obtenible de acuerdo con ciertos procedimientos según se ejemplifican más adelante.

10 (1) Preparación de lysC mutante

- Un fragmento de ADN que contiene lysC mutante puede prepararse a partir de una cepa mutante en la que la inhibición de retroalimentación sinérgica en la actividad de AK por L-lisina y L-treonina está sustancialmente desensibilizada (Panfleto de Publicación Internacional de WO 94/25605). Se puede obtener una cepa mutante tal, por ejemplo, a partir de un grupo de células que se originan a partir de una cepa de tipo silvestre de una bacteria corineforme sometida a un tratamiento de mutación aplicando un tratamiento de mutación normal tal como irradiación ultravioleta y tratamiento con un agente mutante tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. La actividad AK se puede medir usando un procedimiento descrito por Miyajima, R. y cols. en The Journal of Biochemistry (1968), 63 (2), 139-148. La cepa mutante más preferida como tal está representada por una bacteria AJ3445 que produce L-lisina (FERM P-1944) derivada por un tratamiento de mutación a partir de una cepa de tipo silvestre de Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 (habiendo cambiado su nombre actual de Corynebacterium glutamicum).

- Alternativamente, el mutante lysC es también obtenible por un tratamiento de mutación in vitro de ADN de plásmido que contiene lysC de tipo silvestre. En otro aspecto, se conoce específicamente información sobre la mutación para desensibilizar inhibición de retroalimentación sinérgica sobre AK por L-lisina y L-treonina (Panfleto de Publicación Internacional de WO 94/25605). De acuerdo con ello, lysC mutante se puede preparar también a partir de lysC de tipo silvestre sobre la base de la información de acuerdo con, por ejemplo, el procedimiento de mutagénesis dirigida de sitio.

- Un fragmento que comprende lysC se puede aislar a partir de una bacteria corineforme preparando ADN cromosómico de acuerdo con, por ejemplo, un procedimiento de Saito y Miura (H. Saito y K. Miura, Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)) y amplificando lysC de acuerdo con el procedimiento de reacción de cadena de la polimerasa (PCR; véase White, T. J. y cols., Trends Genet., 5, 185 (1989)).

- Los cebadores de ADN se ejemplifican por ADN de cadena simple de 23-meros y 21-meros que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N.^{os} 1 y 2 en el Listado de secuencias con el fin de amplificar, por ejemplo, una región de aproximadamente 1.643 pb que codifica para lysC basada en una secuencia conocida para Corynebacterium glutamicum (véase Molecular Microbiology (1991), 5 (5), 1197-1204; Mol. Gen. Genet. (1990), 224, 317-324). El ADN se puede sintetizar de acuerdo con un procedimiento normal usando modelo 380B de sintetizador de ADN producido por Applied Biosystems y usando el procedimiento de fosforoamidita (véase Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859). PCR se puede llevar a cabo usando un termociclador de ADN modelo PJ2000 producido por Takara Shuzo y usando ADN polimerasa Taq de ADN de acuerdo con un procedimiento designado por el proveedor.

- Se prefiere que lysC amplificado por PCR esté ligado con vector de ADN autónomamente replicable en células de E. coli y/o bacterias corineformes para preparar ADN recombinante y el ADN recombinante se introduce en células de E. coli con antelación. Tal provisión hace fácil seguir las operaciones. El vector autónomamente replicable en células de E. coli es preferentemente un vector de plásmido que es preferentemente autónomamente replicable en células de un huésped, incluyendo, por ejemplo, pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG399, pHSG398 y RSF1010.

- 45 Cuándo un fragmento de ADN que tiene una capacidad para permitir que un plásmido sea autónomamente replicable en bacterias corineformes está insertado dentro de estos vectores, se puede usar como un así llamado vector de lanzadera autónomamente replicable tanto en E. coli como en bacterias corineformes.

Un vector de lanzadera incluye los siguientes. Se muestran entre paréntesis microorganismos que albergan cada uno de estos vectores y números de depósito en las instalaciones de depósito internacionales.

- 50 pH4C: Escherichia coli AJ12617 (FERM BP-3532)
 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)

pAJ3148: Corynebacterium glutamicum SR8203 (ATCC 39137)

pAJ440: Bacillus subtilis AJ11901 (FERM BP-140)

5 Estos vectores son obtenibles a partir de los microorganismos depositados como sigue. Las células recogidas en una fase de crecimiento logarítmico se lisaron usando lisozima y SDS, seguidas por separación de un lisado por centrifugación a 30.000 x g para obtener un sobrenadante al que se añade polietilenglicol, seguido por fraccionamiento y purificación por medio de centrifugación de gradiente de densidad de cloruro de cesio-bromuro de etidio.

10 E. coli puede transformarse introduciendo un plásmido de acuerdo con, por ejemplo, un procedimiento de D. M. Morrison (Methods in Enzymology, 68, 326 (1979)) o un procedimiento en el que las células receptoras se tratan con cloruro de calcio para incrementar permeabilidad de ADN (Mandel, M. e Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)).

15 El lysC de tipo silvestre se obtiene cuándo lysC está aislado de una cepa de tipo silvestre AK, mientras que lysC mutante se obtiene a partir de una cepa de AK mutante de acuerdo con el procedimiento como se describe anteriormente.

20 Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene lysC de tipo silvestre se muestra en SEC ID N.º: 3 en el Listado de secuencias. Una secuencia de aminoácidos de subunidad α de una proteína de AK de tipo silvestre se deduce de la secuencia de nucleótidos, que se muestra en la SEC ID N.º: 4 en Listado de secuencias conjuntamente con la secuencia de ADN. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 5. Una secuencia de aminoácidos de subunidad β de la proteína AK de tipo silvestre se deduce de la secuencia de nucleótidos de ADN, que se muestra en la SEC ID N.º: 6 en Listado de secuencias conjuntamente con la secuencia de ADN. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 7. En cada una de las subunidades, GTG se usa como un codón de iniciación y un aminoácido correspondiente está representado por metionina. Sin embargo, esta representación se refiere a metionina, valina, o formilmetionina.

25 El mutante lysC usado en la presente invención no está específicamente limitado siempre que codifique para AK en la que la inhibición de retroalimentación por L-lisina y L-treonina esté desensibilizada. Sin embargo, el lysC mutante se ejemplifica por uno que incluye mutación en la que un 279 enésimo residuo de alanina contado a partir del extremo N-terminal está cambiado por un residuo de aminoácido distinto de alanina y distinto de aminoácido ácido en la subunidad α y un residuo de alanina 30 enésimo está cambiado por un residuo de aminoácido distinto de alanina y distinto de aminoácido ácido en la subunidad β en la secuencia de aminoácidos de la AK de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de la AK de tipo silvestre incluye específicamente la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 5 en Listado de secuencias como la subunidad α y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 7 en Listado de secuencias como la subunidad β .

35 Aquellos preferidos como el residuo de aminoácido distinto de alanina y distinto de otros aminoácidos incluyen residuos de treonina, arginina, cisteína, fenilalanina, prolina, serina, tirosina y valina.

40 El codón correspondiente a un residuo de aminoácidos a sustituirse no está limitado específicamente por su tipo siempre y cuando ello codifique para el residuo de aminoácidos. Se asume que la secuencia de aminoácidos de AK de tipo silvestre poseída puede diferir ligeramente dependiendo de la diferencia en las especies bacterianas y en las cepas bacterianas. Las AK, que tienen mutación basada en, por ejemplo, sustitución, delección o inserción de uno o más residuos aminoacídicos en una o más posiciones irrelevantes para la actividad enzimática como se describe anteriormente, puede usarse también por la presente invención. Otras AK, que tienen mutación basada en, por ejemplo, sustitución, delección, o inserción de otros uno o más residuos de aminoácidos, se pueden usar también siempre y cuando no se ejerza influencia en la actividad AK y en la desensibilización de inhibición de retroalimentación sinérgica por L-lisina y L-treonina.

45 Una cepa AJ12691 obtenida introduciendo un plásmido 399AK9B de lysC mutante dentro de una cepa p399AK9B (FERM BP-734) como una cepa de tipo silvestre de Brevibacterium lactofermentum se ha depositado el 10 de abril, 1992 con un número de depósito de FERM P-12918 en 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), se ha transferido al depósito internacional en base al Tratado de Budapest el 10 de febrero, 1995 y se ha depositado con el número de depósito de FERM BP-4999.

(2) Preparación de dapB

Un fragmento de ADN que contiene dapB se puede preparar a partir de cromosoma de una bacteria corineforme por medio de PCR. El donante de ADN no está limitado específicamente, sin embargo, está ejemplificado por la cepa ATCC 13869 de Brevibacterium lactofermentum.

Una secuencia codificante de ADN para DDPR se conoce por *Brevibacterium lactofermentum* (Journal of Bacteriology, 175 (9), 2743-2749 (1993)), en la base a la que se pueden preparar cebadores de ADN para PCR. Tales cebadores de ADN están específicamente ejemplificados por ADN de 23-meros que tienen respectivamente secuencias de nucleótidos representadas en las SEC ID N.ºs: 8 y 9 en Listado de secuencias. Síntesis de ADN, PCR y preparación de un plásmido que contiene dapB obtenido se pueden llevar a cabo de la misma manera que aquellas para el lysC descritas anteriormente.

Una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene dapB y una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos se ilustran en SEC ID N.º: 10. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 11. Además de fragmentos de ADN que codifican para esta secuencia de aminoácidos, la presente invención puede usar equivalentemente fragmentos de ADN que codifican para secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 11, concretamente secuencias de aminoácidos que tienen mutación basada en, por ejemplo, sustitución, delección, o inserción de uno o más aminoácidos siempre y cuando no haya influencia sustancial sobre la actividad DDPR.

Una cepa transformante AJ13107 obtenida introduciendo un plásmido de pCRDAPB que contiene dapB obtenido en el Ejemplo descrito más tarde en la cepa JM109 de *E. coli* se ha depositado desde el 26 de mayo, 1995 con un número de depósito de FERM BP-5114 en 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) en base al Tratado de Budapest.

(3) Preparación de dapA

Un fragmento de ADN que contiene dapA puede ser prepararse a partir de cromosoma de bacteria corineforme por medio de PCR. El donante de ADN no está limitado específicamente, sin embargo, está ejemplificado por la cepa ATCC 13869 de *Brevibacterium lactofermentum*.

Una secuencia de ADN codificada por DDPS se conoce por *Corynebacterium glutamicum* (véase Nucleic Acids Research, 18 (21), 6421 (1990); Número de acceso de EMBL X53993), sobre la base de lo que se pueden preparar cebadores de ADN para PCR. Tales cebadores de ADN están específicamente ejemplificados por ADN de 23-meros que tienen respectivamente secuencias de nucleótidos representadas en las SEC ID N.ºs: 12 y 13 en Listado de secuencia. Síntesis de ADN, PCR y preparación de un plásmido que contiene dapA obtenido se pueden llevar a cabo de la misma manera que aquellos para el lysC descrito anteriormente.

Una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene dapA y una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos se ejemplifican en SEC ID N.º: 14. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 15. Además de fragmentos de ADN que codifican para esta secuencia de aminoácidos, la presente invención puede usar equivalentemente fragmentos de ADN que codifican para secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 15, concretamente secuencias de aminoácidos que tienen mutación basada en, por ejemplo, sustitución, delección, o inserción de uno o más aminoácidos siempre y cuando no haya influencia sustancial en la actividad DDPS.

Una cepa transformante de AJ13106 obtenida introduciendo un plásmido de pCRDAPA que contiene dapA obtenido en el Ejemplo descrito más tarde en la cepa JM109 de *E. coli* se ha depositado desde el 26 de mayo, 1995 con un número de depósito de FERM BP-5113 en 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) en base al Tratado de Budapest.

(4) Preparación de lysA

Un fragmento de ADN que contiene lysA se puede preparar a partir del cromosoma de una bacteria corineforme por medio de PCR. El donante de ADN no está limitado específicamente, sin embargo, está ejemplificado por la cepa ATCC 13869 de *Brevibacterium lactofermentum*.

En las bacterias corineformes, lysA forma un operón junto con argS (gen de arginil-ARNt sintasa) y lysA existe corriente abajo a partir de argS. La expresión de lysA está regulada por un promotor que existe corriente arriba de argS (véase Journal of Bacteriology, nov., 7356-7362 (1993)). Las secuencias de ADN de estos genes se conocen para *Corynebacterium glutamicum* (véanse Molecular Microbiology, 4 (11), 1819-1830 (1990); Molecular and General Genetics, 212, 112-119 (1988)), sobre la base de lo que los cebadores de ADN se pueden preparar por PCR. Tales cebadores de ADN están ejemplificados específicamente por 23-meros de ADN que tienen respectivamente secuencias de nucleótidos mostradas en la SEC ID N.º: 16 en Listado de secuencia (correspondiente a los nucleótidos números 11 a 33 en una secuencia de nucleótidos descrita en Molecular Microbiology, 4 (11), 1819-1830 (1990)) y en la SEC ID N.º: 17 (correspondiente a los números de nucleótidos 1370 a 1392 en una secuencia de nucleótidos descrita en Molecular and General Genetics, 212, 112-119 (1988)). Síntesis de ADN, PCR y preparación de un plásmido que contiene lysA obtenido se pueden llevar a cabo de la misma manera que aquellas para el lysC descritas anteriormente.

En el ejemplo descrito más tarde, un fragmento de ADN que contiene un promotor, argS y lysA se usó con el fin de potenciar lysA. Sin embargo, argS no es esencial para la presente invención. Es aceptable usar un fragmento de ADN en el que lysA esté ligado justo corriente abajo a partir de un promotor.

Una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene argS y lysA y una secuencia de aminoácidos deducida que se codifica por la secuencia de nucleótidos se ejemplifican en la SEC ID N.º: 18. Un ejemplo de una secuencia de aminoácidos codificada por argS se muestra en la SEC ID N.º: 19, y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos codificada por lysA se muestra en la SEC ID N.º: 20. Además de fragmentos de ADN que codifican para estas secuencias de aminoácidos, la presente invención puede usar equivalentemente fragmentos de ADN que codifican para secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N.º: 20, concretamente secuencias de aminoácidos que tienen mutación basada en, por ejemplo, sustitución, delección, o inserción de uno o más aminoácidos siempre y cuando no haya influencia sustancial en la actividad DDC.

(5) Preparación de ddh

Un fragmento de ADN que contiene ddh se puede preparar a partir de cromosoma de una bacteria corineforme por medio de PCR. El donante de ADN no está limitado específicamente, sin embargo, está ejemplificado por la cepa ATCC 13869 de Brevibacterium lactofermentum.

Un gen de DDH se conoce para Corynebacterium glutamicum (Ishino, S. y cols., Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)), en base a lo que se pueden preparar cebadores para PCR. Tales cebadores de ADN están específicamente ejemplificados por ADN de 20-meros que tienen respectivamente secuencias de nucleótidos representadas en las SEC ID N.ºs: 21 y 22 en el Listado de secuencias. Síntesis de ADN, PCR y preparación de un plásmido que contiene ddh obtenido se pueden llevar a cabo de la misma manera que aquellas para el lysC descritas anteriormente.

Una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que contiene ddh y una secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos están ilustradas en SEC ID N.º: 23. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en SEC ID N.º: 24. Además de fragmentos de ADN que codifican para esta secuencia de aminoácidos, la presente invención puede usar equivalentemente fragmentos de ADN que codifican para secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 24, concretamente secuencias de aminoácidos que tengan mutación basada en, por ejemplo, sustitución, delección, o inserción de uno o más aminoácidos siempre y cuando no haya influencia sustancial en la actividad DDH.

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

La bacteria corineforme de la presente invención alberga una aspartocinasa (AK mutante) en la que la inhibición de retroalimentación por L-lisina y L-treonina está desensibilizada, donde la codificación de ADN (dapB) para una dihidrodipicolinato reductasa está potenciada. En una realización preferida, la bacteria corineforme de la presente invención es una bacteria corineforme en la que ADN (dapA) que codifica para dihidrodipicolinato sintasa está potenciada adicionalmente. En una realización más preferida, la bacteria corineforme de la presente invención es una bacteria corineforme en la que ADN (lysA) que codifica para dihidrodipicolinato descarboxilasa está potenciada adicionalmente. En una realización más preferida, la bacteria corineforme de la presente invención es una bacteria corineforme en la que el ADN (ddh) que codifica para dihidrodipicolinato deshidrogenasa está potenciado adicionalmente.

El término "potencia" el ADN, se refiere en el presente documento al hecho de que la actividad intracelular de una enzima codificada por el ADN se eleva incrementando el número de copias de un gen, usando un promotor fuerte, o combinando estos medios.

La bacteria corineforme que alberga la AK mutante puede ser aquella que produce la aspartocinasa mutante como resultado de mutación, o aquellas que están transformadas introduciendo lysC mutante.

Ejemplos de la bacteria corineforme usados para introducir el ADN descrito anteriormente incluyen, por ejemplo, las siguientes cepas de tipo silvestre productoras de lisina:

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870;

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806;

Corynebacterium cellunae 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;

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066;

5 Brevibacterium immariophilum ATCC 14068;

Brevibacterium roseum ATCC 13825;

Brevibacterium thio genitalis ATCC 19240;

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354;

Corynebacterium thermoaminogenes AJ12340 (FERM BP-1539).

10 Distintas de las cepas bacterianas descritas anteriormente, aquellas usables como un anfitrión incluyen, por ejemplo, cepas mutantes que tienen una capacidad productora de L-lisina derivada de las cepas mencionadas anteriormente. Tales cepas mutantes artificiales incluyen las siguientes: cepas mutantes resistentes a S-(2-aminoetil)-cisteína (de ahora en adelante abreviada como "AEC") (Brevibacterium lactofermentum AJ11082 (NRRL B-1147), Publicaciones de Patentes japonesas N.ºs: 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 aminoácido tal como L-homoserina para su crecimiento (Publicaciones de Patente japonesa N.ºs: 48-28078 y 56-6499); cepas mutantes que presentan 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 Estados Unidos N.ºs: 3.708.395 y 3.825.472); cepas mutantes que producen L-lisina que presentan a exposición a DL- α -amino- ϵ -caprolactama, α -amino-laurilactama, análogo de aspartato, fármaco sulfa, quinoide y N-lauroilleucina; cepas mutantes que producen L-lisina que presentan resistencia a inhibidores de oxaloacetato descarboxilasa o de enzimas del sistema respiratorio (Patentes japonesas abiertas a inspección pública N.ºs: 50-53588, 50-31093, 52-102498, 53-9394, 53-86089, 55-9783, 55-9759, 56-32995 y 56-39778 y Publicaciones de Patentes japonesas N.ºs: 53-43591 y 53-1833); cepas mutantes que producen L-lisina que requieren inositol o ácido acético (Patentes japonesas abiertas a inspección pública N.ºs: 55-9784 y 56-8692); cepas mutantes que producen L-lisina que presentan sensibilidad a ácido fluoropirúvico o a temperatura no menor de 34 °C (Patentes japonesas abiertas a inspección pública N.ºs: 55-9783 y 53-86090); y que producen las cepas mutantes que pertenecen al género Brevibacterium o Corynebacterium que presentan resistencia a etilenoglicol y producen L-lisina (Patente de los Estados Unidos N.º: 4.411.997).

30 En una realización especificada, con el fin de potenciar los genes para biosíntesis de L-lisina en el huésped como se describe anteriormente, los genes se introducen en el huésped usando un vector plasmídico, un transposón o un vector fágico o similar. Sobre la introducción, se espera hacer potenciación en algún grado incluso usando un vector de tipo de copia baja. Sin embargo, se prefiere usar un vector de tipo de copias múltiples. Un vector tal incluye, por ejemplo, vectores plasmídicos, pAJ655, pAJ1844, pAJ611, pAJ3148 y pAJ440 descritos anteriormente. Además, los transposones derivados de bacteria corineformes se describen en los Panfletos de Publicaciones Internacionales de WO02/02627 y WO93/18151, Publicación de Patente Europea N.º: 445385, la Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N.º: 6-46867, Vertes, A. A. y cols., Mol. Microbiol., 11, 739-746 (1994), Bonamy, C., y col., Mol. Microbiol., 14, 571-581 (1994), Vertes, A. A. y cols., Mol. Gen. Genet., 245, 397-405 (1994), Jagar, W. y cols., FEMS Microbiology Letters, 126, 1-6 (1995), la Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N.º: 7-107976, la Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N.º: 7-327680 y similares.

40 En la presente invención, el lysC mutante en una bacteria corineforme está potenciado. Es aceptable usar aquellas que tienen mutación en lysC en ADN cromosómico, o en las que el lysC mutante está incorporado a ADN cromosómico. Alternativamente, el lysC mutante puede introducirse usando un vector plasmídico. Por otro lado, dapA, dapB, lysA y ddh están preferentemente potenciados con el fin de producir eficientemente L-lisina.

45 Cada uno de los genes de lysC, dapA, dapB, lysA y ddh puede estar sucesivamente introducido dentro del huésped usando diferentes vectores respectivamente. Alternativamente, dos, tres, cuatro, o cinco especies de los genes pueden introducirse conjuntamente usando un vector individual. Cuando se usan los diferentes vectores, los genes se pueden introducir en cualquier orden, sin embargo, se prefiere usar vectores que tengan un mecanismo de partición y de albergamiento en el huésped y que sean capaces de coexistir el uno con el otro.

50 Una bacteria corineforme que alberga el AK mutante y que comprende adicionalmente dapB potenciado se obtiene, por ejemplo, introduciendo, dentro de una bacteria corineforme huésped, un ADN recombinante que contiene lysC y dapB mutantes autónomamente replicable en células de bacterias corineformes.

Una bacteria corineforme que comprende adicionalmente dapA potenciado además de lysC y dapB mutantes, se obtiene, por ejemplo, introduciendo, dentro de una bacteria corineforme huésped, un ADN recombinante que contiene lysC, dapB y dapA mutantes autónomamente replicables en células de bacterias corineformes.

Una bacteria corineforme que comprende adicionalmente lysA potenciado además de lysC, dapB y dapA mutantes se obtiene, por ejemplo, introduciendo, dentro de una bacteria corineforme hospedadora, un ADN recombinante que contiene lysC, dapB, dapA y lysA mutantes replicables autónomamente en células de bacterias corineformes.

5 Una bacteria corineforme que comprende adicionalmente ddh potenciado además de lysC, dapB, dapA y lysA mutantes se obtiene, por ejemplo, introduciendo, dentro de una bacteria corineforme huésped, un ADN recombinante que contiene lysC, dapB, dapA, lysA y ddh mutantes replicables autónomamente en células de bacterias corineformes.

10 Los ADN recombinantes anteriormente mencionados se pueden obtener, por ejemplo, insertando cada uno de los genes que participan en biosíntesis de L-lisina dentro de un vector tal como vector plasmídico, transposón o vector fágico como se describe anteriormente.

15 En el caso en el que un plásmido se usa como un vector, el ADN recombinante puede introducirse dentro del huésped de acuerdo con un procedimiento de pulso eléctrico (Sugimoto y cols., Patente japonesa abierta a inspección pública N.º: 2-207791). Se puede llevar a cabo la amplificación de un gen usando transposones introduciendo un plásmido que lleva un transposón dentro de la célula hospedadora e induciendo transposición del transposón.

<3> Procedimiento para producir L-lisina

L-lisina puede producirse eficientemente cultivando, en un medio apropiado, la bacteria corineforme que comprende los genes potenciados para la biosíntesis de L-lisina como se describen anteriormente, produciendo y acumulando L-lisina en un cultivo de la bacteria y recogiendo L-lisina a partir del cultivo.

20 El medio a usarse está ejemplificado por un medio ordinario que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos y opcionalmente otros componentes orgánicos.

Como la fuente de carbono, es posible usar azúcares tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melaza e hidrolizado de almidón; y ácidos orgánicos como ácido fumárico, ácido cítrico y ácido succínico.

25 Como la fuente de nitrógeno, es posible usar sales de amonio inorgánico tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio y fosfato de amonio; nitrógeno orgánico tal como hidrolizado de soja; gas de amoníaco; y amoníaco acuoso.

Como fuentes de nutrientes traza orgánicos, es deseable contener sustancias requeridas tales como vitamina B y l-homoserina o extracto de levaduras o similares en cantidades apropiadas. Distintos de los anteriores, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, ión hierro, ión manganeso y así sucesivamente se añaden en cantidades pequeñas, si es necesario.

30 El cultivo se lleva preferentemente a cabo en una condición aeróbica durante aproximadamente 30 a 90 horas. La temperatura de cultivo se controla preferentemente a 25 °C a 37 °C y el pH se controla preferentemente a 5 a 8 durante el cultivo. Se pueden usar para el ajuste de pH sustancias ácidas o alcalinas, inorgánicas u orgánicas, o gas de amoníaco o similares. L-lisina puede recogerse a partir de un cultivo combinando un procedimiento de resina de intercambio iónico normal, un procedimiento de precipitación y otros procedimientos conocidos.

35 Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 ilustra un procedimiento de construcción de plásmidos p399AKYB y p399AK9B comprendiendo lysC mutante.

Fig. 2 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pDPRB comprendiendo dapB y Brevi.-o.

Fig. 3 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pDPSB comprendiendo dapA y Brevi.-ori.

40 Fig. 4 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido p299LYSA comprendiendo lysA.

Fig. 5 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pLYSAB comprendiendo lysA y Brevi.-ori.

Fig. 6 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pPK4D comprendiendo ddh y Brevi.-ori.

Fig. 7 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pCRCAB comprendiendo lysC, dapB y Brevi.-ori.

Fig. 8 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pCB que comprende lysC mutante, dapB y Brevi.-ori.

45 Fig. 9 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pAB comprendiendo dapA, dapB y Brevi.-ori.

Fig. 10 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido p399DL comprendiendo ddh y lysA.

Fig. 11 ilustra un procedimiento de construcción de un plásmido pDL comprendiendo ddh, lysA y Brevi.-ori.

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

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

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

Descripción de realizaciones preferidas

La presente invención se explicará más específicamente a continuación con referencia a Ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de gen lysC de tipo silvestre y de gen lysC mutante a partir de Brevibacterium lactofermentum

<1> Preparación de lysC de tipo silvestre y de lysC mutantes y preparaciones de plásmidos que los contienen

- 15 Una cepa de Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 y una cepa mutante AJ3445 que produce L-lisina (FERM P-1944) obtenida de la cepa ATCC 13869 por un tratamiento de mutación se usaron como donantes de ADN cromosómico. La cepa AJ3445 se hubo sometido a mutación de tal forma que lysC se cambió implicando desensibilización sustancial de inhibición concertada por lisina y treonina (Journal of Biochemistry, 68, 701-710 (1970)).

- 20 Un fragmento de ADN que contiene lysC se amplificó a partir de ADN cromosómico de acuerdo con el procedimiento de PCR (reacción de cadena de la polimerasa; véase White, T. J. y cols., Trends Genet., 5, 185 (1989)). En cuanto a cebadores de ADN usados para amplificación, ADN de hebra simple de 23-meros y 21-meros que tienen secuencias mostradas en SEC ID N.ºs: 1 y 2 se sintetizaron con el fin de amplificar una región de aproximadamente 1.643 pares de bases que codifican para lysC en base a una secuencia conocida de Corynebacterium glutamicum (véanse Molecular Microbiology (1991), 5 (5), 1197-1204; (1991), 5(5), 1197-1204; y Mol. Gen. Genet. (1990), 224, 317-324). El ADN se sintetizó de acuerdo con un procedimiento normal usando modelo 380B de sintetizador de ADN producido por Applied Biosystems y usando el procedimiento de fosforoamidita (véase Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859).

- 30 El gen estuvo amplificado por PCR usando termociclador de ADN Modelo PJ2000 producido por Takara Shuzo y usando ADN polimerasa Taq de acuerdo con un procedimiento designado por el proveedor. Un fragmento de gen amplificado de 1.643 kb se confirmó por electroforesis de gel de agarosa. Después de eso, el fragmento escindido del gen se purificó de acuerdo con un procedimiento ordinario y se digirió con enzimas de restricción NruI (producidas por Takara Shuzo) y EcoRI (producidas por Takara Shuzo).

- 35 Se usó pHSG399 (véase Takeshita, S. y cols., Gen (1987), 61, 63-74) como un vector de clonación para el fragmento génico. pHSG399 se digirió con enzimas de restricción SmaI (producidas por Takara Shuzo) y EcoRI y se ligó con el fragmento de lysC amplificado. ADN se ligó usando kit de ligazón de ADN (producido por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Así se prepararon plásmidos, en los que los fragmentos de lysC amplificados a partir de cromosomas de Brevibacterium lactofermentum se ligaron con pHSG399 respectivamente. Un plásmido que comprende lysC de ATCC 13869 (cepa de tipo silvestre) se designó como p399AKY y un plásmido que comprende lysC de AJ3463 (bacteria que produce L-lisina) se designó como p399AK9.

- 40 Un fragmento de ADN (de ahora en adelante referido como "Brevi.- ori") que tiene una capacidad de hacer un plásmido autónomamente replicable en bacterias que pertenecen al género Corynebacterium se introdujo en p399AKY y p399AK9 respectivamente preparando los plásmidos que llevan lysC autónomamente replicables en bacterias que pertenecen al género Corynebacterium. Brevi.-ori se preparó a partir de un vector plasmídico pHK4 conteniendo Brevi.-ori y autónomamente replicable en células tanto de Escherichia coli como en bacterias que pertenecen al género Corynebacterium. pHK4 se construyó digiriendo pHK4 con KpnI (producido por Takara Shuzo) y BamHI (producido por Takara Shuzo), extrayendo un fragmento Brevi.-ori y ligándolo con pHSG298 habiéndose digerido también con KpnI y BamHI (véase la Patente japonesa abierta a inspección pública N.º: 5-7491). pHK4 da resistencia a kanamicina a un anfitrión. Escherichia coli que alberga pHK4 se diseñó como Escherichia coli AJ13136 y se depositó el 1 de agosto, 1995 con un número de depósito de 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).

- 50 pHK4 se digirió con enzimas de restricción KpnI y BamHI y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. La formación de extremos romos se llevó a cabo usando kit de formación de extremos romos de ADN (producidos por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce BamHI (producido por Takara Shuzo) haciendo modificación de tal modo que el fragmento de ADN que corresponde a la parte de Brevi.-ori se pudo escindir a partir de pHK4 por digestión con sólo BamHI. Este plásmido se digirió con BamHI y el fragmento de ADN Brevi.-ori generado se ligó con p399AKY y p399AK9 habiéndose

digerido también con BamHI respectivamente preparando plásmidos conteniendo cada uno el gen lysC replicable autónomamente en bacterias que pertenecen al género Corynebacterium.

Un plásmido que contiene el gen lysC de tipo silvestre que se origina a partir de p399AKY se designó como p399AKYB y un plásmido que contiene el gen lysC mutante que se origina a partir de p399AK9 se designó como p399AK9B. El procedimiento de construcción de p399AK9B y p399AKYB se muestra en la Fig. 1. Una cepa AJ12691 obtenida introduciendo el plásmido p399AK9B de lysC mutante dentro de una cepa de tipo silvestre de Brevibacterium lactofermentum (cepa AJ12036, FERM BP-734) se depositó el 10 de abril, 1992 con un número de depósito de FERM P-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), transferida al depósito internacional en base al Tratado de Budapest el 10 de febrero, 1995 y depositada con un número de depósito de FERM BP-4999.

<2> Determinación de secuencias nucleotídicas de lysC de tipo silvestre y de lysC mutante de Brevibacterium lactofermentum

El plásmido p399AKY que contiene el lysC de tipo silvestre y el plásmido p399AK9 que contiene el lysC mutante se prepararon a partir de los transformantes respectivos determinando secuencias de nucleótidos de los lysC de tipo silvestre y mutantes. La determinación de secuencia de nucleótidos se llevó a cabo de acuerdo con un procedimiento de Sanger y cols. (por ejemplo, F. Sanger y cols., Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463 (1977)).

La secuencia de nucleótidos de lysC de tipo silvestre codificada por p399AKY se muestra en la SEC ID N.º: 3 en el Listado de secuencias. Por otro lado, la secuencia de nucleótido de mutante lysC codificada por p399AK9 tuvo sólo mutación de un nucleótido de tal forma que la G 1051º se cambió a A en SEC ID N.º: 3 comparada con la lysC de tipo silvestre. Se sabe que lysC de Corynebacterium glutamicum tiene dos subunidades (α , β) codificadas en una fase de lectura idéntica en una hebra de ADN idéntica (véase Kalinowski, J. y col., Molecular Microbiology (1991) 5 (5), 1197-1204). Juzgando a partir de homología, se asume que el gen secuenciado en el presente documento tiene dos subunidades (α , β) codificadas en una fase de lectura en una hebra de ADN idéntica.

Una secuencia de aminoácidos de la subunidad α de la AK de tipo silvestre deducida de la secuencia de nucleótidos de ADN se muestra en la SEC ID N.º: 4 junto con la secuencia de ADN. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 5. Una secuencia de aminoácidos de la subunidad β de la AK de tipo silvestre deducida de la secuencia de nucleótidos de ADN se muestra en la SEC ID N.º: 6 conjuntamente con ADN. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 7. En cada una de las subunidades, GTG se usa como un codón de iniciación y un aminoácido correspondiente está representado por metionina. Sin embargo, esta representación se refiere a metionina, valina, o formilmetionina.

Por otro lado, mutación en la secuencia de lysC mutante significa aparición de sustitución de residuo aminoacídico de tal forma que un residuo de alanina 279º de la subunidad α está cambiado a un residuo de treonina, y un residuo de alanina 30º de la subunidad β está cambiado a un residuo de treonina en la secuencia de aminoácidos de la proteína AK de tipo silvestre (SEC ID N.ºs: 5, 7).

Ejemplo 2: preparación de dapB de Brevibacterium lactofermentum

<1> Preparación de dapB y construcción de plásmido que contiene dapB

Una cepa de tipo silvestre de Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 se usó como un donante de ADN cromosómico. El ADN cromosómico se preparó a partir de la cepa ATCC 13869 de acuerdo con un procedimiento normal. Un fragmento de ADN que contiene dapB se amplificó a partir del ADN cromosómico de acuerdo con PCR. En cuanto a cebadores de ADN usados para amplificación, los ADN de 23-meros que tienen secuencias de nucleótidos representadas en las SEC ID N.ºs: 8 y 9 en el Listado se sintetizaron respectivamente con el fin de amplificar una región de aproximadamente 2,0 kb que codifica para DDPR en base a una secuencia conocida para Brevibacterium lactofermentum (véase Journal of Bacteriology, 157 (9), 2743-2749 (1993)). La síntesis de ADN y PCR se llevó a cabo de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1. Se usó como un vector de clonación pCR-Script (producido por Invitrogen) para el fragmento de gen amplificado de 2.001 pb, que se ligó con el fragmento de dapB amplificado. Así se construyó un plásmido, en el que el fragmento de dapB de 2.001 pb amplificado a partir de cromosoma de Brevibacterium lactofermentum se ligó con pCR-Script. El plásmido obtenido como se describe anteriormente, que tiene dapB que se origina a partir de ATCC 13869, se designó como pCRDAPB. Una cepa AJ13107 transformante obtenida introduciendo pCRDAPB dentro de la cepa JM109 de E. coli se ha depositado internacionalmente desde el 26 de mayo, 1995 con un número de depósito de 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) en base al Tratado de Budapest.

Se extrajo un fragmento de 1.101 pb conteniendo un gen estructural de DDPR digiriendo pCRDAPB con EcoRV y SphI. Este fragmento se ligó con pHS399 que se ha digerido con HincII y SphI.

El plásmido preparado se designó como p399DPR.

Se introdujo Brevi.-ori dentro del p399DPR preparado construyendo un plásmido que lleva dapB autónomamente replicable en bacterias corineformes. Se digirió pHK4 con una enzima de restricción KpnI (producida por Takara Shuzo) y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. La formación de extremos romos se llevó a cabo usando kit de formación de extremos romos de ADN (producidos por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce BamHI fosforilado (producido por Takara Shuzo) haciendo modificación de tal modo que el fragmento de ADN que corresponde a la parte de Brevi.-ori se pudo escindir a partir de pHK4 por digestión con sólo BamHI. Este plásmido se digirió con BamHI y el fragmento de ADN de Brevi.-ori se ligó con p399DPR habiéndose digerido también con BamHI preparando un plásmido que contiene dapB autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido preparado se designó como pDPRB. El procedimiento de construcción de pDPRB se muestra en la Figura 2.

<2> Determinación de secuencia de nucleótidos de dapB de *Brevibacterium lactofermentum*

Se preparó el ADN del plásmido a partir de la cepa AJ13107 albergando p399DPR y su secuencia de nucleótidos se determinó de la misma manera que como se describe en el Ejemplo 1. Una secuencia de nucleótidos determinada y una secuencia aminoacídica deducida de la secuencia de nucleótidos se muestran en la SEC ID N.º: 10. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 11.

Ejemplo 3: preparación de dapA de *Brevibacterium lactofermentum*

<1> Preparación de dapA y construcción del plásmido que contiene dapA

Una cepa de tipo silvestre de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 se usó como un donante de ADN cromosómico. El ADN cromosómico se preparó a partir de la cepa ATCC 13869 de acuerdo con un procedimiento normal. Un fragmento de ADN que contiene dapA se amplificó a partir del ADN cromosómico de acuerdo con PCR. En cuanto a cebadores de ADN usados para amplificación, los ADN de 20-meros que tienen secuencias de nucleótidos mostradas en las SEC ID N.ºs: 12 y 13 en el Listado de secuencias se sintetizaron respectivamente con el fin de amplificar una región de aproximadamente 1,5 kb que codifica para DDPS en base a una secuencia conocida para *Corynebacterium glutamicum* (véanse Nucleic Acids Research, 18 (21), 6421 (1990); EMBL Núm. de acceso X53993). La síntesis de ADN y la PCR se llevaron a cabo de la misma manera como se describe en el Ejemplo 1. pCR1000 (producido por Invitrogen, véase Bio/Technology, 9, 657-663 (1991)) se usó como un vector de clonación para el fragmento génico amplificado de 1.411 pb, que se ligó con el fragmento de dapA amplificado. La ligazón de ADN se llevó a cabo usando kit de ligazón de ADN (producido por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Así se construyó un plásmido, en el que el fragmento de dapA de 1.411 pb amplificado a partir de cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* se ligó con pCR1000. El plásmido obtenido como se describe anteriormente, que tiene dapA que se origina a partir de ATCC 13869, se designó como pCRDAPA.

Una cepa transformante AJ13106 obtenida introduciendo pCRDAPA en cepa JM109 de *E. coli* se ha depositado internacionalmente desde el 26 de mayo, 1995 con un número de depósito de 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) en base al Tratado de Budapest.

Brevi.-ori se introdujo dentro del pCRDAPA preparado construyendo un plásmido que lleva dapA autónomamente replicable en bacterias corineformes. pHK4 se digirió con enzimas de restricción KpnI y BamHI (producidas por Takara Shuzo) y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. La formación de extremos romos se llevó a cabo usando kit de formación de extremos romos de ADN (producido por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce de SmaI fosforilada (producido por Takara Shuzo) haciendo modificación de modo que el fragmento de ADN que corresponde a la parte Brevi.-ori pueda escindirse de pHK4 por digestión con sólo SmaI. Este plásmido se digirió sólo con SmaI y el fragmento de ADN de Brevi.-ori generado se ligó con pCRDAPA que se ha digerido también con SmaI preparando un plásmido que contiene dapA replicable autónomamente en bacterias corineformes. Este plásmido se designó como pDPSB. El procedimiento de construcción de pDPSB(Km^r) se muestra en la Fig. 3.

<2> Determinación de secuencia de nucleótidos de dapA de *Brevibacterium lactofermentum*

Se preparó el ADN del plásmido a partir de la cepa AJ13106 albergando pCRDAPA y su secuencia de nucleótidos se determinó de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1. Una secuencia de nucleótidos determinada y una secuencia aminoacídica deducida de la secuencia de nucleótidos se muestran en la SEC ID N.º: 14. Sólo la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEC ID N.º: 15.

Ejemplo 4: preparación de lysA de *Brevibacterium lactofermentum*

<1> Preparación de lysA y construcción del plásmido que contiene lysA

Una cepa de tipo silvestre de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 se usó como un donante de ADN cromosómico. El ADN cromosómico se preparó a partir de la cepa ATCC 13869 de acuerdo con un procedimiento normal. Un fragmento de ADN que contiene argS, lysA y un promotor de un operón que los contiene se amplificó a

partir del ADN cromosómico de acuerdo con PCR. En cuanto a cebadores de ADN usados para amplificación, los ADN de 23-meros que tienen secuencias de nucleótidos representadas en las SEC ID N.ºs: 16 y 17 en el Listado de secuencias respectivamente se usaron con el fin de amplificar una región de aproximadamente 3,6 kb que codifican para arginil-ARNt sintasa y DDC en base a una secuencia conocida para Corynebacterium glutamicum (véanse Molecular Microbiology, 4 (11), 1819-1830 (1990); Molecular and General Genetics, 212, 112-119 (1988)). Síntesis de ADN y PCR se llevaron a cabo en la misma manera que se describe en el Ejemplo 1. pHSG399 se usó como un vector de clonación para el fragmento de gen amplificado de 3.579 pb. pHSG399 se digirió con una enzima de restricción SmaI (producida por Takara Shuzo), que se ligó con el fragmento de ADN que contiene lysA amplificado. Un plásmido obtenido como se describe anteriormente, que tuvo lysA que se originó a partir de ATCC 13869, se designó como p399LYSA.

Un fragmento de ADN que contiene lysA se extrajo digiriendo p399LYSA con KpnI (producido por Takara Shuzo) y BamHI (producido por Takara Shuzo). Este fragmento de ADN se ligó con pHSG299 habiéndose digerido con KpnI y BamHI. Un plásmido obtenido se designó como p299LYSA. El procedimiento de construcción de p299LYSA se muestra en la Fig. 4.

Brevi.-ori se introdujo dentro del p299LYSA obtenido construyendo un plásmido que lleva lysA autónomamente replicable en bacterias corineformes. pHK4 se digirió con enzimas de restricción KpnI y BamHI y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. La formación de extremos romos se llevó a cabo usando kit de formación de extremos romos de ADN (producido por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce de KpnI fosforilado (producido por Takara Shuzo) haciendo modificación de tal forma que el fragmento de ADN correspondiente a la parte de Brevi.-ori se pudo escindir a partir de pHK4 por digestión con sólo KpnI. Este plásmido se digirió con KpnI y el fragmento de ADN de Brevi.-ori generado se ligó con p299LYSA que se había digerido también con KpnI preparando un plásmido que contiene lysA autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido preparado se designó como pLYSAB. El procedimiento de construcción de pLYSAB se muestra en la Fig. 5.

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

Se preparó ADN de plásmido p299LYSA y su secuencia de nucleótidos se determinó de la misma manera que como se describe en el Ejemplo 1. Una secuencia de nucleótidos determinada y una secuencia de aminoácidos deducida que se codifica por la secuencia de nucleótidos se muestran en la SEC ID N.º: 18. Con respecto a la secuencia de nucleótidos, una secuencia de aminoácidos codificada por argS y una secuencia de aminoácidos codificada por lysA se muestran en SEC ID N.ºs: 19 y 20 respectivamente.

Ejemplo 5: preparación de ddh de Brevibacterium lactofermentum

Se obtuvo un gen ddh amplificando el gen ddh a partir de ADN cromosómico de Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 de acuerdo con el procedimiento de PCR usando dos cebadores oligonucleotídicos (SEC ID N.ºs: 21, 22) preparados en base a una secuencia de nucleótidos conocida de gen ddh de Corynebacterium glutamicum (Ishino, S. y col., Nucleic Acids Res., 15, 3917 (1987)). Un fragmento de ADN amplificado obtenido se digirió con EcoT22I y AvaI y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. Después de eso, el fragmento se insertó en un sitio SmaI de pMW119 obteniendo un plásmido pDDH.

Después, pDDH se digirió con Sall y EcoRI, seguido por formación de extremos romos. Después de eso, se ligó un fragmento obtenido con pUC18 que se ha digerido con SmaI. Un plásmido así obtenido se designó como pUC18DDH.

Brevi.-ori se introdujo dentro de pUC18DDH construyendo un plásmido que lleva ddh autónomamente replicable en bacterias corineformes. pHK4 se digirió con enzimas de restricción KpnI y BamHI y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. La formación de extremos romos se llevó a cabo usando kit de formación de extremos romos de ADN (producido por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce de PstI fosforilado (producido por Takara Shuzo) de tal forma que se insertó dentro de un sitio de PstI de pHSG299. Un plásmido construido como se describe anteriormente se designó como pPK4. A continuación, se digirió pUC18DDH con XbaI y KpnI y un fragmento generado se ligó con pPK4 habiéndose digerido con KpnI y XbaI. Así se construyó un plásmido que contiene ddh autónomamente replicable en bacterias corineformes. Este plásmido se designó como pPK4D. El procedimiento de construcción de pPK4D se muestra en la Fig. 6.

Ejemplo 6: construcción del plásmido que comprende combinación de lysC mutante y dapA

Un plásmido que comprende lysC mutante, dapA y origen de replicación de bacterias corineformes se construyó a partir del plásmido pCRDAPA comprendiendo dapA y el plásmido p399AK9B que comprende lysC mutante y Brevi.-ori. p399AK9B se degradó completamente con Sall y después se sometió a procedimiento de formación de extremos romos, con lo que el engarce EcoRI se ligó construyendo un plásmido en el que el sitio de Sall se modificó en un sitio EcoRI. El plásmido obtenido se designó como p399AK9BSE. El lysC mutante y Brevi.-ori se escindieron como un fragmento degradando parcialmente p399AK9BSE con EcoRI. Este fragmento se ligó con pCRDAPA

habiéndose digerido con EcoRI. Un plásmido obtenido se designó como pCRCAB. Este plásmido es autónomamente replicable en *E. coli* y en bacterias corineformes y da resistencia a kanamicina a un huésped, comprendiendo el plásmido una combinación de lysC y dapA mutante. El procedimiento de construcción de pCRCAB se muestra en la Figura 7.

5 Ejemplo 7: construcción del plásmido que comprende combinación de lysC mutante y dapB

Un plásmido que comprende lysC mutante y dapB se construyó a partir del plásmido p399AK9 que tiene lysC y el plásmido p399DPR que tiene dapB. Un fragmento de 1.101 pb que contiene un gen estructural de DDPR se extrajo digiriendo p399DPR con EcoRV y SphI. Este fragmento se ligó con p399AK9 habiéndose digerido con Sall y después habiéndose sometido a la técnica de los extremos romos y habiéndose digerido con SphI construyendo un

plásmido comprendiendo una combinación de lysC mutante y dapB. Este plásmido se designó como p399AKDDPR. Luego, Brevi.-ori se introdujo dentro del p399AKDDPR obtenido. El plásmido de pHK4 conteniendo Brevi.-ori se digirió con una enzima de restricción KpnI (producida por Takara Shuzo) y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. La formación de extremos romos se llevó a cabo usando kit de formación de extremos romos de ADN (producido por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce BamHI (producido por Takara Shuzo) haciéndose modificación de tal modo que el fragmento de ADN que corresponde a la parte de Brevi.-ori se pudo escindir a partir de pHK4 por digestión con sólo BamHI. Este plásmido se digirió con BamHI y el fragmento de ADN de Brevi.-ori se ligó con p399AKDDPR habiéndose digerido también con BamHI construyendo un plásmido que contiene lysC mutante y dapB autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido se diseñó como pCB. El proceso de construcción de pCB se muestra en la Figura 8.

Ejemplo 8: construcción del plásmido que comprende combinación de dapA y dapB

El plásmido pCRDAPA que comprende dapA se digirió con KpnI y EcoRI extrayéndose un fragmento de ADN que contiene dapA que se ligó con el plásmido vector pHSG399 habiéndose digerido con KpnI y EcoRI. Un plásmido obtenido se designó como p399DPS.

Por otro lado, el plásmido pCRDAPB que comprende dapB se digirió con SacII y EcoRI extrayéndose un fragmento de ADN de 2,0 kb que contiene una región codificante para DDPR que se ligó con p399DPS habiéndose digerido con SacII y EcoRI construyendo un plásmido que comprende una combinación de dapA y dapB. El plásmido obtenido se designó como p399AB.

A continuación, se introdujo Brevi.-ori en p399AB. Se digirió pHK4 conteniendo Brevi.-ori con una enzima de restricción BamHI (producida por Takara Shuzo) y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. La formación de extremos romos se llevó a cabo usando kit de formación de extremos romos de ADN (producido por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce de KpnI fosforilado (producido por Takara Shuzo) llevando a cabo modificación de tal forma que el fragmento de ADN correspondiente a la parte de Brevi.-ori se pudo escindir a partir de pHK4 por digestión con sólo KpnI. Este plásmido se digirió con KpnI y el fragmento de ADN de Brevi.-ori generado se ligó con p399AB que se había digerido también con KpnI construyéndose un plásmido que contiene dapA y dapB autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido se designó como pAB. El proceso de construcción de pAB se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 9: construcción del plásmido que comprende combinación de ddh y lysA

El plásmido pUC18DDH que comprende ddh se digirió con EcoRI y XbaI extrayéndose un fragmento de ADN que contiene ddh. Este fragmento ddh se ligó con el plásmido p399LYSA que comprende lysA que se ha digerido con BamHI y XbaI con los bordes escindidos que se han hecho extremos romos después de la digestión. Un plásmido obtenido se diseñó como p399DL. El proceso de construcción de p399DL se muestra en la Figura 10.

A continuación, Brevi.-ori se introdujo dentro de p399DL. pHK4 se digirió con XbaI y BamHI y los extremos escindidos se hicieron romos. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce de XbaI fosforilado llevando a cabo modificación de tal forma que el fragmento de ADN correspondiente a la parte de Brevi.-ori se pudo escindir a partir de pHK4 por digestión con sólo XbaI. Este plásmido se digirió con XbaI y el fragmento de ADN de Brevi.-ori generado se ligó con p399DL que se había digerido también con XbaI construyendo un plásmido que contiene ddh y lysA autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido se designó como pDL. El procedimiento de construcción de pDL se muestra en la Fig. 11.

Ejemplo 10: construcción del plásmido que comprende combinación de lysC mutante, dapA y dapB

p399DPS se degradó con EcoRI y SphI formando extremos romos seguido por extracción de un fragmento de gen dapA.

Este fragmento se ligó con el p399AK9 que se había digerido con Sall y se sometió a un procedimiento de formación de extremos romos construyendo un plásmido p399CA en el que el lysC y dapA coexistieron.

El plásmido pCRDAPB que comprende dapB se digirió con EcoRI y se sometió a un procedimiento de formación de extremos romos, seguido por digestión con SacI extrayendo un fragmento de ADN de 2,0 kb que comprende dapB. El plásmido p399CA que comprende dapA y lysC mutante se digirió con SpeI y se sometió a formación de extremos romos, que se digirieron más adelante con SacI y se ligaron con el fragmento de dapB extraído obteniéndose un plásmido que comprende lysC mutante, dapA y dapB. Este plásmido se designó como p399CAB.

A continuación, Brevi.-ori se introdujo dentro de p399CAB. El plásmido de pHK4 conteniendo Brevi.-ori se digirió con una enzima de restricción BamHI (producido por Takara Shuzo) y los bordes escindidos se hicieron extremos romos. La formación de extremos romos se llevó a cabo usando kit de formación de extremos romos de ADN (producidos por Takara Shuzo) de acuerdo con un procedimiento designado. Después de la formación de extremos romos, se ligó un engarce de KpnI fosforilado (producido por Takara Shuzo) llevando a cabo modificación de tal forma que el fragmento de ADN correspondiente a la parte de Brevi.-ori se pudo escindir a partir de pHK4 por digestión con sólo KpnI. Este plásmido se digirió con KpnI y el fragmento de ADN de Brevi.-ori generado se ligó con p399CAB que se había digerido también con KpnI construyéndose un plásmido que contiene lysC mutante, dapA y dapB autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido se designó como pCAB. El procedimiento de construcción de pCAB se muestra en la Fig. 12.

Ejemplo 11: construcción del plásmido que comprende combinación de lysC mutante, dapA, dapB y lysA

El plásmido p299LYSA que comprende lysA se digirió con KpnI y BamHI y se sometió a procedimiento de formación de extremos romos y después se extrajo un fragmento de gen de lysA. Este fragmento se ligó con pCAB habiéndose digerido con HpaI (producido por Takara Shuzo) y se sometió a formación de extremos romos construyéndose un plásmido que comprende una combinación de lysC mutante, dapA, dapB y lysA autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido se diseñó como pCABL. El procedimiento de construcción de pCABL se muestra en la Figura 13. Se indica que el fragmento génico de lysA está insertado a un sitio HpaI en un fragmento de ADN que contiene el gen dapB en pCABL, sin embargo, el sitio de HpaI está localizado corriente arriba a partir de un promotor para el gen dapB (números de nucleótidos 611 a 616 en SEC ID N.º: 10), y el gen dapB no está desacoplado.

Ejemplo 12: construcción del plásmido que comprende combinación de lysc mutante, dapa, dapb, ddh y lysA

pHSG299 se digirió con XbaI y KpnI, que se ligaron con p399DL comprendiendo ddh y lysA habiéndose digerido con XbaI y KpnI. Un plásmido construido se designó como p299DL. p299DL se digirió con XbaI y KpnI y se sometió a formación de extremos romos. Después de la formación de extremos romos, se extrajo un fragmento de ADN que comprende ddh y lysA. Este fragmento de ADN se ligó con el plásmido pCAB comprendiendo la combinación de lysC mutante, dapA y dapB habiéndose digerido con HpaI y sometido a formación de extremos romos construyendo un plásmido que comprende una combinación de lysC mutante, dapA, dapB, lysA y ddh autónomamente replicable en bacterias corineformes. El plásmido construido se designó como pCABDL. El procedimiento de construcción de pCABDL se muestra en la Fig. 14.

Ejemplo 13: introducción de los plásmidos que comprenden genes para biosíntesis de L-lisina en bacteria que produce L-lisina de *Brevibacterium lactofermentum*

Los plásmidos que comprenden los genes para biosíntesis de L-lisina construidos como se describe anteriormente, concretamente p399AK9B (Cm^r), pDPSB (Km^r), pDPRB (Cm^r), pLYSAB (Cm^r), pPK4D (Cm^r), pCRCAB (Km^r), pAB (Cm^r), pCB (Cm^r), pDL (Cm^r), pCAB (Cm^r), pCABL (Cm^r) y pCABDL (Cm^r) se introdujeron dentro de bacteria que produce L-lisina AJ11082 (NRRL B-11470) de *Brevibacterium lactofermentum* respectivamente. La cepa AJ11082 tiene una propiedad de resistencia a AEC. Los plásmidos se introdujeron de acuerdo con un procedimiento de pulso eléctrico (Sugimoto y col., Patente japonesa abierta a inspección pública N.º: 2-207791). Los transformantes se seleccionaron en base a marcadores de resistencia a fármaco poseídos por los respectivos plásmidos. Los transformantes se seleccionaron en un medio completo que contiene 5 µg/ml de cloranfenicol cuando se introdujo un plásmido que comprende un gen de resistencia a cloranfenicol, o los transformantes se seleccionaron en un medio completo que contiene 25 µg/ml de kanamicina cuando se introdujo un plásmido que comprende un gen de resistencia a kanamicina.

Ejemplo 14: producción de L-lisina

Cada uno de los transformantes obtenido en el Ejemplo 13 se cultivó en un medio de producción de L-lisina evaluándose su productividad de L-lisina. El medio de producción de L-lisina tenía la siguiente composición.

[Medio de producción de L-lisina]

Los siguientes componentes distintos de carbonato de calcio (por 1 l) se disolvieron haciendo ajuste a pH 8,0 con KOH. El medio se esterilizó a 115 °C durante 15 minutos, para lo que se añadió a partir de entonces carbonato de calcio (50 g) habiéndose esterilizado por separado en aire caliente en un estado seco.

	Glucosa	100 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	55 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	1 g
5	Biotina	500 µg
	Tiamina	2000 µg
	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	0,01 g
	MnSO ₄ • 7H ₂ O	0,01 g
	Nicotinamida	5 mg
10	Hidrolizado de proteínas (Mamenou)	30 ml
	Carbonato de calcio	50 g

15 Cada uno de los diversos tipos de los transformantes y la cepa parental se inoculó al medio que tiene la composición descrita anteriormente llevándose a cabo el cultivo a 31,5 °C con agitación recíproca. La cantidad de L-lisina producida después de 40 ó 72 horas de cultivo y el crecimiento después de 72 horas (D.O.₅₆₂) se muestran en la Tabla 1. En la tabla, lysC* representa lysC mutante. El crecimiento se determinó cuantitativamente midiendo D.O. a 560 nm después de dilución de 101 veces.

Tabla 1

Acumulación de L-lisina después de cultivo durante 40 ó 72 horas				
Cepa bacteriana/plásmido	Gen introducido	Cantidad de L-lisina producida (g/l)		Crecimiento (D.O. ₅₆₂ /101)
		después de 40 horas	después de 72 horas	
AJ11082		22,0	29,8	0,450
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
AJ11082/pLYSAB	<u>lysA</u>	19,8	32,5	0,356
AJ11082/pPK4D	<u>ddh</u>	19,0	33,4	0,330
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
AJ11082/pCB	<u>lysC*</u> , <u>dapB</u>	23,3	35,0	0,440
AJ11082/pDL	<u>ddh</u> , <u>lysA</u>	23,3	31,6	0,440
AJ11082/pCAB	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u> , <u>dapB</u>	23,0	45,0	0,425
AJ110821pCABL	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u> , <u>dapB</u> , <u>lysA</u>	26,2	46,5	0,379
AJ11082/pCABDL	<u>lysC*</u> , <u>dapA</u> , <u>dapB</u> , <u>lysA</u> , <u>ddh</u>	26,5	47,0	0,409

Como se muestra en la Tabla 1, cuando lysC mutante, dapA, o dapB se potenció individualmente, la cantidad de L-lisina producida era más grande que o equivalente a aquella producida por la cepa parental después de 72 horas de cultivo, sin embargo, la cantidad de L-lisina producida era más pequeña que aquella producida por la cepa parental después de 40 horas de cultivo. Concretamente, la velocidad de producción de L-lisina se disminuyó en el cultivo durante un periodo corto. De manera similar, cuando lysC mutante y dapA, o dapA y dapB se potenciaron en combinación, la cantidad de L-lisina producida era más grande que aquella producida por la cepa parental después de 72 horas de cultivo, aun así, la cantidad de L-lisina producida era más pequeña que aquella producida por la cepa parental después de 40 horas de cultivo. Así la velocidad de producción de L-lisina se disminuyó.

Por otro lado, cuándo lysA o ddh se potenciaron individualmente, o cuando lysA y ddh se potenciaron en combinación, la cantidad de L-lisina producida era más grande que aquella producida por la cepa parental después de 40 horas de cultivo, sin embargo, la cantidad de L-lisina producida era consiguientemente más pequeña que aquella producida por la cepa parental después del periodo largo de cultivo debido a disminución en crecimiento.

Por el contrario, en el caso de la cepa en la que dapB se potenció conjuntamente con lysC mutante, el crecimiento se mejoró, la velocidad de producción de L-lisina se restableció exitosamente en el periodo corto de cultivo y la cantidad de L-lisina acumulada se mejoró también en el periodo de cultivo largo. En el caso de la cepa en la que tres de lysC mutante, dapA y dapB se potenciaron simultáneamente, la productividad de L-lisina se mejoró adicionalmente. Tanto la velocidad de producción de L-lisina como la cantidad de L-lisina acumulada se mejoraron en una manera etapa a etapa potenciando sucesivamente lysA y ddh.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, se puede mejorar la capacidad de producción de L-lisina de bacterias corineformes y también puede mejorarse la velocidad de crecimiento.

La velocidad de producción de L-lisina se puede mejorar y la productividad se puede mejorar también en bacterias de producción de L-lisina potenciando dapB junto con lysC mutante. La velocidad de producción de L-lisina y la productividad se pueden potenciar adicionalmente potenciando sucesivamente dapA, lysA y ddh además de los genes anteriormente mencionados.

Listado de secuencias

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Ajinomoto Co., Inc.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Procedimiento de producir L-lisina

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 24

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA

(A) DESTINATARIO:

(B) CALLE:

(C) CIUDAD:

(E) PAÍS:

(F) CÓDIGO POSTAL:

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: disquete

(B) ORDENADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release n.º: 1.0, versión n.º: 1.30

(vi) FECHAS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) FECHAS DE SOLICITUDES PREVIAS:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: JP 7-14014

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 7-julio-1995

(viii) INFORMACIÓN DE ABOGADO/AGENTE:

5

(A): NOMBRE:

(B): NÚMERO DE REGISTRO:

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO:

(B) TELEFAX:

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"

(iv) ANTI-SENTIDO: no

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 1:

20

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTT 23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

25

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro...ADN sintético

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"

(iv) ANTI-SENTIDO: sí

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 2:

AOGGAARRCA ATCTTAOGGC C 21

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1643 bases

35

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTI-SENTIDO: No

(vi) FUENTE ORIGINAL:

5

(A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*

(B) CEPa: ATCC 13869

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 3:

TCGOGAAGTA	GCAOCTGTCA	CTTTTGTCTC	AAATATTAAA	TOGAATATCA	ATATAOGGTC	60
TGTTTATTGG	AAGCATCOOC	AGTGGCTGAG	AAGCATCOGC	TAAAGCOCCA	GGAACCOCTGT	120
GCAGAAAGAA	AACACTOCTC	TGGCTAGGTA	GACACAGTTT	ATAAAGGTAG	AGTTGAGCGG	180
GTAAGTGTCA	GCAOCTAGAT	CGAAAGGTGC	ACAAAGGTGG	COCTGGTCTG	ACAGAAATAT	240
GGGGTTTCT	CGCTGAGAG	TGOGGAACGC	ATTAGAAACG	TOGCTGAAAG	GATCGTTGOC	300
ACCAAGAAGG	CTGGAAATGA	TGTCTGTGGT	GTCTGCTCCG	CAATGGGAGA	CAOCCAGGAT	360
GAACTTCTAG	AACTTGCAGC	GGCAGTGAAT	COOCTTCCGC	CAGCTGTGTA	AATGGATATG	420
CTOCTGACTG	CTGGTGAGOG	TATTTCTAAC	GCTCTCTGCG	CCATGGCTAT	TGAGTCCCTT	480
GGGCGAGAAG	CTCAATCTTT	CACTGGCTCT	CAGGCTGGTG	TGCTCAACCAC	CGAGCGCCAC	540
GGAAACGCAC	GCATGTGTGA	CGTCACACCG	GGTCTGTGTC	GTGAAGCACT	CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA	TTGTGTCTGG	TTTTTCAGGGT	GTAAATAAAG	AAACCGCGGA	TGTCAACCAG	660
TTGGGTCTGT	GTGGTTCTGA	CAOCCACTGA	GTGTGGTTGG	CAGCTGCTTT	GAAOCTGTAT	720
GTGTGTGAGA	TTTACTCGGA	CGTTGACGGT	GTGTATAACG	CTGAACCGCG	CATCGTTTCT	780
AATGCACAGA	AGCTGGAAAA	GCTCAGCTTC	GAAGAAATGC	TGGAAGTTGC	TGCTGTTGGC	840
TOCAAGATTT	TGGTGCTGOG	CAGTGTGAA	TACGCTCTGT	CATTCAATGT	GOCATCTGCG	900
GTACGCTCTG	CTTATAGTAA	TGATCCCGGC	ACTTTGATTG	COGGCTCTAT	GGAGGATATT	960
CTGTGTGAAG	AAGCAGTCTT	TACCGGTGTC	GCAACCGACA	AGTCCGAAGC	CAAAGTAAOC	1020
GTCTCTGGTA	TTTCCGATAA	GCCAGGCGAG	GCTGCCAAGG	TTTTCCGTGC	GTGGGCTGAT	1080
GCAGAAATCA	ACATGTGACAT	GGTTCTGCGA	AAOCTCTCTT	CTGTGGAAGA	CGGCAOCCAC	1140
GACATCAOCT	TCAOCTGOC	TOGCGCTGAC	GGACGCGGTG	CGATGGAGAT	CTTGAAGAAG	1200
CTTCAGGTTT	AGGGCAACTG	GACCAATGTG	CTTTAAGAGG	AOCAGGTGGG	CAAAGTCTOC	1260
CTGTGGGTG	CTGGCATGAA	GTCTCAOCCA	GGTGTTAACG	CAGAGTTTAT	GGAAGCTCTG	1320
CGGATGTCA	AGTGAACAT	CGAATTGATT	TOCAOCTCTG	AGATCCGCAT	TTCCGTGCTG	1380
ATCCGTGAAG	ATGATCTGGA	TGCTGCTGCA	CGTGCATTGC	ATGAGCAGTT	CCAGCTGGGC	1440
GGGGAAGAG	AAGCGTCTG	TTATGCAGGC	ACCGGACGCT	AAAGTTTAA	AGGAGTAGTT	1500
TTACAATGAC	CAOCCATGCA	GTGTGTGGTG	CAACGGGCGA	GGTCCGCGAG	GTATGCGCA	1560
CCCTTTTGGG	AGAGCGCAAT	TTCCAGCTG	ACACTGTTGG	TTCTTTTGGT	TCCCGCGTTT	1620
CCGAGGCGG	TAAGATTGAA	TTC				1643

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1643 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15

(C) TIPO DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTI-SENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Brevibacterium lactofermentum

(B) CEPA: ATCC 13869

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 217..1482

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 4:

```

TOGCGAAGTA GCAOCTGTCA CTTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC      60
TGTTTATTGG AACGCATOOC AGTGGCTGAG ACGCATOOGC TAAAGCCCCA GGAAOCTGT      120
GCAGAAAGAA AACACTOCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG      180
GTAACGTGCA GCAOCTAGAT OGAAAGGTGC ACAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG      234
                                     Met Ala Leu Val Val Gln
                                     1           5
AAA TAT GGC GGT TOC TOG CTT GAG AGT GCG GAA OGC ATT AGA AAC GTC      282
Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val
          10           15           20
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
GTC TGC TOC 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
GCG GCA GTG AAT OCC GTT OCG OCA 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
ACT GCT GGT GAG OGT 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
TOC 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

```

CTC	AOC	AOC	GAG	OGC	CAC	GGA	AAC	GCA	OGC	ATT	GTT	GAC	GTC	ACA	OCG	570
Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg	Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	
		105					110					115				
GGT	OGT	GTG	OGT	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				
GGT	TTT	CAG	GGT	GTT	AAT	AAA	GAA	AOC	OGC	GAT	GTC	AOC	ACG	TTG	GGT	666
Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg	Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	
		135			140					145					150	
OGT	GGT	GGT	TCT	GAC	AOC	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		
GCT	GAT	GTG	TGT	GAG	ATT	TAC	TOG	GAC	GTT	GAC	GGT	GTG	TAT	AOC	GCT	762
Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	
		170						175				180				
GAC	OCG	OGC	ATC	GTT	OCT	AAT	GCA	CAG	AAG	CTG	GAA	AAG	CTC	AGC	TTC	810
Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	
		185					190					195				
GAA	GAA	ATG	CTG	GAA	CTT	GCT	GCT	GTT	GGC	TOC	AAG	ATT	TTG	GTG	CTG	858
Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	
		200				205					210					
OGC	AGT	GTT	GAA	TAC	GCT	OGT	GCA	TTC	AAT	GTG	CCA	CTT	OGC	GTA	OGC	906
Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn	Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	
		215			220					225				230		
TOG	TCT	TAT	AGT	AAT	GAT	OCG	GGC	ACT	TTG	ATT	GOC	GGC	TCT	ATG	GAG	954
Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu	Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	
			235					240				245				
GAT	ATT	OCT	GTG	GAA	GAA	GCA	GTC	CTT	AOC	GGT	GTC	GCA	ACC	GAC	AAG	1002
Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	
		250				255					260					
TOC	GAA	GOC	AAA	GTA	AOC	GTT	CTG	GGT	ATT	TOC	GAT	AAG	CCA	GGC	GAG	1050
Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile	Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	
		265				270					275					
GCT	GOC	AAG	GTT	TTC	OGT	GOC	TTG	GCT	GAT	GCA	GAA	ATC	AAC	ATT	GAC	1098
Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	
		280				285					290					
ATG	GTT	CTG	CAG	AAC	GTC	TOC	TCT	GTG	GAA	GAC	GGC	AOC	AOC	GAC	ATC	1146
Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	
		295			300					305				310		
ACG	TTC	AOC	TGC	OCT	OGC	GCT	GAC	GGA	OGC	OGT	GOC	ATG	GAG	ATC	TTG	1194
Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	
			315					320				325				
AAG	AAG	CTT	CAG	GTT	CAG	GGC	AAC	TGG	AOC	AAT	GTG	CTT	TAC	GAC	GAC	1242
Lys	Lys	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr	Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	
		330						335				340				

CAG GTC GGC AAA GTC TOC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC OCA	1290
Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro	
345 350 355	
GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG OGC 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	
ATC GAA TTG ATT TOC ACC TCT GAG ATC OGC ATT TOC GTG CTG ATC OGT	1386
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg	
375 380 385 390	
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA OGT 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	
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GOC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA OGC TAA	1482
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg	
410 415 420	
AGTTTTAAAG GAGTAGTTTT ACAATGACCA CCATCGCAGT TGTTGGTGCA ACOGGOCAGG	1542
TOGGOCAGGT TATGCGCACC CTTTTGGAAG AGCGCAATTT OCCAGCTGAC ACTGTTTGTT	1602
TCCTTGCTTC CCGCGTTCC GCAGGCGTA AGATTGAATT C	1643

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 421 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 5:

10

Met	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala
1				5				10					15		
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala
			20					25					30		
Gly	Asn	Asp	Val	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp
		35					40					45			
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
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr
				85					90					95	
Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg
			100					105					110		
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
	130					135					140				
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala

145		150		155		160									
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
		180				185								190	
Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly
		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
225					230					235					240
Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr
				245					250					255	
Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile
		260				265							270		
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
	290				295					300					
Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg
305				310					315						320
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
		340						345					350		
Gly	Met	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu
	355					360						365			
Arg	Asp	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu	Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg
	370				375					380					
Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala
385				390					395						400
Leu	His	Glu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr
			405					410					415		
Ala	Gly	Thr	Gly	Arg											
			420												

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

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

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

10 (iv) ANTI-SENTIDO: No

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*

(B) CEPA: ATCC 13869

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 964..1482

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 6:

TCGGAAGTA GCACTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TGAATATCA ATATACGGTC 60
 TGTTTATTGG AACCATOOC AGTGGCTGAG ACGCATCOGC TAAAGCCOCA GGAACCTGT 120
 GCAGAAAGAA AACACTOCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG 180
 GTAACGTGCA GCACGTAGAT OGAAAGGTGC ACAAAGGTGG CCTTGGTCGT ACAGAAATAT 240
 GGGGTTTOCT CGCTTGAGAG TGGGAACGC ATTAGAAACG TCGCTGAAAG GATCGTTGOC 300
 AOCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTOGTGGTT GTCTGCTCOG CAATGGGAGA CACCACGGAT 360
 GAACTTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCGGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG 420
 CTCTGACTG CTGGTGAGOG TATTTCTAAC GCTCTGTGOG CCATGGCTAT TGAGTOOCTT 480
 GGGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC OGAGCGCCAC 540
 GGAAACGCAC GCATTGTTGA CGTCACACOG GGTOGTGTGC GTGAAGCACT CGATGAGGGC 600
 AAGATCTGCA TTGTGTCTGG TTTTCAGGT GTTAATAAAG AAACCCGCGA TGTCAOCACG 660
 TTGGGTCTG GTGGTCTGA CACACTGCA GTTGGGTGG CAGCTGCTTT GAAOGCTGAT 720
 GTGTGTGAGA TTTACTOGGA CGTTGACGGT GTGTATAOOG CTGACCCOGG CATOGTTOCT 780
 AATGCACAGA AGCTGGAAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACTTGC TGCTGTTGGC 840
 TOCAAGATTT TGGTGTCTGG CAGTGTGAA TACGCTOGTG CATTCATGT GOCACCTCGC 900
 GTAOGCTOGT CTTATAGTAA TGATCCCGC ACTTTGATTG CCGCTCTAT GGAGGATATT 960
 OCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TOC GAA 1008
 Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu
 1 5 10 15
 GGC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TOC GAT AAG CCA GGC GAG GCT GCC 1056
 Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala
 20 25 30
 AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT 1104
 Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val
 35 40 45
 CTG CAG AAC GTC TOC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC 1152
 Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe
 50 55 60
 ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG 1200
 Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys
 65 70 75
 CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC 1248
 Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val
 80 85 90 95
 GGC AAA GTC TOC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT 1296
 Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val
 100 105 110
 AOC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA 1344
 Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu

	115		120		125	
TTG ATT TOC ACC TCT GAG ATC OGC ATT TOC GTG CTG ATC CGT GAA GAT						1392
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp						
	130		135		140	
GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC						1440
Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly						
	145		150		155	
GGC GAA GAC GAA GGC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTAA						1490
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg						
	160		165		170	
AGGAGTAGTT TTACAATGAC CACCATOGCA GTTGTGGTG CAACGGGCA GGTGGGCCAG						1550
GTTATGGCA CCTTTTGA AGAGCGCAAT TTCCAGCTG AACTGTGCT TTCTTTGCT						1610
TCCCCGGTT CCGCAGGCG TAAGATTGAA TTC						1643

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 172 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 7:

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
			20					25						30	
Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu
		35				40						45			
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
	65				70					75					80
Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr	Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly
			85					90					95		
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
		115						120					125		
Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp
	130					135						140			
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				
				165						170					

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"

(iv) ANTI-SENTIDO: no

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 8:

GGATCCCCAA TCGATACCTG GAA 23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"

(iv) ANTI-SENTIDO: sí

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 9:

CGGTTTCATCG CCAAGTTTT CTT 23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2001 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTI-SENTIDO: no

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Brevibacterium lactofermentum

(B) CEPA: ATCC 13869

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 730..1473

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 10:

GGATOOCCAA	TOGATAOCTG	GAAOGACAAC	CTGATCAGGA	TATOCAATGC	CTTGAATATT	60
GACGTTGAGG	AAGGAATCAC	CAGOCATCTC	AACTGGAAGA	OCTGACGOCT	GCTGAATTGG	120
ATCAGTGGOC	CAATOGAOC	AOCBAOCAGG	TTGGCTATTA	OCGGOGATAT	CAAAAACAAC	180
TOGOGTGAAC	GTTTTOGTGCT	CGGCAACGG	GATGOCAGOG	ATOGACATAT	CGGAGTCACC	240
AACTTGAGOC	TGCTGCTTCT	GATOCATOGA	OGGGGAOC	AAOGGOGGCA	AAGCAGTGGG	300
GGAAGGGGAG	TTGGTGGA	CTGAATCAGT	GGGCTCTGAA	GTGGTAGGOG	ACGGGGCAGC	360
ATCTGAAGGC	GTGOGAGTTG	TGGTGACOGG	GTTAGOGGTT	TCAGTTTCTG	TCACAACTGG	420

AGCAGGACTA GCAGAGGTTG TAGGOGTTGA GCGGCTTCCA TCACAAGCAC TTAAAAGTAA	480
AGAGGOGGAA ACCACAAGCG OCAAGGAACT AOCTGOGGAA CGGGCGGTGA AGGGCAACTT	540
AAGTCTCATA TTTCAAACAT AGTTCCACCT GTGTGATTAA TCTOCAGAAC GGAACAACT	600
GATGAACAAT CGTTAACAAC ACAGACCAAA ACGGTCAGTT AGGTATGGAT ATCAGCACT	660
TCTGAATGGG TACGTCTAGA CTGGTGGGCG TTTGAAAAAC TCTTCGCCCC ACGAAAATGA	720
AGGAGCATA ATG GGA ATC AAG GTT GGC GTT CTC GGA GGC AAA GGC CGT	768
Met Gly Ile Lys Val Gly Val Leu Gly Ala Lys Gly Arg	
1 5 10	
GTT GGT CAA ACT ATT GTG GCA GCA GTC AAT GAG TCC GAC GAT CTG GAG	816
Val Gly Gln Thr Ile Val Ala Ala Val Asn Glu Ser Asp Asp Leu Glu	
15 20 25	
CTT GTT GCA GAG ATC GGC GTC GAC GAT GAT TTG AGC CTT CTG GTA GAC	864
Leu Val Ala Glu Ile Gly Val Asp Asp Asp Leu Ser Leu Leu Val Asp	
30 35 40 45	
AAC GGC GCT GAA GTT GTC GTT GAC TTC ACC ACT OCT AAC GCT GTG ATG	912
Asn Gly Ala Glu Val Val Val Asp Phe Thr Thr Pro Asn Ala Val Met	
50 55 60	
GGC AAC CTG GAG TTC TGC ATC AAC AAC GGC ATT TCT GCG GTT GTT GGA	960
Gly Asn Leu Glu Phe Cys Ile Asn Asn Gly Ile Ser Ala Val Val Gly	
65 70 75	
AAC ACG GGC TTC GAT GAT GCT CGT TTG GAG CAG GTT CGC GCC TGG CTT	1008
Thr Thr Gly Phe Asp Asp Ala Arg Leu Glu Gln Val Arg Ala Trp Leu	
80 85 90	
GAA GGA AAA GAC AAT GTC GGT GTT CTG ATC GCA OCT AAC TTT GCT ATC	1056
Glu Gly Lys Asp Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Pro Asn Phe Ala Ile	
95 100 105	
TCT GCG GTG TTG ACC ATG GTC TTT TOC AAG CAG GCT GCC CGC TTC TTC	1104
Ser Ala Val Leu Thr Met Val Phe Ser Lys Gln Ala Ala Arg Phe Phe	
110 115 120 125	
GAA TCA GCT GAA GTT ATT GAG CTG CAC CAC CCC AAC AAG CTG GAT GCA	1152
Glu Ser Ala Glu Val Ile Glu Leu His His Pro Asn Lys Leu Asp Ala	
130 135 140	
OCT TCA GGC ACC GCG ATC CAC ACT GCT CAG GGC ATT GCT GCG GCA CGC	1200
Pro Ser Gly Thr Ala Ile His Thr Ala Gln Gly Ile Ala Ala Ala Arg	
145 150 155	
AAA GAA GCA GGC ATG GAC GCA CAG CCA GAT GCG ACC GAG CAG GCA CTT	1248
Lys Glu Ala Gly Met Asp Ala Gln Pro Asp Ala Thr Glu Gln Ala Leu	
160 165 170	
GAG GGT TCC CGT GGC GCA AGC GTA GAT GGA ATC CCA GTT CAC GCA GTC	1296
Glu Gly Ser Arg Gly Ala Ser Val Asp Gly Ile Pro Val His Ala Val	
175 180 185	
CGC ATG TOC GGC ATG GTT GCT CAC GAG CAA GTT ATC TTT GGC ACC CAG	1344
Arg Met Ser Gly Met Val Ala His Glu Gln Val Ile Phe Gly Thr Gln	
190 195 200 205	
GGT CAG ACC TTG ACC ATC AAG CAG GAC TOC TAT GAT CGC AAC TCA TTT	1392

```

Gly Gln Thr Leu Thr Ile Lys Gln Asp Ser Tyr Asp Arg Asn Ser Phe
      210                      215                      220
GCA CCA GGT GTC TTG GTG GGT GTG CGC AAC ATT GCA CAG CAC CCA GGC      1440
Ala Pro Gly Val Leu Val Gly Val Arg Asn Ile Ala Gln His Pro Gly
      225                      230                      235
CTA GTC GTA GGA CTT GAG CAT TAC CTA GGC CTG TAAAGGCTCA TTTCAGCAGC      1493
Leu Val Val Gly Leu Glu His Tyr Leu Gly Leu
      240                      245
GGGTGGAATT TTTTAAAAGG AGCGTTTAAA GGCTGTGGCC GAACAAGTTA AATTGAGCGT      1553
GGAGTTGATA GGGTGCAGTT CTTTACTOC ACCCGCTGAT GTTGAGTGGT CAACTGATGT      1613
TGAGGGCGCG GAAGCACTCG TCGAGTTTGC GGGTOGTGOC TGCTACGAAA CTTTGTATAA      1673
GCGAACCCTT CGAAGTGCCT CCAATGCTGC GTATCTGCGC CACATCATGG AAGTGGGGCA      1733
CACTGCTTTG CTTGAGCATG CCAATGOCAC GATGTATATC CGAGGCATTT CTOGGTOOGC      1793
GAOCATGAA TTGGTCCGAC ACCGCCATTT TTCTCTCTCT CAACTGTCTC AGCGTTTGGT      1853
GCACAGCGGA GAATCGGAAG TAGTGGTGCC CACTCTCATC GATGAAGATC CGCAGTTGCG      1913
TGAACCTTTC ATGCAAGOCA TGGATGAGTC TOGGTTOGCT TTCAATGAGC TGCTTAATGC      1973
GCTGGAAGAA AAACCTGGCG ATGAACCG      2001

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 248 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 11:

```

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
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
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
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	
Arg	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	Gly	Ile	Pro	Val	His	Ala	Val	Arg	Met	Ser
			180					185					190		
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	
Gly	Leu	Glu	His	Tyr	Leu	Gly	Leu								
				245											

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 23 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- 10 (A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"

(iv) ANTI-SENTIDO: no

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 1:

GRCGACGGAT CGCAAATGGC AAC 23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 13:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"

(iv) ANTI-SENTIDO: sí

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 13:

GGATCCTTGA GCACCTTGCG CAG 23

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1411 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTI-SENTIDO: no

5

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*

(B) CEPA: ATCC 13869

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

10

(B) LOCALIZACIÓN: 311..1213

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 14:

CTCTOGATAT	CGAGAGAGAA	GCAGOGCCAC	GGTTTTTTOGG	TGATTTTGTAG	ATTGAAACTT	60
TGGCAGACGG	ATCGCAAATG	GCAACAAGOC	CGTATGTCAT	GGACTTTTAA	CGCAAAGCTC	120
ACACCCACGA	GCTAAAAATT	CATATAGTTA	AGACAACATT	TTTGGCTGTA	AAAGACAGOC	180
GTAAAAACCT	CTTGCTCATG	TCAATTGPTC	TTATCGGAAT	GTGGCTTGGG	CGATTGTTAT	240
GCAAAAGTTG	TTAGGTTTTT	TGCGGGGTTG	TTTAACCCOC	AAATGAGGGA	AGAAGGTAAC	300
CTTGAACICT	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			
TTC GGC ACC	GTT GGA GTA	GCA ATG GTT	ACT OCA TTC	ACG GAA TOC	GGA	397
Phe Gly Thr	Val Gly Val	Ala Met Val	Thr Pro Phe	Thr Glu Ser	Gly	
	15	20	25			
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		
AAG GGC TTG	GAT TCT TTG	GTT CTC GCG	GGC ACC ACT	GGT GAA TOC	OCA	493
Lys Gly Leu	Asp Ser Leu	Val Leu Ala	Gly Thr Thr	Gly Glu Ser	Pro	
	50	55	60			
ACG ACA ACC	GOC 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			
GAA GTT GGG	GAT CGG GCG	AAC GTC ATC	GOC 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			
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			
GAC GGC CTT	TTA GTT GTA	ACT OCT TAT	TAC TOC AAG	COG AGC CAA	GAG	685
Asp Gly Leu	Leu Val Val	Thr Pro Tyr	Tyr Ser Lys	Pro Ser Gln	Glu	
	110	115	120	125		
GGA TTG CTG	GCG CAC TTC	GGT GCA ATT	GCT GCA GCA	ACA GAG GTT	OCA	733
Gly Leu Leu	Ala His Phe	Gly Ala Ile	Ala Ala Ala	Thr Glu Val	Pro	
	130	135	140			
ATT TGT CTC	TAT GAC ATT	OCT GGT CGG	TCA GGT ATT	OCA ATT GAG	TCT	781
Ile Cys Leu	Tyr Asp Ile	Pro Gly Arg	Ser Gly Ile	Pro Ile Glu	Ser	
	145	150	155			
GAT ACC ATG	AGA CGC CTG	AGT GAA TTA	OCT ACG 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			

GAC GOC AAG GGT GAC CTC GTT GCA GOC ACG TCA TTG ATC AAA GAA ACG 877
 Asp Ala Lys Gly Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Leu Ile Lys Glu Thr
 175 180 185
 GGA CTT GOC TGG TAT TCA GGC GAT GAC CCA CTA AAC CTT GTT TGG CTT 925
 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 TOC GTA ATT GGA CAT GCA GOC OCC 973
 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
 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 GOC AAA CTA TCA CCG CTG GTA GCT GOC CAA 1069
 Arg Ala Arg Glu Ile Asn Ala Lys Leu Ser Pro Leu Val Ala Ala Gln
 240 245 250
 GGT GGC TTG GGT GGA GTC AGC TTG GCA AAA GCT GCT CTG CGT CTG CAG 1117
 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 OCT CGA CTT CCA ATT ATG GCT CCA AAT GAG 1165
 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
 Gln Glu Leu Glu Ala Leu Arg Glu Asp Met Lys Lys Ala Gly Val Leu
 290 295 300
 TAAATATGAA TGATTCCCGA AATCGGGGOC GGAAGGTTAC CCGCAAGGOG GCGCAACAGA 1273
 AGCTGGTCAG GAAAACATC TGGATACCCG TGCTTTTCAG GCAACAGATG CTTCCTCTAA 1333
 CCAGAGCGCT GTAAAAGCTG AGACCGCCGG AAACGACAAT CCGGATGCTG CGCAAGGTGC 1393
 TCAAGGATOC CAACATTC 1411

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 301 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 15:

10

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

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 23 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

10

(A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"

(iv) ANTI-SENTIDO: no

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 16:

GTGGAGCCGA CCATTCCGCG AGG 23

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 17:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"
- (iv) ANTI-SENTIDO: sí
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 17:
- CCAAAACCGC CCTCCACGGC GAA 23
- 10 (2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 18:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 3579 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: doble
- 15 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iv) ANTI-SENTIDO: no
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: Brevibacterium lactofermentum
- 20 (B) CEPA: ATCC 13869
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 533..2182
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 25 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 2188..3522
- (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 18:

GTGGAGCOGA	CCATTGCGG	AGGCTGCACT	GCAAAGAGGT	CGTAGTTTGT	GTACATGGCT	60
TCTGGOCAGT	TCATGGATTG	GCTGCOGAAG	AAGCTATAGG	CATOGCAOCA	GGGCAOOGA	120
GTTAOCGAAG	ATGGTGCCGT	GCTTTTGGCC	TTGGGCAGGG	AOCTTGACAA	AGOOCAOGCT	180
GATATOGCCA	AGTGAGGGAT	CAGAATAGTG	CATGGGCACG	TOGATGCTGC	CACATTGAGC	240
GGAGGCAATA	TCTAOCTGAG	GTGGGCATTG	TTCCAGOGG	ATGTTTCTCT	GCGCTGCTGC	300
AGTGGGCATT	GATAOCAAAA	AGGGGCTAAG	CGCAGTOGAG	GCGGCAAGAA	CTGCTACTAC	360
OCTTTTATT	GTOGAACGGG	GCATTACGGC	TOCAAGGAOG	TTTGTTTTCT	GGGTCAGTTA	420
COOCAAAAAG	CATATACAGA	GACCAATGAT	TTTTCATTA	AAAGGCAGGG	ATTTGTTATA	480
AGTATGGGTC	GTATTCTGTG	CGACGGGTGT	AOCTGGGCTA	GAATTTCTOC	CC ATG	535
				Met		
				1		
ACA OCA GCT GAT CTC GCA ACA TTG ATT AAA GAG ACC GCG GTA GAG GTT						583
Thr Pro Ala Asp Leu Ala Thr Leu Ile Lys Glu Thr Ala Val Glu Val						
5 10 15						
TTG ACC TCC CGC GAG CTC GAT ACT TCT GTT CTT CCG GAG CAG GTA GTT						631
Leu Thr Ser Arg Glu Leu Asp Thr Ser Val Leu Pro Glu Gln Val Val						
20 25 30						
GTG GAG CGT CCG CGT AAC OCA GAG CAC GGC GAT TAC GGC ACC AAC ATT						679

Val	Glu	Arg	Pro	Arg	Asn	Pro	Glu	His	Gly	Asp	Tyr	Ala	Thr	Asn	Ile	
35						40						45				
GCA	TTG	CAG	GTG	GCT	AAA	AAG	GTC	GGT	CAG	AAC	OCT	CGG	GAT	TTG	GCT	727
Ala	Leu	Gln	Val	Ala	Lys	Lys	Val	Gly	Gln	Asn	Pro	Arg	Asp	Leu	Ala	
50					55					60				65		
ACC	TGG	CTG	GCA	GAG	GCA	TTG	GCT	GCA	GAT	GAC	GCC	ATT	GAT	TCT	GCT	775
Thr	Trp	Leu	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Ala	Asp	Asp	Ala	Ile	Asp	Ser	Ala	
				70					75				80			
GAA	ATT	GCT	GGC	CCA	GGC	TTT	TTG	AAC	ATT	CGC	CTT	GCT	GCA	GCA	GCA	823
Glu	Ile	Ala	Gly	Pro	Gly	Phe	Leu	Asn	Ile	Arg	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	
			85					90				95				
CAG	GGT	GAA	ATT	GTG	GCC	AAG	ATT	CTG	GCA	CAG	GGC	GAG	ACT	TTC	GGA	871
Gln	Gly	Glu	Ile	Val	Ala	Lys	Ile	Leu	Ala	Gln	Gly	Glu	Thr	Phe	Gly	
	100						105				110					
AAC	TOC	GAT	CAC	CTT	TOC	CAC	TTG	GAC	GTG	AAC	CTC	GAG	TTC	GTT	TCT	919
Asn	Ser	Asp	His	Leu	Ser	His	Leu	Asp	Val	Asn	Leu	Glu	Phe	Val	Ser	
	115					120					125					
GCA	AAC	CCA	AOC	GGA	CCT	ATT	CAC	CTT	GGC	GGA	AOC	CGC	TGG	GCT	GOC	967
Ala	Asn	Pro	Thr	Gly	Pro	Ile	His	Leu	Gly	Gly	Thr	Arg	Trp	Ala	Ala	
130					135					140				145		
GTG	GGT	GAC	TCT	TTG	GGT	CGT	GTG	CTG	GAG	GCT	TOC	GGC	GCG	AAA	GTG	1015
Val	Gly	Asp	Ser	Leu	Gly	Arg	Val	Leu	Glu	Ala	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	
			150					155			160					
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				
GCT	TTG	TOC	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					
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					
AAG	CAT	OCT	GAA	GCG	TTG	GCT	TTG	GAG	OCT	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		
TTC	CGC	GCT	GAA	GGC	GTG	GAG	ATG	ATG	TTC	GAG	CAC	ATC	AAA	TCT	TOC	1255
Phe	Arg	Ala	Glu	Gly	Val	Glu	Met	Met	Phe	Glu	His	Ile	Lys	Ser	Ser	
			230						235				240			
CTG	CAT	GAG	TTC	GGC	ACC	GAT	TTC	GAT	GTC	TAC	TAC	CAC	GAG	AAC	TOC	1303
Leu	His	Glu	Phe	Gly	Thr	Asp	Phe	Asp	Val	Tyr	Tyr	His	Glu	Asn	Ser	
			245					250				255				
CTG	TTC	GAG	TOC	GGT	GCG	GTG	GAC	AAG	GCC	GTG	CAG	GTG	CTG	AAG	GAC	1351
Leu	Phe	Glu	Ser	Gly	Ala	Val	Asp	Lys	Ala	Val	Gln	Val	Leu	Lys	Asp	
	260					265					270					
AAC	GGC	AAC	CTG	TAC	GAA	AAC	GAG	GGC	GCT	TGG	TGG	CTG	CGT	TOC	ACC	1399

Asn	Gly	Asn	Leu	Tyr	Glu	Asn	Glu	Gly	Ala	Trp	Trp	Leu	Arg	Ser	Thr	
275						280					285					
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	
GCA	GCC	TAC	ATC	GCT	GGC	GAT	ATC	GCG	TAC	GTG	GCT	GAT	AAG	TTC	TOC	1495
Ala	Ala	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asp	Ile	Ala	Tyr	Val	Ala	Asp	Lys	Phe	Ser	
				310					315					320		
CGC	GGA	CAC	AAC	CTA	AAC	ATC	TAC	ATG	TTG	GGT	GCT	GAC	CAC	CAT	GGT	1543
Arg	Gly	His	Asn	Leu	Asn	Ile	Tyr	Met	Leu	Gly	Ala	Asp	His	His	Gly	
			325					330					335			
TAC	ATC	GCG	CGC	CTG	AAG	GCA	GCG	GCG	GCG	GCA	CTT	GGC	TAC	AAG	CCA	1591
Tyr	Ile	Ala	Arg	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Gly	Tyr	Lys	Pro	
		340				345					350					
GAA	GGC	GTT	GAA	GTC	CTG	ATT	GGC	CAG	ATG	GTG	AAC	CTG	CTT	CGC	GAC	1639
Glu	Gly	Val	Glu	Val	Leu	Ile	Gly	Gln	Met	Val	Asn	Leu	Leu	Arg	Asp	
		355				360					365					
GGC	AAG	GCA	GTG	CGT	ATG	TOC	AAG	CGT	GCA	GGC	AOC	GTG	GTC	AOC	CTA	1687
Gly	Lys	Ala	Val	Arg	Met	Ser	Lys	Arg	Ala	Gly	Thr	Val	Val	Thr	Leu	
370					375					380					385	
GAT	GAC	CTC	GTT	GAA	GCA	ATC	GGC	ATC	GAT	GCG	GCG	CGT	TAC	TOC	CTG	1735
Asp	Asp	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Ala	Ala	Arg	Tyr	Ser	Leu	
				390					395					400		
ATC	CGT	TOC	TOC	GTG	GAT	TCT	TOC	CTG	GAT	ATC	GAT	CTC	GGC	CTG	TGG	1783
Ile	Arg	Ser	Ser	Val	Asp	Ser	Ser	Leu	Asp	Ile	Asp	Leu	Gly	Leu	Trp	
		405						410					415			
GAA	TOC	CAG	TOC	TOC	GAC	AAC	OCT	GTG	TAC	TAC	GTG	CAG	TAC	GGA	CAC	1831
Glu	Ser	Gln	Ser	Ser	Asp	Asn	Pro	Val	Tyr	Tyr	Val	Gln	Tyr	Gly	His	
		420				425						430				
GCT	CGT	CTG	TGC	TOC	ATC	GCG	CGC	AAG	GCA	GAG	AOC	TTG	GGT	GTC	AOC	1879
Ala	Arg	Leu	Cys	Ser	Ile	Ala	Arg	Lys	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Val	Thr	
		435				440					445					
GAG	GAA	GGC	GCA	GAC	CTA	TCT	CTA	CTG	AOC	CAC	GAC	CGC	GAA	GGC	GAT	1927
Glu	Glu	Gly	Ala	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	His	Asp	Arg	Glu	Gly	Asp	
450					455					460				465		
CTC	ATC	CGC	ACA	CTC	GGA	GAG	TTC	CCA	GCA	GTG	GTG	AAG	GCT	GCC	GCT	1975
Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Gly	Glu	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Ala	Ala	
				470					475					480		
GAC	CTA	CGT	GAA	OCA	CAC	CGC	ATT	GCC	CGC	TAT	GCT	GAG	GAA	TTA	GCT	2023
Asp	Leu	Arg	Glu	Pro	His	Arg	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ala	Glu	Glu	Leu	Ala	
			485					490					495			
GGA	ACT	TTC	CAC	CGC	TTC	TAC	GAT	TOC	TGC	CAC	ATC	CTT	OCA	AAG	GTT	2071
Gly	Thr	Phe	His	Arg	Phe	Tyr	Asp	Ser	Cys	His	Ile	Leu	Pro	Lys	Val	
		500						505					510			
GAT	GAG	GAT	ACG	GCA	OCA	ATC	CAC	ACA	GCA	CGT	CTG	GCA	CTT	GCA	GCA	2119

Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Pro	Ile	His	Thr	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala	
515						520					525					
GCA	AOC	OGC	CAG	AOC	CTC	GCT	AAC	GOC	CTG	CAC	CTG	GTT	GGC	GTT	TOC	2167
Ala	Thr	Arg	Gln	Thr	Leu	Ala	Asn	Ala	Leu	His	Leu	Val	Gly	Val	Ser	
530					535				540						545	
GCA	OCG	GAG	AAG	ATG	TAACA	ATG	GCT	ACA	GTT	GAA	AAT	TTC	AAT	GAA		2214
Ala	Pro	Glu	Lys	Met		Met	Ala	Thr	Val	Glu	Asn	Phe	Asn	Glu		
				550		1				5						
CTT	OCG	GCA	CAC	GTA	TGG	CCA	OGC	AAT	GOC	GTG	OGC	CAA	GAA	GAC	GGC	2262
Leu	Pro	Ala	His	Val	Trp	Pro	Arg	Asn	Ala	Val	Arg	Gln	Glu	Asp	Gly	
10					15					20					25	
GTT	GTC	AOC	GTC	GCT	GGT	GTG	OCT	CTG	OCT	GAC	CTC	GCT	GAA	GAA	TAC	2310
Val	Val	Thr	Val	Ala	Gly	Val	Pro	Leu	Pro	Asp	Leu	Ala	Glu	Glu	Tyr	
				30					35					40		
GGA	AOC	CCA	CTG	TTC	GTA	GTC	GAC	GAG	GAC	GAT	TTC	OGT	TOC	OGC	TGT	2358
Gly	Thr	Pro	Leu	Phe	Val	Val	Asp	Glu	Asp	Asp	Phe	Arg	Ser	Arg	Cys	
				45					50					55		
OGC	GAC	ATG	GCT	AOC	GCA	TTC	GGT	GGA	CCA	GGC	AAT	GTG	CAC	TAC	GCA	2406
Arg	Asp	Met	Ala	Thr	Ala	Phe	Gly	Gly	Pro	Gly	Asn	Val	His	Tyr	Ala	
		60					65					70				
TCT	AAA	GCG	TTC	CTG	AOC	AAG	AOC	ATT	GCA	OGT	TGG	GTT	GAT	GAA	GAG	2454
Ser	Lys	Ala	Phe	Leu	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala	Arg	Trp	Val	Asp	Glu	Glu	
		75				80					85					
GGG	CTG	GCA	CTG	GAC	ATT	GCA	TOC	ATC	AAC	GAA	CTG	GGC	ATT	GOC	CTG	2502
Gly	Leu	Ala	Leu	Asp	Ile	Ala	Ser	Ile	Asn	Glu	Leu	Gly	Ile	Ala	Leu	
		90				95				100				105		
GOC	GCT	GGT	TTC	OCG	GOC	AGC	OGT	ATC	AOC	GOG	CAC	GGC	AAC	AAC	AAA	2550
Ala	Ala	Gly	Phe	Pro	Ala	Ser	Arg	Ile	Thr	Ala	His	Gly	Asn	Asn	Lys	
				110						115				120		
GGC	GTA	GAG	TTC	CTG	OGC	GOG	TTG	GTT	CAA	AAC	GGT	GTG	GGA	CAC	GTG	2598
Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Arg	Ala	Leu	Val	Gln	Asn	Gly	Val	Gly	His	Val	
				125					130				135			
GTG	CTG	GAC	TOC	GCA	CAG	GAA	CTA	GAA	CTG	TTG	GAT	TAC	GTT	GOC	GCT	2646
Val	Leu	Asp	Ser	Ala	Gln	Glu	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Tyr	Val	Ala	Ala	
				140					145				150			
GGT	GAA	GGC	AAG	ATT	CAG	GAC	GTG	TTG	ATC	OGC	GTA	AAG	CCA	GGC	ATC	2694
Gly	Glu	Gly	Lys	Ile	Gln	Asp	Val	Leu	Ile	Arg	Val	Lys	Pro	Gly	Ile	
				155			160					165				
GAA	GCA	CAC	AOC	CAC	GAG	TTC	ATC	GOC	ACT	AGC	CAC	GAA	GAC	CAG	AAG	2742
Glu	Ala	His	Thr	His	Glu	Phe	Ile	Ala	Thr	Ser	His	Glu	Asp	Gln	Lys	
				170		175				180				185		
TTC	GGA	TTC	TOC	CTG	GCA	TOC	GGT	TOC	GCA	TTC	GAA	GCA	GCA	AAA	GOC	2790
Phe	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Phe	Glu	Ala	Ala	Lys	Ala	
				190					195					200		
GOC	AAC	AAC	GCA	GAA	AAC	CTG	AAC	CTG	GTT	GGC	CTG	CAC	TGC	CAC	GTT	2838

Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val	
205 210 215	
GGT TOC CAG GTG TTC GAC GGC GAA GGC TTC AAG CTG GCA GCA GAA OGC	2886
Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg	
220 225 230	
GTG TTG GGC CTG TAC TCA CAG ATC CAC AGC GAA CTG GGC GTT GOC CTT	2934
Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu	
235 240 245	
OCT GAA CTG GAT CTC GGT GGC GGA TAC GGC ATT GOC TAT ACC GCA GCT	2982
Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala	
250 255 260 265	
GAA GAA OCA CTC AAC GTC GCA GAA GTT GOC TOC GAC CTG CTC ACC GCA	3030
Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala	
270 275 280	
GTC GGA AAA ATG GCA GCG GAA CTA GGC ATC GAC GCA OCA ACC GTG CTT	3078
Val Gly Lys Met Ala Ala Glu Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu	
285 290 295	
GTT GAG OOC GGC OGC GCT ATC GCA GGC OOC TOC ACC GTG ACC ATC TAC	3126
Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr	
300 305 310	
GAA GTC GGC ACC ACC AAA GAC GTC CAC GTA GAC GAC GAC AAA ACC OGC	3174
Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg	
315 320 325	
CGT TAC ATC GOC GTG GAC GGA GGC ATG TOC GAC AAC ATC OGC OCA GCA	3222
Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala	
330 335 340 345	
CTC TAC GGC TOC GAA TAC GAC GOC OGC GTA GTA TOC OGC TTC GOC GAA	3270
Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu	
350 355 360	
GGA GAC OCA GTA AGC ACC OGC ATC GTG GGC TOC CAC TGC GAA TOC GGC	3318
Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg Ile Val Gly Ser His Cys Glu Ser Gly	
365 370 375	
GAT ATC CTG ATC AAC GAT GAA ATC TAC CCA TCT GAC ATC ACC AGC GGC	3366
Asp Ile Leu Ile Asn Asp Glu Ile Tyr Pro Ser Asp Ile Thr Ser Gly	
380 385 390	
GAC TTC CTT GCA CTC GCA GOC ACC GGC GCA TAC TGC TAC GOC ATG AGC	3414
Asp Phe Leu Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Ser	
395 400 405	
TOC OGC TAC AAC GOC TTC ACA OGC OOC GOC GTC GTG TOC GTC OGC GCT	3462
Ser Arg Tyr Asn Ala Phe Thr Arg Pro Ala Val Val Ser Val Arg Ala	
410 415 420 425	
GGC AGC TOC OGC CTC ATG CTG OGC OGC GAA ACG CTC GAC GAC ATC CTC	3510
Gly Ser Ser Arg Leu Met Leu Arg Arg Glu Thr Leu Asp Asp Ile Leu	
430 435 440	
TCA CTA GAG GCA TAAOGCTTTT CGAGGCTGA CCGCGCOCTT CACCTTCGOC	3562
Ser Leu Glu Ala	
445	
GTGGAGGGCG GTTTTGG	3579

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 550 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 19:

5

```

Met Thr Pro Ala Asp Leu Ala Thr Leu Ile Lys Glu Thr Ala Val Glu
 1           5           10           15
Val Leu Thr Ser Arg Glu Leu Asp Thr Ser Val Leu Pro Glu Gln Val
          20           25           30
Val Val Glu Arg Pro Arg Asn Pro Glu His Gly Asp Tyr Ala Thr Asn
          35           40           45
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
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
          100          105          110
Gly Asn Ser Asp His Leu Ser His Leu Asp Val Asn Leu Glu Phe Val
          115          120          125
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
          145          150          155          160
Val Thr Arg Glu Tyr Tyr Phe Asn Asp His Gly Arg Gln Ile Asp Arg
          165          170          175
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
          195          200          205
Glu Lys His Pro Glu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Ala Thr Gln Glu
          210          215          220
Leu Phe Arg Ala Glu Gly Val Glu Met Met Phe Glu His Ile Lys Ser
          225          230          235          240
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
          260          265          270

```

Asp	Asn	Gly	Asn	Leu	Tyr	Glu	Asn	Glu	Gly	Ala	Trp	Trp	Leu	Arg	Ser	275	280	285
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	305	310	315
Ser	Arg	Gly	His	Asn	Leu	Asn	Ile	Tyr	Met	Leu	Gly	Ala	Asp	His	His	325	330	335
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
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	385	390	395
Leu	Ile	Arg	Ser	Ser	Val	Asp	Ser	Ser	Leu	Asp	Ile	Asp	Leu	Gly	Leu	405	410	415
Trp	Glu	Ser	Gln	Ser	Ser	Asp	Asn	Pro	Val	Tyr	Tyr	Val	Gln	Tyr	Gly	420	425	430
His	Ala	Arg	Leu	Cys	Ser	Ile	Ala	Arg	Lys	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Val	435	440	445
Thr	Glu	Gly	Ala	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Thr	His	Asp	Arg	Glu	Gly		450	455	460
Asp	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Gly	Glu	Phe	Pro	Ala	Val	Val	Lys	Ala	Ala	465	470	475
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	500	505	510
Val	Asp	Glu	Asp	Thr	Ala	Pro	Ile	His	Thr	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Ala	515	520	525
Ala	Ala	Thr	Arg	Gln	Thr	Leu	Ala	Asn	Ala	Leu	His	Leu	Val	Gly	Val	530	535	540
Ser	Ala	Pro	Glu	Lys	Met											545	550	

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 445 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 20:

10

Met Ala Thr Val Glu Asn Phe Asn Glu Leu Pro Ala His Val Trp Pro

1	5	10	15
Arg Asn Ala Val	Arg Gln Glu Asp Gly Val Val	Thr Val Ala Gly Val	
20	25	30	
Pro Leu Pro Asp Leu Ala Glu Glu Tyr Gly Thr Pro Leu Phe Val Val			
35	40	45	
Asp Glu Asp Asp Phe Arg Ser Arg Cys Arg Asp Met Ala Thr Ala Phe			
50	55	60	
Gly Gly Pro Gly Asn Val His Tyr Ala Ser Lys Ala Phe Leu Thr Lys			
65	70	75	80
Thr Ile Ala Arg Trp Val Asp Glu Glu Gly Leu Ala Leu Asp Ile Ala			
85	90	95	
Ser Ile Asn Glu Leu Gly Ile Ala Leu Ala Ala Gly Phe Pro Ala Ser			
100	105	110	
Arg Ile Thr Ala His Gly Asn Asn Lys Gly Val Glu Phe Leu Arg Ala			
115	120	125	
Leu Val Gln Asn Gly Val Gly His Val Val Leu Asp Ser Ala Gln Glu			
130	135	140	
Leu Glu Leu Leu Asp Tyr Val Ala Ala Gly Glu Gly Lys Ile Gln Asp			
145	150	155	160
Val Leu Ile Arg Val Lys Pro Gly Ile Glu Ala His Thr His Glu Phe			
165	170	175	
Ile Ala Thr Ser His Glu Asp Gln Lys Phe Gly Phe Ser Leu Ala Ser			
180	185	190	
Gly Ser Ala Phe Glu Ala Ala Lys Ala Ala Asn Asn Ala Glu Asn Leu			
195	200	205	
Asn Leu Val Gly Leu His Cys His Val Gly Ser Gln Val Phe Asp Ala			
210	215	220	
Glu Gly Phe Lys Leu Ala Ala Glu Arg Val Leu Gly Leu Tyr Ser Gln			
225	230	235	240
Ile His Ser Glu Leu Gly Val Ala Leu Pro Glu Leu Asp Leu Gly Gly			
245	250	255	
Gly Tyr Gly Ile Ala Tyr Thr Ala Ala Glu Glu Pro Leu Asn Val Ala			
260	265	270	
Glu Val Ala Ser Asp Leu Leu Thr Ala Val Gly Lys Met Ala Ala Glu			
275	280	285	
Leu Gly Ile Asp Ala Pro Thr Val Leu Val Glu Pro Gly Arg Ala Ile			
290	295	300	
Ala Gly Pro Ser Thr Val Thr Ile Tyr Glu Val Gly Thr Thr Lys Asp			
305	310	315	320
Val His Val Asp Asp Asp Lys Thr Arg Arg Tyr Ile Ala Val Asp Gly			
325	330	335	
Gly Met Ser Asp Asn Ile Arg Pro Ala Leu Tyr Gly Ser Glu Tyr Asp			
340	345	350	
Ala Arg Val Val Ser Arg Phe Ala Glu Gly Asp Pro Val Ser Thr Arg			
355	360	365	

Ile	Val	Gly	Ser	His	Cys	Glu	Ser	Gly	Asp	Ile	Leu	Ile	Asn	Asp	Glu
370						375					380				
Ile	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Leu	Ala	Leu	Ala	Ala
385					390					395					400
Thr	Gly	Ala	Tyr	Cys	Tyr	Ala	Met	Ser	Ser	Arg	Tyr	Asn	Ala	Phe	Thr
				405					410					415	
Arg	Pro	Ala	Val	Val	Ser	Val	Arg	Ala	Gly	Ser	Ser	Arg	Leu	Met	Leu
			420					425					430		
Arg	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Glu	Ala			
		435					440					445			

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 20 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- 10 (A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"
(iv) ANTI-SENTIDO: no
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 21:
CATCTAAGTA TGMTCTCGG 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 20 bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- 20 (A) DESCRIPCIÓN: /desc. = "ADN sintético"
(iv) ANTI-SENTIDO: sí
(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 22:
TGCCCCTCGA GCTAAATTAG 20

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 1034 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE HEBRA: doble

- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (iv) ANTI-SENTIDO: no
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- 5 (A) ORGANISMO: *Brevibacterium lactofermentum*
- (B) CEPA: ATCC 13869
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 61..1020
- 10 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 23:

ATGCATCTCG	GTAAGCTCGA	CCAGGACAGT	GCCACCACAA	TTTTGGAGGA	TTACAAGAAC	60
ATG ACC AAC ATC OGC GTA GCT ATC GTG GGC TAC GGA AAC CTG GGA CGC						108
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 GOC AAG CAG CCC GAC ATG GAC CTT GTA GGA						156
Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly						
	20		25		30	
ATC TTC TCG OGC OGC GOC ACC CTC GAC ACA AAG ACG OCA GTC TTT GAT						204
Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp						
	35		40		45	
GTC GCC GAC GTG GAC AAG CAC GOC 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						
	50		55		60	
TGC ATG GGC TCC GOC ACC GAC ATC CCT GAG CAG GCA OCA AAG TTC GCG						300
Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala						
65		70		75	80	
CAG TTC GOC TGC ACC GTA GAC ACC TAC GAC AAC CAC OGC GAC ATC OCA						348
Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro						
	85		90		95	
CGC CAC CGC CAG GTC ATG AAC GAA GOC GOC ACC GCA GOC GGC AAC GTT						396
Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val						
	100		105		110	
GCA CTG GTC TCT ACC GGC TGG GAT CCA GGA ATG TTC TCC ATC AAC OGC						444
Ala Leu Val Ser Thr Gly Trp Asp Pro Gly Met Phe Ser Ile Asn Arg						
	115		120		125	
GTC TAC GCA GCG GCA GTC TTA GOC 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						
	130		135		140	
GGC CCA GGT TTG TCA CAG GGC CAC TCC GAT GCT TTG OGA OGC ATC OCT						540
Gly Pro Gly Leu Ser Gln Gly His Ser Asp Ala Leu Arg Arg Ile Pro						
145		150		155	160	
GGC GTT CAA AAG GCA GTC CAG TAC ACC CTC CCA TCC GAA GAC GOC CTG						588
Gly Val Gln Lys Ala Val Gln Tyr Thr Leu Pro Ser Glu Asp Ala Leu						
	165		170		175	
GAA AAG GOC OGC OGC GGC GAA GOC 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						
	180		185		190	
CAC AAG OGC CAA TGC TTC GTG GTT GOC GAC GCG GOC GAT CAC GAG OGC						684
His Lys Arg Gln Cys Phe Val Val Ala Asp Ala Ala Asp His Glu Arg						
	195		200		205	

ATC GAA AAC GAC ATC OGC ACC ATG OCT GAT TAC TTC GTT GGC TAC GAA	732
Ile Glu Asn Asp Ile Arg Thr Met Pro Asp Tyr Phe Val Gly Tyr Glu	
210 215 220	
GTC GAA GTC AAC TTC ATC GAC GAA GCA ACC TTC GAC TOC GAG CAC ACC	780
Val Glu Val Asn Phe Ile Asp Glu Ala Thr Phe Asp Ser Glu His Thr	
225 230 235 240	
GGC ATG OCA CAC GGT GGC CAC GTG ATT ACC ACC GGC GAC ACC GGT GGC	828
Gly Met Pro His Gly Gly His Val Ile Thr Thr Gly Asp Thr Gly Gly	
245 250 255	
TTC AAC CAC ACC GTG GAA TAC ATC CTC AAG CTG GAC OGA AAC OCA GAT	876
Phe Asn His Thr Val Glu Tyr Ile Leu Lys Leu Asp Arg Asn Pro Asp	
260 265 270	
TTC ACC GCT TOC TCA CAG ATC GCT TTC GGT OGC GCA GCT CAC OGC ATG	924
Phe Thr Ala Ser Ser Gln Ile Ala Phe Gly Arg Ala Ala His Arg Met	
275 280 285	
AAG CAG CAG GGC CAA AGC GGA GCT TTC ACC GTC CTC GAA GTT GCT OCA	972
Lys Gln Gln Gly Gln Ser Gly Ala Phe Thr Val Leu Glu Val Ala Pro	
290 295 300	
TAC CTG CTC TOC OCA GAG AAC TTG GAC GAT CTG ATC GCA OGC GAC GTC	1020
Tyr Leu Leu Ser Pro Glu Asn Leu Asp Asp Leu Ile Ala Arg Asp Val	
305 310 315 320	
TAATTTAGCT CGAG	1034

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID N.º: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 320 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID N.º: 24:

Met Thr Asn Ile Arg Val Ala Ile Val Gly Tyr Gly Asn Leu Gly Arg	
1 5 10 15	
Ser Val Glu Lys Leu Ile Ala Lys Gln Pro Asp Met Asp Leu Val Gly	
20 25 30	
Ile Phe Ser Arg Arg Ala Thr Leu Asp Thr Lys Thr Pro Val Phe Asp	
35 40 45	
Val Ala Asp Val Asp Lys His Ala Asp Asp Val Asp Val Leu Phe Leu	
50 55 60	
Cys Met Gly Ser Ala Thr Asp Ile Pro Glu Gln Ala Pro Lys Phe Ala	
65 70 75 80	
Gln Phe Ala Cys Thr Val Asp Thr Tyr Asp Asn His Arg Asp Ile Pro	
85 90 95	
Arg His Arg Gln Val Met Asn Glu Ala Ala Thr Ala Ala Gly Asn Val	
100 105 110	
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
	130					135					140				
Gly	Pro	Gly	Leu	Ser	Gln	Gly	His	Ser	Asp	Ala	Leu	Arg	Arg	Ile	Pro
145					150					155					160
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
			180					185				190			
His	Lys	Arg	Gln	Cys	Phe	Val	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Asp	His	Glu	Arg
	195					200					205				
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
225					230					235					240
Gly	Met	Pro	His	Gly	Gly	His	Val	Ile	Thr	Thr	Gly	Asp	Thr	Gly	Gly
				245					250					255	
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
	275						280				285				
Lys	Gln	Gln	Gly	Gln	Ser	Gly	Ala	Phe	Thr	Val	Leu	Glu	Val	Ala	Pro
	290					295					300				
Tyr	Leu	Leu	Ser	Pro	Glu	Asn	Leu	Asp	Asp	Leu	Ile	Ala	Arg	Asp	Val
305					310					315					320

REIVINDICACIONES

1. Un vector replicable autónomamente en células de bacterias corineformes, que comprende una secuencia de ADN que codifica para una aspartocinasa en la que la inhibición por retroalimentación por L-lisina y L-treonina está desensibilizada y una secuencia de ADN que codifica para una dihidrodipicolinato reductasa obtenida de una bacteria corineforme.
2. El vector de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una secuencia de ADN que codifica para una dihidropicolinato sintasa.
3. El vector de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende adicionalmente una secuencia de ADN que codifica para una diaminopimelato descarboxilasa.
4. El vector de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende adicionalmente una secuencia de ADN que codifica para una diaminopimelato deshidrogenasa.
5. El vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha aspartocinasa en la que la inhibición por retroalimentación por L-lisina y L-treonina está desensibilizada es una aspartocinasa que se origina de bacterias corineformes y en el que dicha aspartocinasa está proporcionada como aspartocinasa mutante en la que un 279 enésimo residuo de alanina según se cuenta a partir de su extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 5 está cambiado por un residuo de aminoácido distinto de alanina y distinto de aminoácido ácido en su subunidad α y un 30 enésimo residuo de alanina según se cuenta a partir de su extremo N-terminal en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 7 está cambiado por un residuo de aminoácido distinto de alanina y distinto de aminoácido ácido en su subunidad β .
6. El vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para la dihidrodipicolinato reductasa codifica para una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 11 en el Listado de secuencias, o para una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual que la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 11.
7. El vector de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la secuencia de ADN que codifica para la dihidrodipicolinato sintasa codifica para una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 15 en el Listado de secuencias, o para una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual que la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 15.
8. El vector de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la secuencia de ADN que codifica para la diaminopimelato descarboxilasa codifica para una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 20 en el Listado de secuencias, o para una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 20.
9. El vector de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha secuencia de ADN que codifica para la diaminopimelato deshidrogenasa codifica para una secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 24 en el Listado de secuencias, o para una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual a la secuencia de aminoácidos representada en la SEC ID N.º: 24.
10. Una bacteria corineforme que comprende una secuencia de ADN potenciada que codifica para una aspartocinasa en la que la inhibición de retroalimentación por L-lisina y L-treonina está desensibilizada y que comprende una secuencia de ADN potenciada que codifica para una dihidrodipicolinato reductasa, en la que el ADN se potencia incrementando el número de copias de un gen, usando un promotor fuerte, o combinando estos medios.
11. La bacteria corineforme de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dichos resultados de secuencia de ADN potenciada dan como resultado un incremento en la actividad intracelular de una enzima codificada por dicha secuencia de ADN incrementando el número de copias de un gen, usando un promotor fuerte, o combinando estos medios.
12. La bacteria corineforme de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha secuencia de ADN potenciada da como resultado un incremento en la actividad intracelular de una enzima codificada por dicha secuencia de ADN incrementando el número de copias de un gen.
13. La bacteria corineforme de acuerdo con cualesquiera reivindicaciones 10-12, que comprenden adicionalmente una secuencia de ADN potenciada que codifica para una dihidrodipicolinato sintasa.
14. Las bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 13, que comprenden adicionalmente una secuencia de ADN potenciada que codifica para una diaminopimelato descarboxilasa.
15. Las bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 14, que comprenden adicionalmente una secuencia de ADN potenciada que codifica para una diaminopimelato deshidrogenasa.

16. Una bacteria corineforme transformada por introducción del vector según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

17. Un procedimiento para producir L-lisina que comprende las etapas de cultivar dicha bacteria corineforme según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16 en un medio apropiado, producir y acumular L-lisina en un cultivo de la bacteria y recoger L-lisina del cultivo.

5

Figura 1

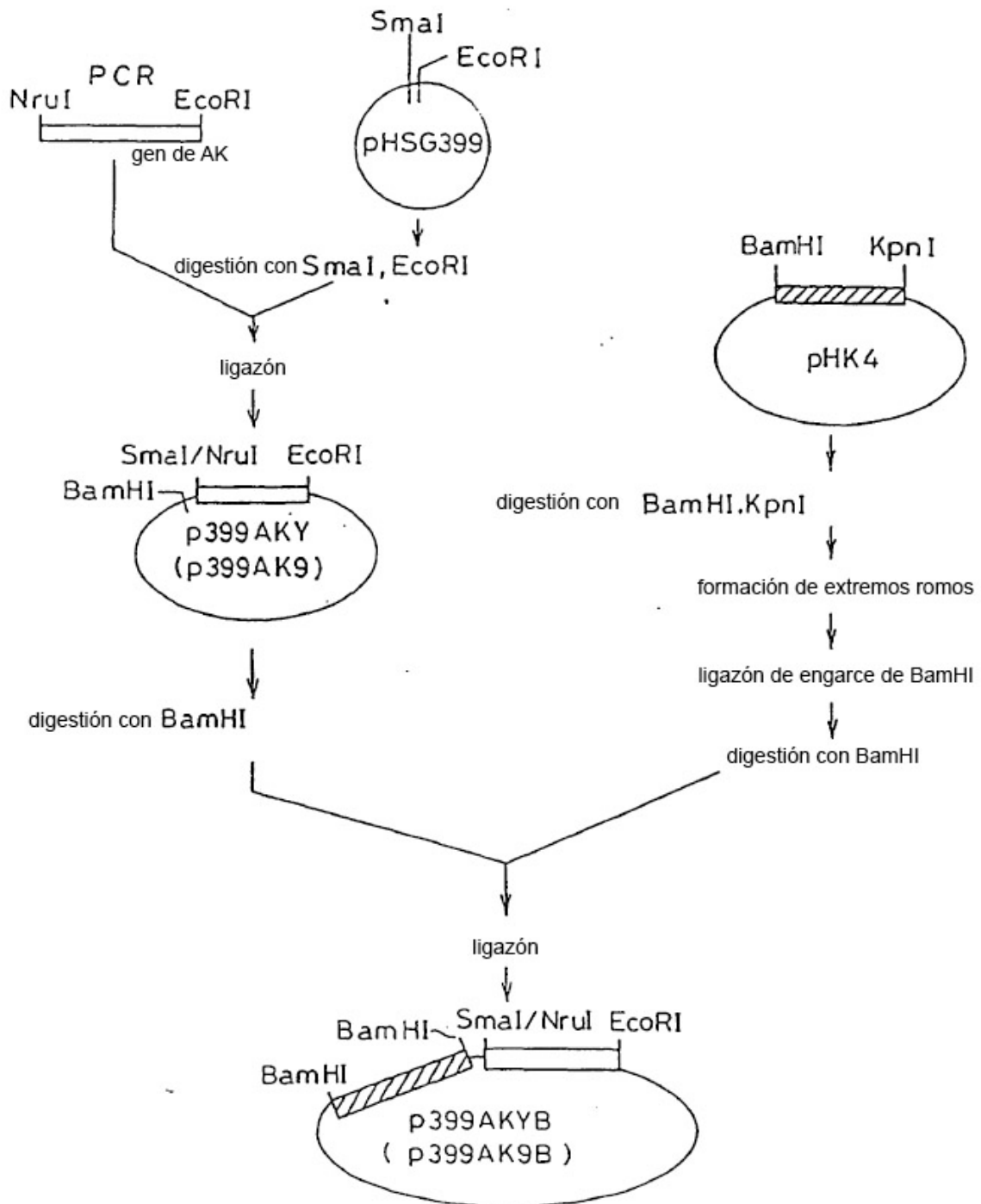


Figura 2

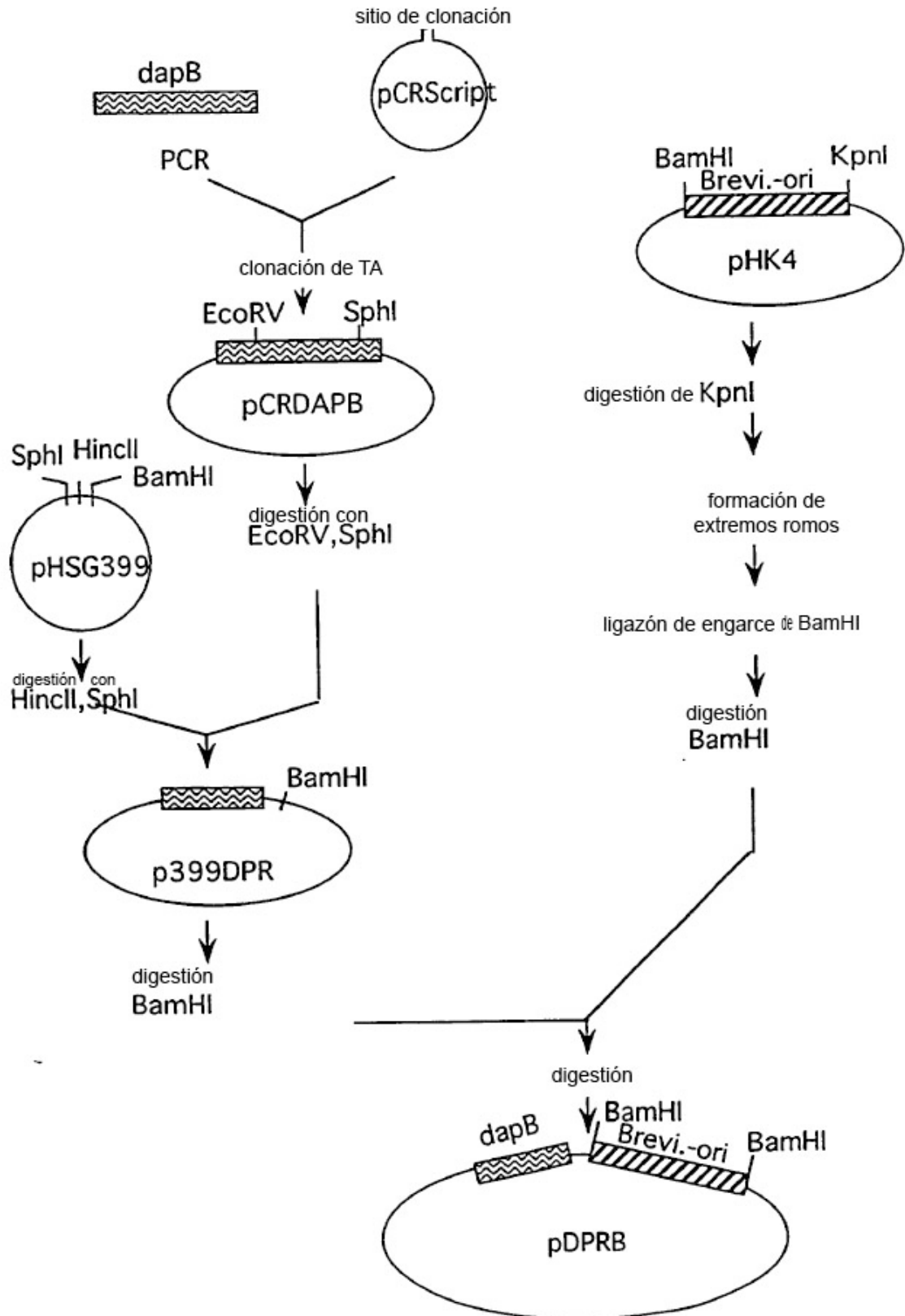


Figura 3

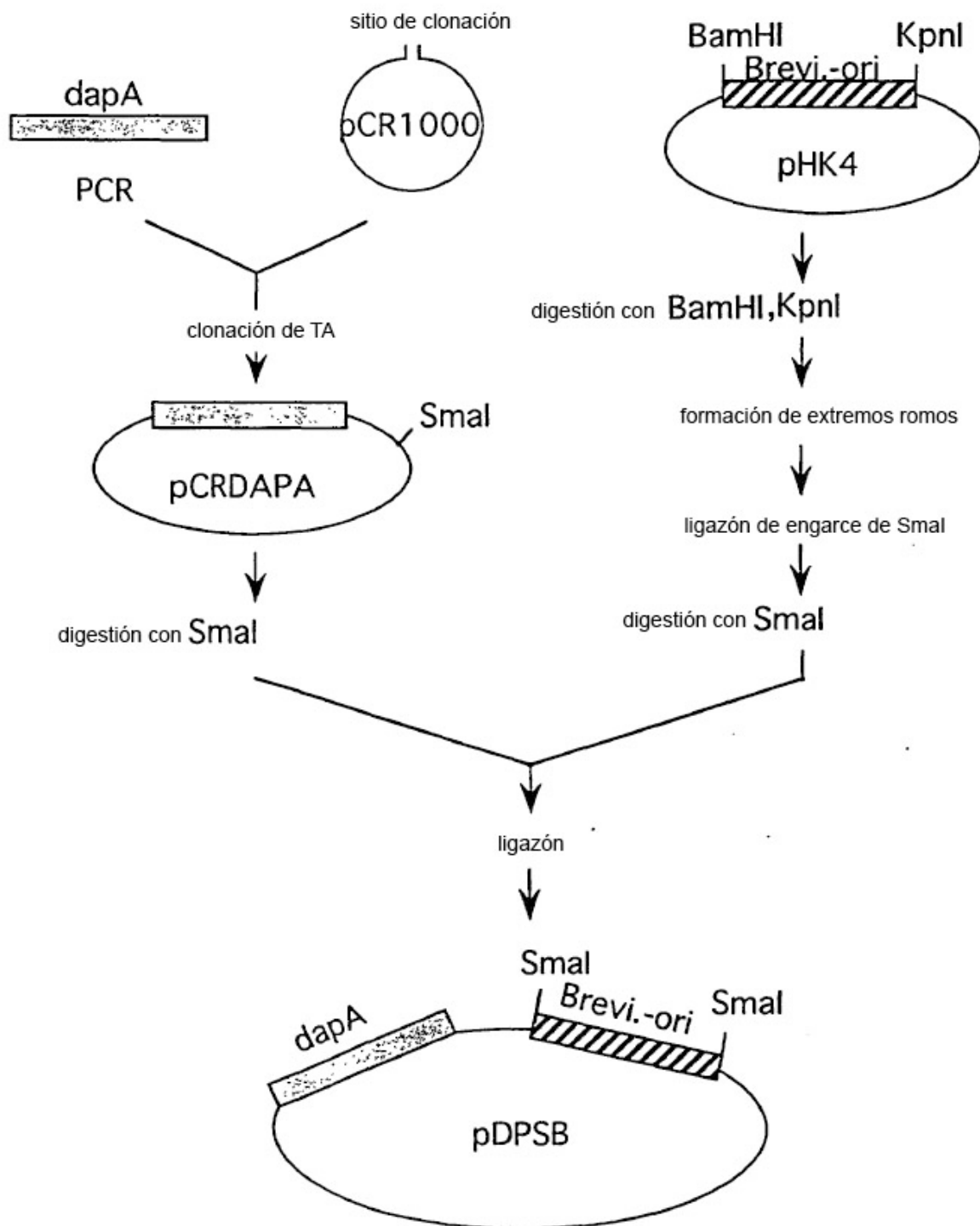


Figura 4

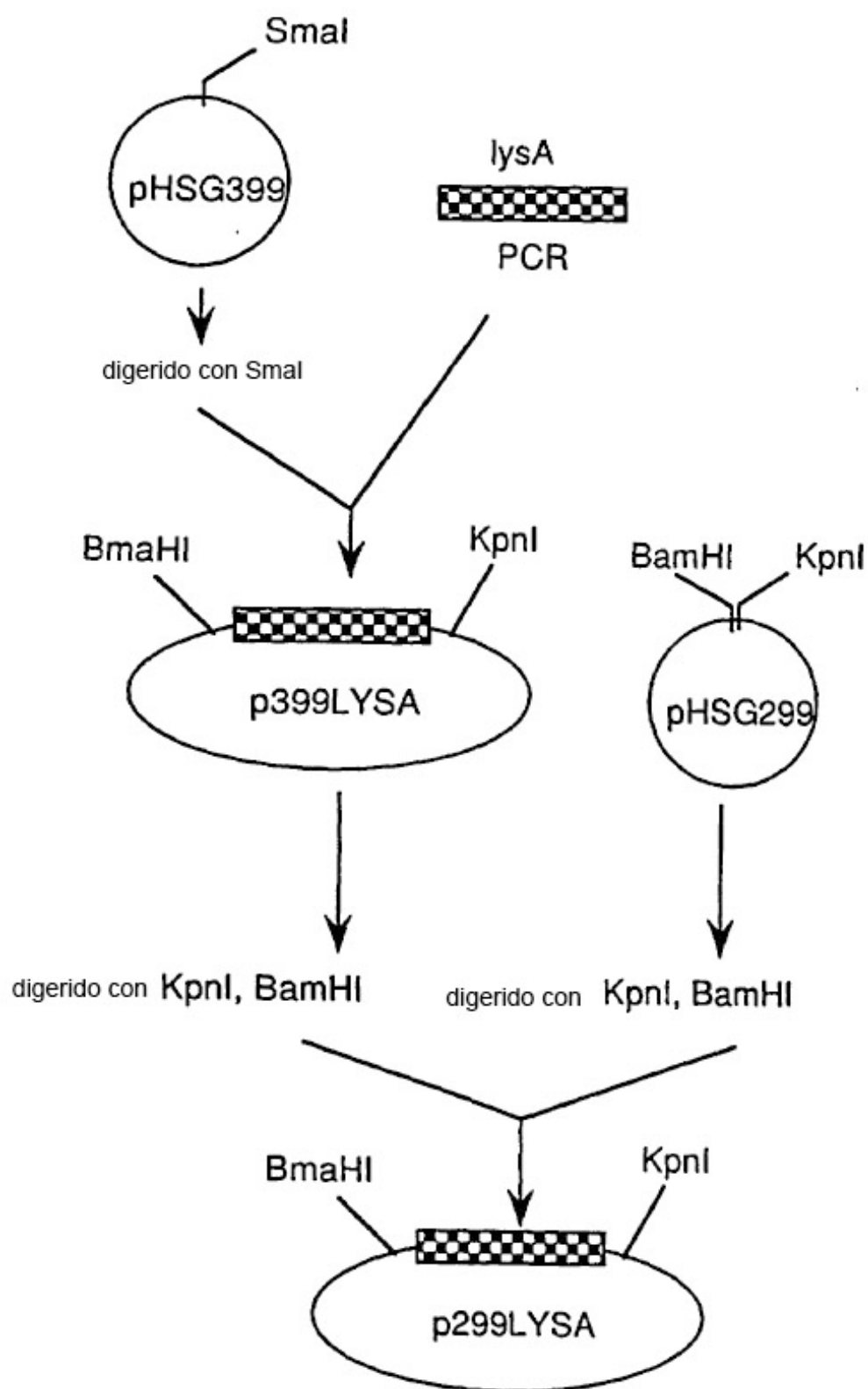


Figura 5

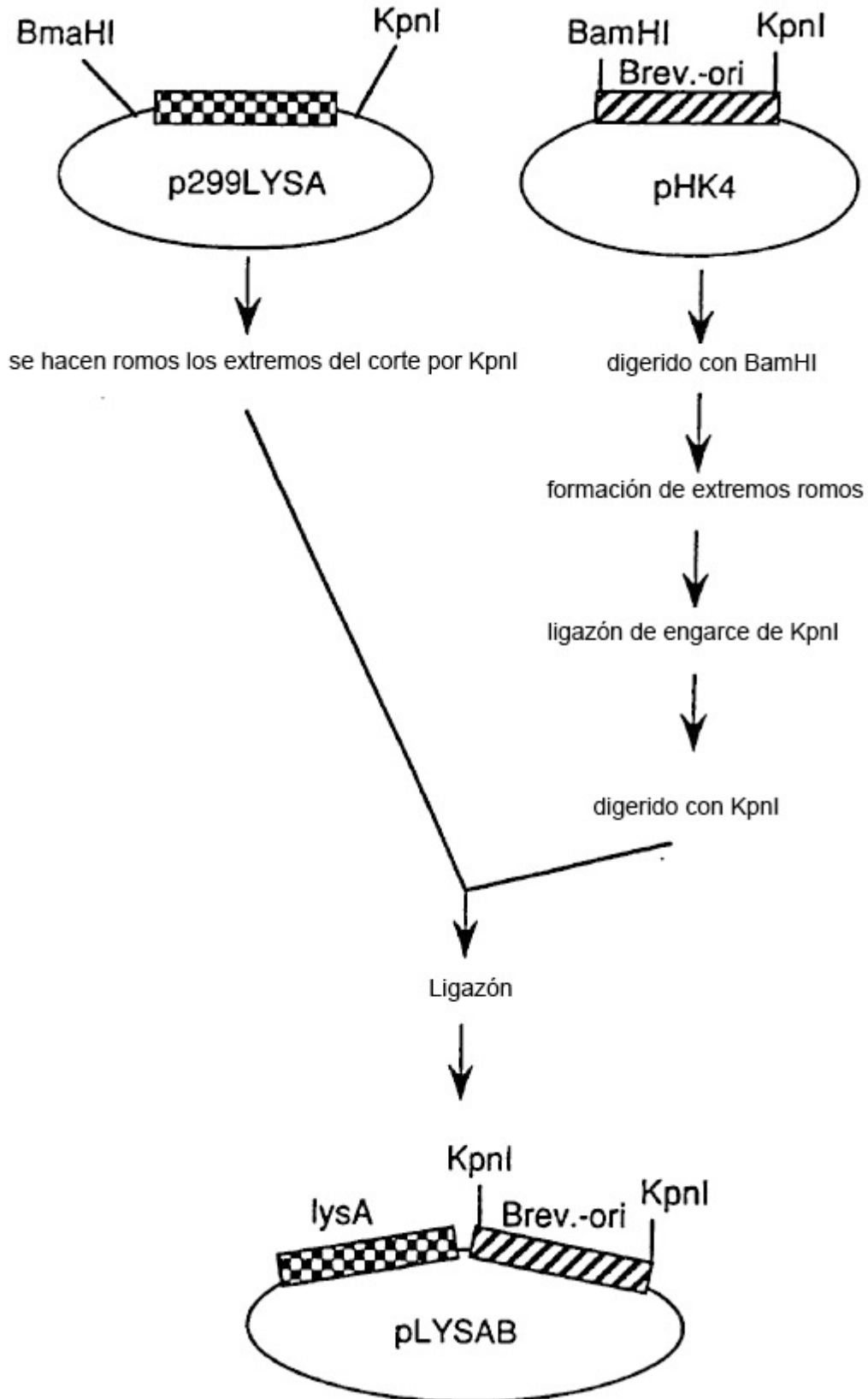


Figura 6

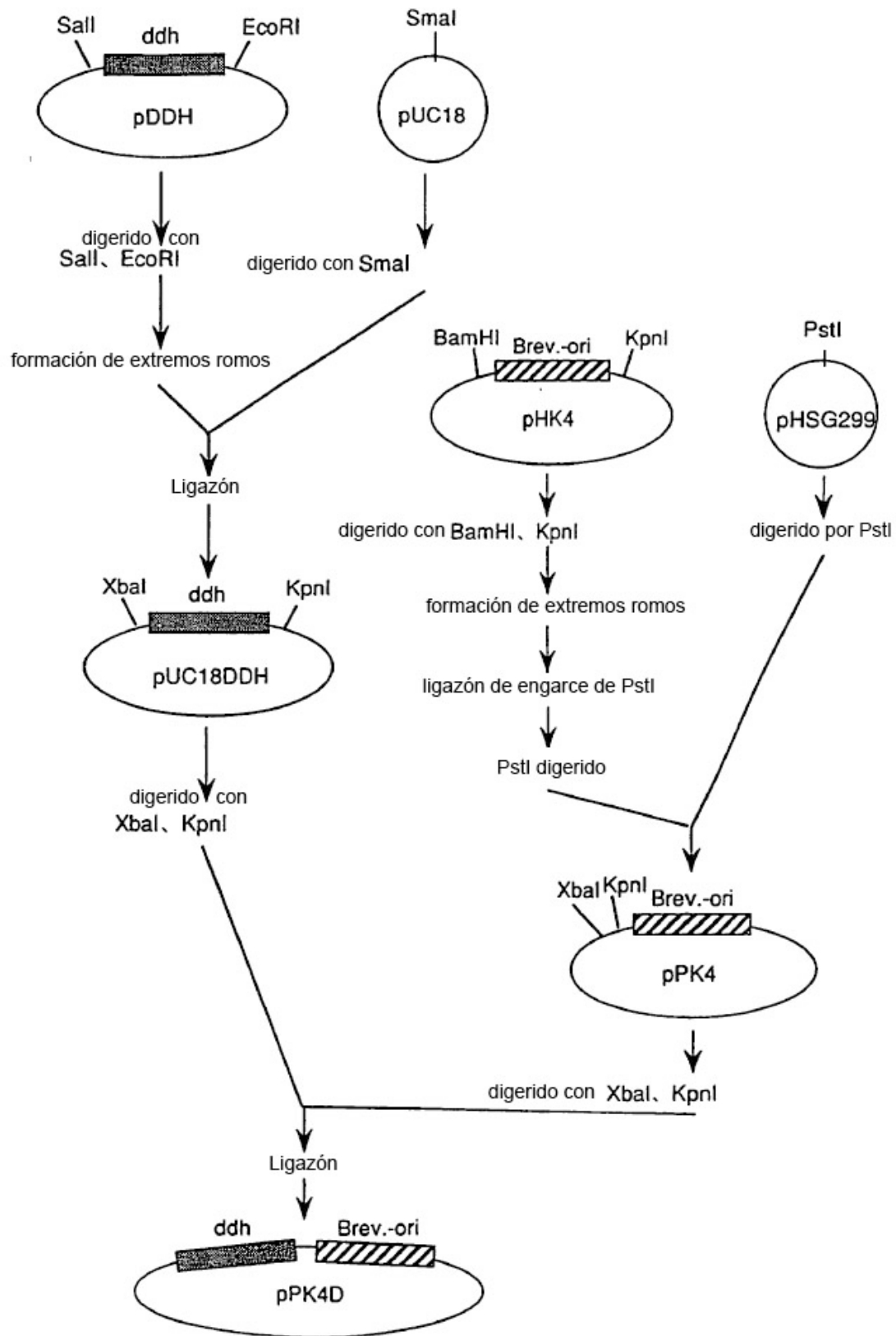


Figura 7

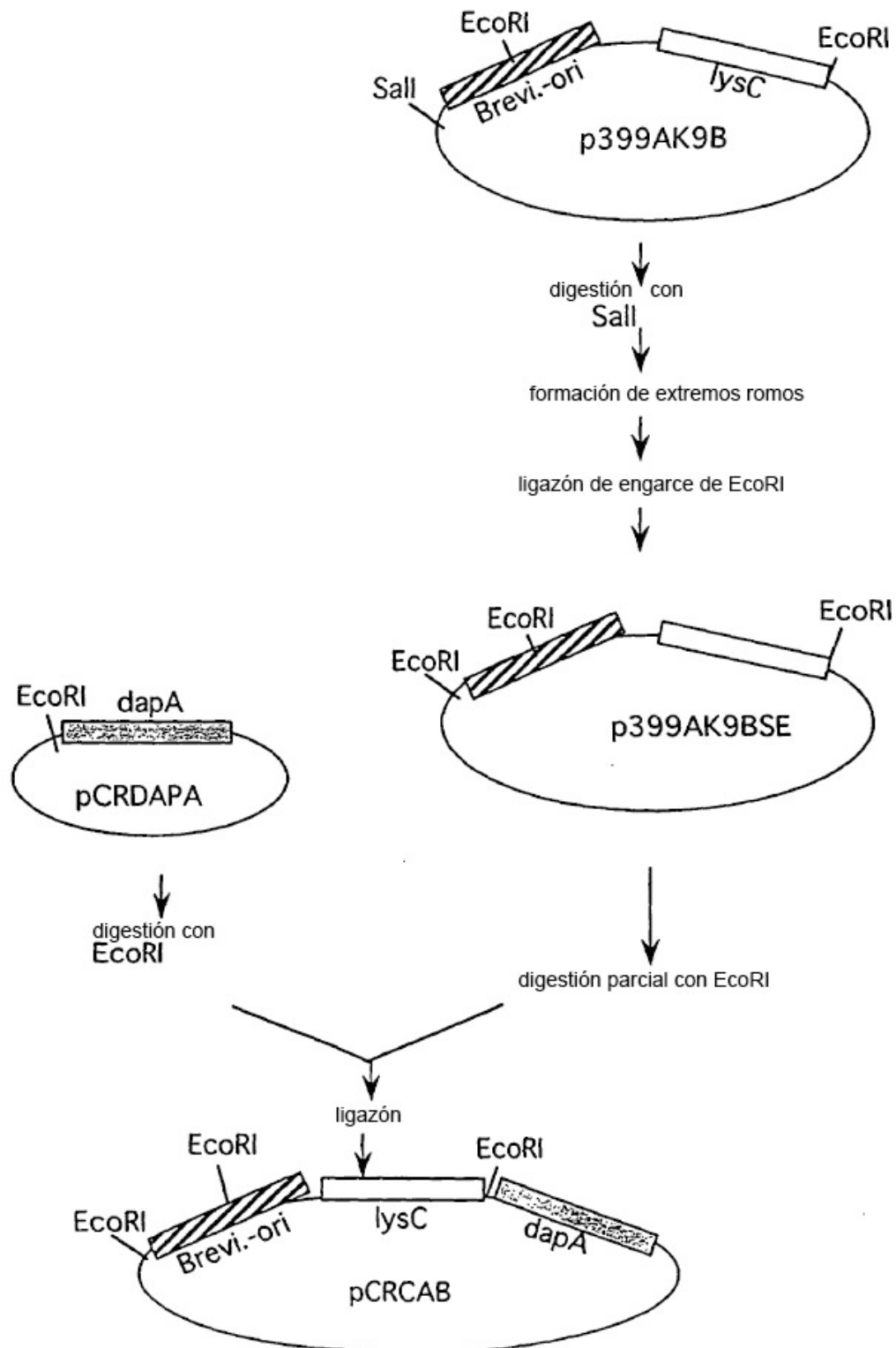


Figura 8

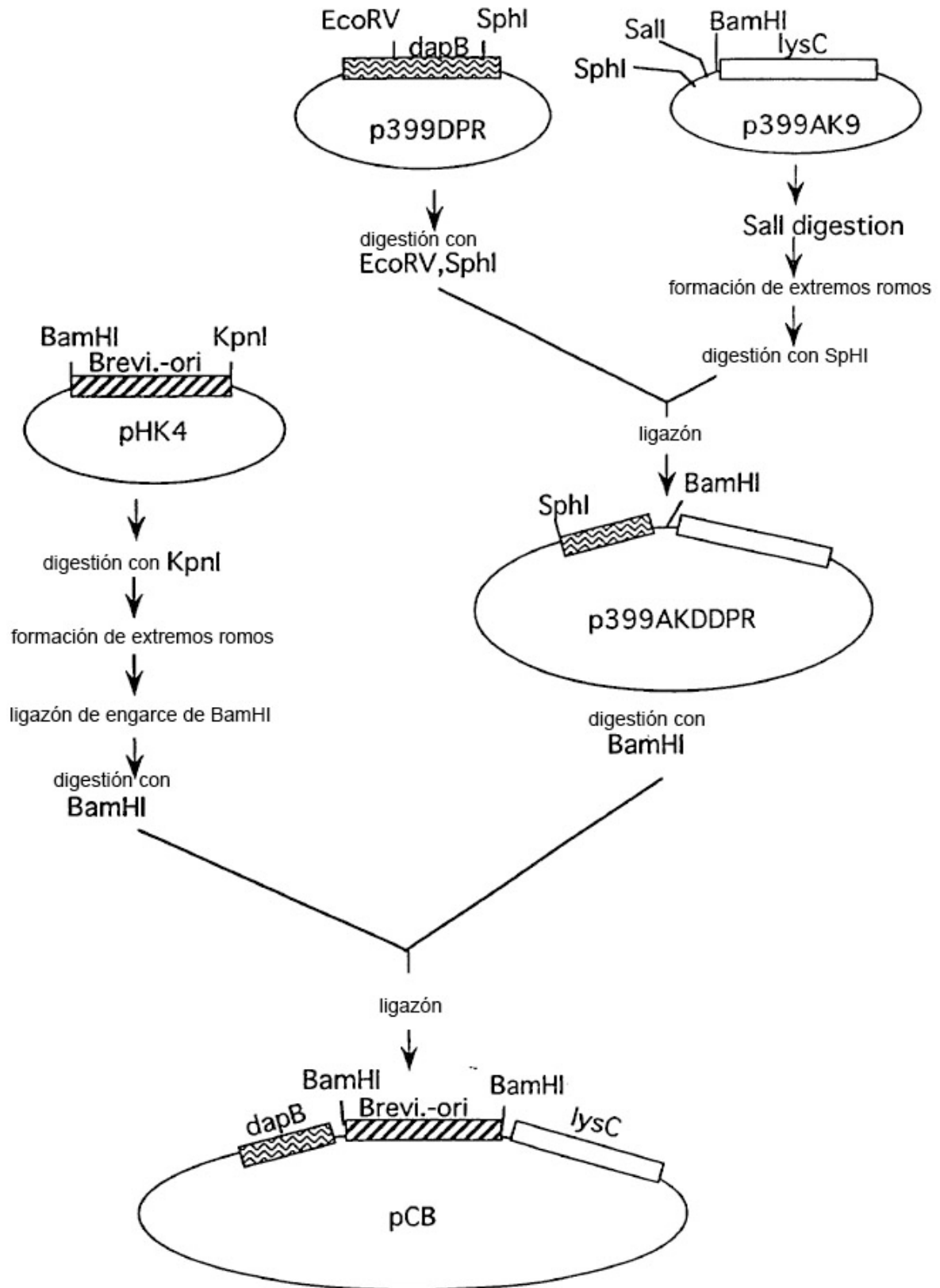


Figura 9

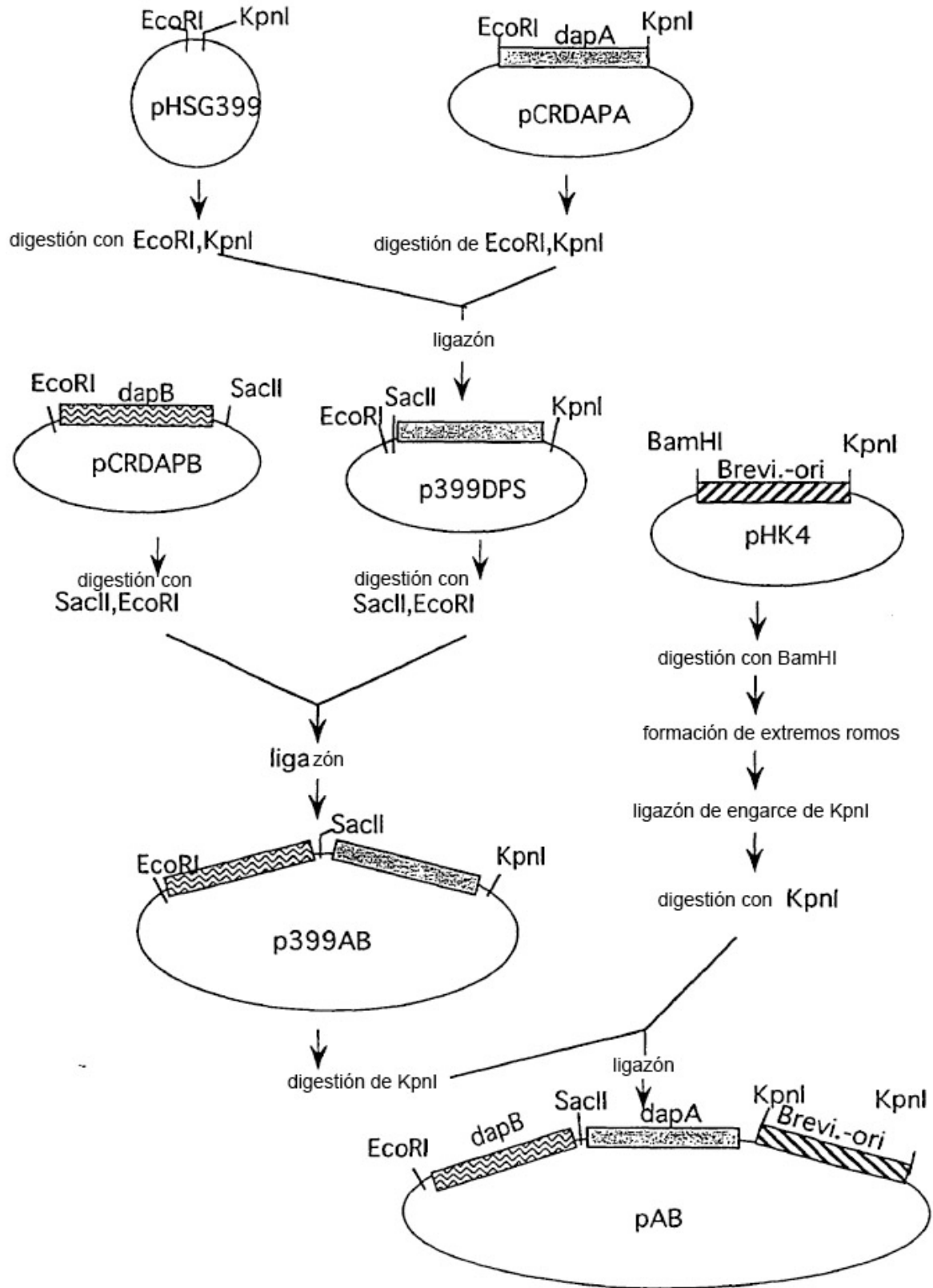


Figura 10

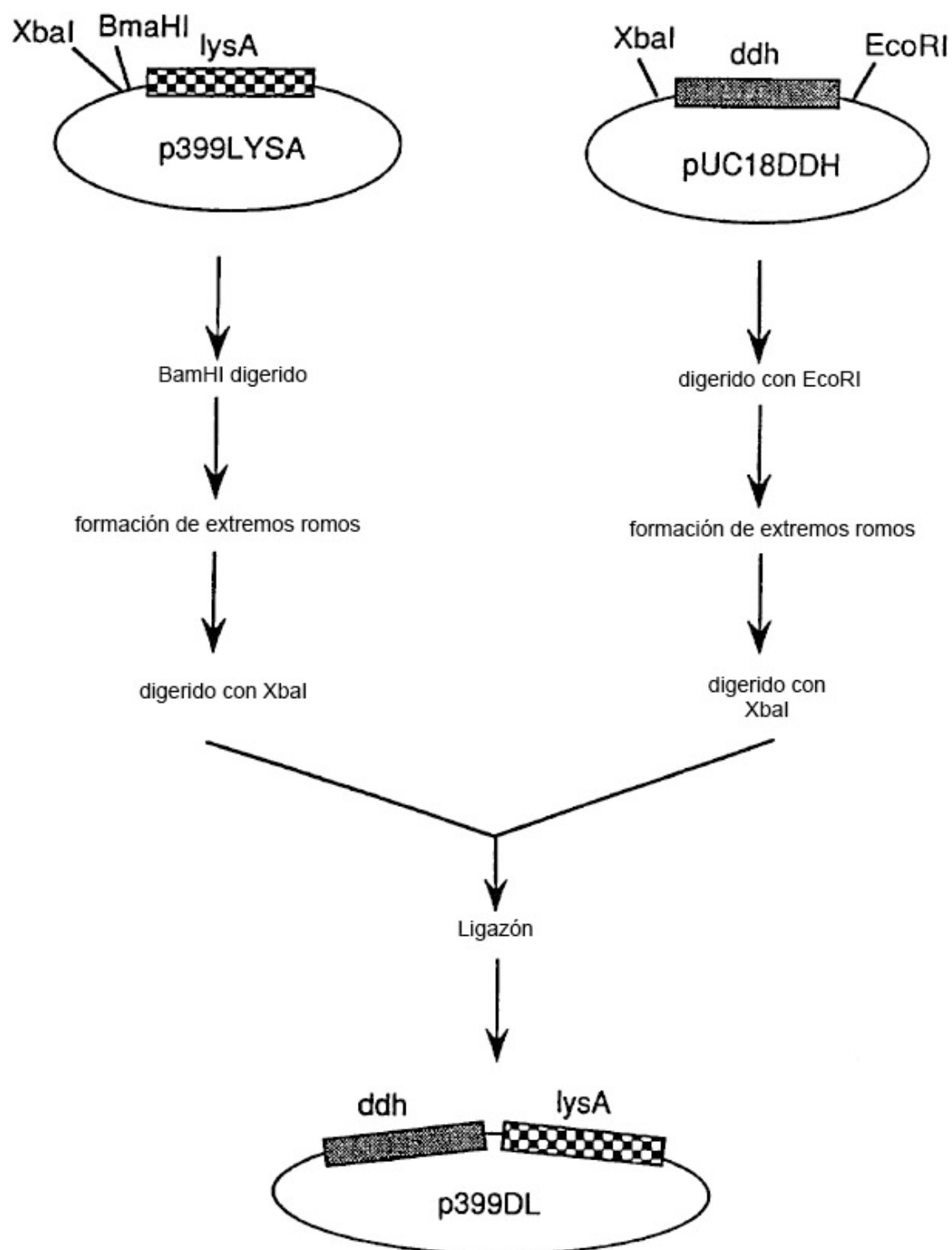


Figura 11

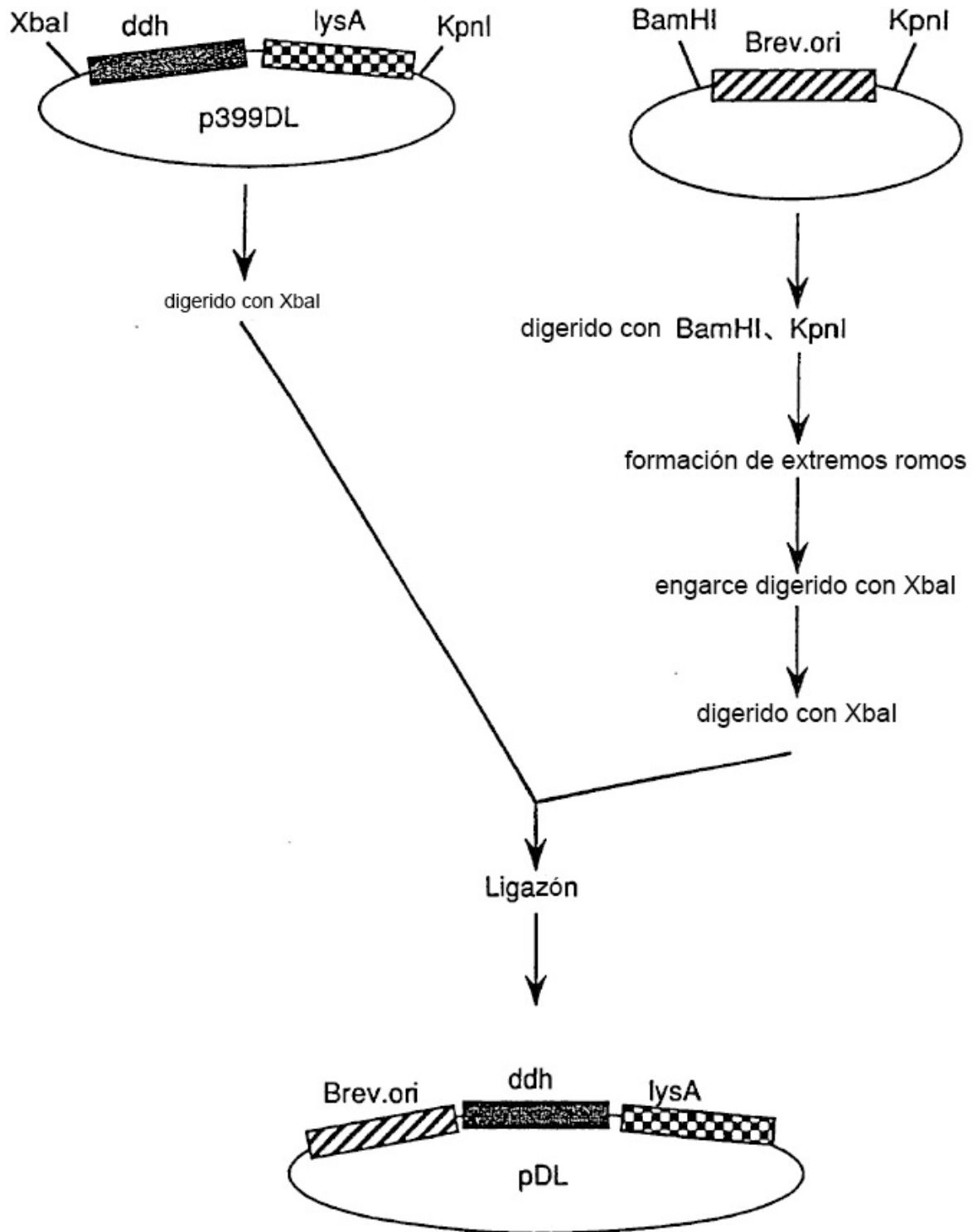


Figura 12

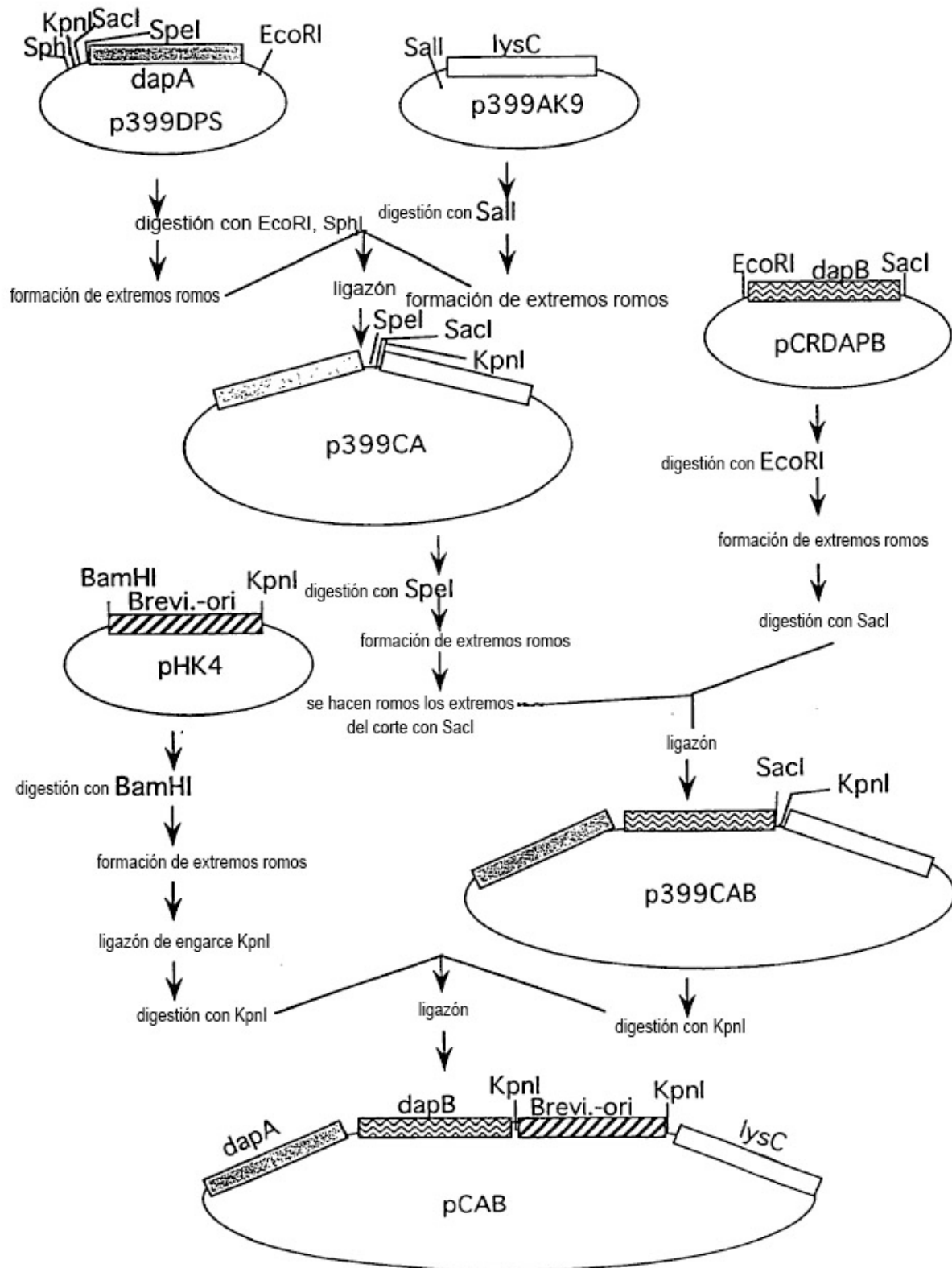


Figura 13

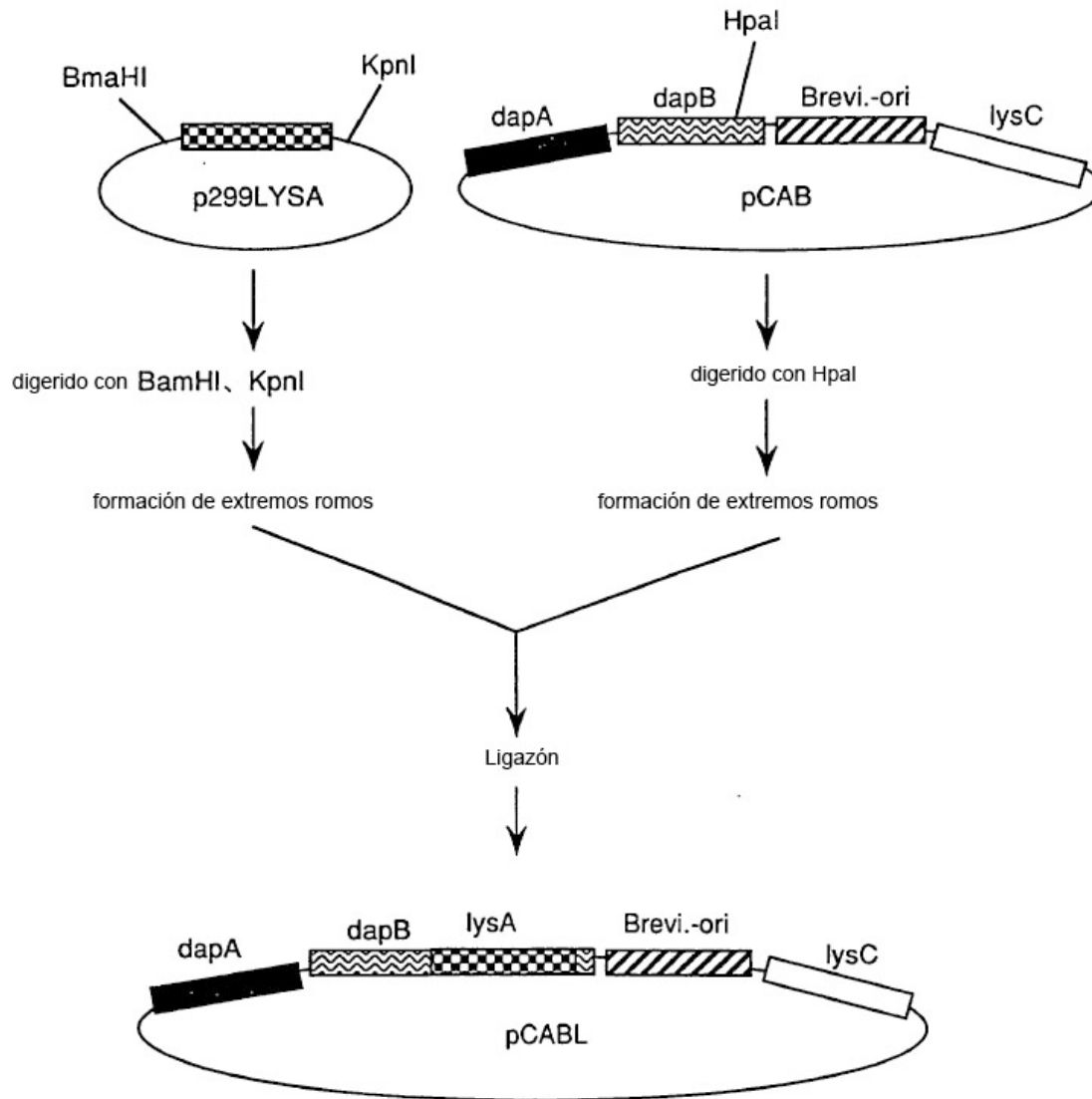


Figura 14

