

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 035**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 14/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07123761 .4**
96 Fecha de presentación: **16.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1942198**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2008**

54 Título: **UNIDADES DE EXPRESIÓN DE P-EF-TS EN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM.**

30 Prioridad:
20.07.2004 DE 102004035065

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.03.2012

73 Titular/es:
BASF SE
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:
Zelder, Oskar;
Klopprogge, Corinna;
Kröger, Burkhard;
Schröder, Hartwig y
Haefner, Stefan

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 376 035 T3

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

DESCRIPCIÓN

Unidades de expresión de P-EF-TS en CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM

La presente invención se refiere a un método para modificar o causar la rata de transcripción de genes y a microorganismos genéticamente modificados con rata de transcripción modificada o causada.

5 Varios productos biosintéticos, como por ejemplo compuestos de química fina tales como, entre otros, aminoácidos, vitaminas, pero también proteínas, se producen mediante procesos metabólicos naturales en células y se usan en muchas ramas de la industria, incluida la industria de productos alimentos, de forrajes y comida para animales, de cosméticos, de piensos y alimentos para humanos y animales, y la industria farmacéutica. Estas sustancias, que se denominan conjuntamente como productos de química fina / proteínas, comprenden, entre otras, ácidos grasos, aminoácidos tanto proteinogénicos como también no proteinogénicos, nucleótidos y nucleósidos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, así como proteínas y enzimas. Su producción se efectúa de la manera más conveniente a gran escala mediante el cultivo de bacterias que se desarrollaron con el fin de producir y secretar grandes cantidades de la sustancia respectivamente deseada. Para este propósito los organismos particularmente adecuados son bacterias corineformes, bacterias gram-positivas no patógenas.

Se conoce que los aminoácidos se producen por fermentación de cepas de bacterias corineformes, principalmente Corynebacterium glutamicum. Debido a la gran importancia, permanentemente se trabaja en el mejoramiento de los procesos de producción. Los mejoramientos de proceso pueden concernir medidas de fermentación industrial como, por ejemplo, agitación y abastecimiento de oxígeno, o la composición de medios nutrientes como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación o el procesamiento para obtener el producto, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico pero también secamiento por pulverización o la propiedades de desempeño intrínsecas del mismo microorganismo.

Desde hace unos años se emplean igualmente métodos de la ingeniería genética de ADN recombinante para el mejoramiento de la cepas que producen productos de química fina / proteínas de la bacteria Corynebacterium, amplificando genes individuales e investigando el efecto sobre la producción de productos de química fina/proteínas.

Otros modos para desarrollar un proceso para la producción de productos de química fina, aminoácidos o proteínas, o para elevar o para mejorar la productividad de un proceso ya existente para la producción de productos de la química fina, aminoácidos o proteínas son elevar o modificar la expresión de uno o varios genes o influir la traducción de un ARNm mediante secuencias adecuadas de polinucleótidos. La influencia en este contexto puede ser la elevación, la disminución o también otros parámetros de la expresión de genes como patrones temporales de expresión.

El experto en la materia conoce los diferentes componentes de las secuencias bacteriana de regulación. Se distinguen los sitios de enlace de reguladores, llamados también operadores, los sitios de enlace de holoenzimas – polimerasa – ARN, llamados también regiones 35 y 10 y el sitio de enlace de ARN -16S ribosómico, llamado también sitios de enlace ribosómicos o secuencia Shine-Dalgarno.

Como secuencia de sitio de enlace ribosómico, también llamado secuencia de Shine-Dalgarno, en el sentido de esta invención se entienden secuencias de polinucleótidos que se anteponen hasta 20 bases antes del inicio del codón de la traducción.

En la bibliografía (E. coli y S. typhimurium, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) se describe que tanto la composición de la secuencia de polinucleótido de la secuencia Shine-Delgarno, la sucesión de secuencia de las bases, pero también la distancia de una secuencia de polinucleótido contenida en la secuencia Shine-Delgarno tiene una influencia esencial en la rata de iniciación de la traducción.

Las secuencias de ácido nucleico con actividad de promotor pueden influir en la formación de ARNm de diferente manera. Los promotores cuya actividad es independiente de la fase de crecimiento fisiológica del organismo se llaman constitutivos. A su vez, otros promotores reaccionan a estímulos químicos y físicos externos como oxígeno, metabolitos, calor, pH, etc. A su vez otros muestran una fuerte dependencia de su actividad en diferentes fases de desarrollo. A manera de ejemplo, en la bibliografía se describen promotores que durante la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos muestran una actividad particularmente pronunciada, pero también exactamente en la fase estacionaria del crecimiento microbiano. Ambas características de los promotores pueden tener una influencia favorable en la productividad para una producción de productos de química fina y proteínas según la vía metabólica.

Por ejemplo, pueden aprovecharse promotores que desconectan la expresión de un gen durante el crecimiento, pero que la conectan después de un crecimiento óptimo con el fin de regular un gen que controla la producción de un

metabolito. La cepa modificada tiene luego los mismos parámetros de crecimiento que la cepa de partida, pero produce más producto por célula. Este tipo de modificación puede aumentar tanto el título (g de producto/litro) como también el rendimiento de C (g de producto/g de fuente de C).

5 En especies de *Corynebacterium* ya han podido aislarse aquellas secuencias de nucleótido que pueden utilizarse para un aumento o un debilitamiento de la expresión génica. Estos promotores regulados pueden reducir la rata con la que se transcribe un gen dependiendo de las condiciones internas y/o externas de la célula. La presencia de un factor determinado, conocido como inductor, puede estimular en parte la rata de la transcripción del promotor. Los inductores pueden afectar directa o indirectamente la transcripción del promotor. Otra clase de factores, conocidos como supresores, está en capacidad de reducir o de inhibir la transcripción del promotor. Tal como los inductores, también los supresores pueden actuar directa o indirectamente. Sin embargo, también se conocen promotores que se regulan por la temperatura. De esta manera, el nivel de transcripción de tales promotores puede aumentarse, o si no debilitarse, por ejemplo elevando la temperatura de crecimiento o mediante la temperatura de crecimiento normal de las células.

15 Hasta hoy se ha descrito una pequeña cantidad de promotores de *C. glutamicum*. El promotor del gen de malato sintasa de *C. glutamicum* se describió en DE 4440118. Este promotor se antepuso a un gen estructural que codifica para una proteína. Después de la transformación de tal constructo en una bacteria corineforme se regula la expresión del gen estructural insertado después del promotor. La expresión del gen estructural se induce tan pronto al medio se adiciona un inductor correspondiente.

20 Reinscheid et al., *Microbiology* 145:503 (1999) han descrito una fusión de transcripción entre el promotor pta-ack de *C. glutamicum* y un gen reportero (cloranfenicol acetiltransferasa). Las células de *C. glutamicum* que tienen una tal fusión de transcripción presentaron una expresión elevada del gen reportero durante el crecimiento en medio que contenía acetato. En comparación con esto, las células transformadas que crecieron en glucosa no mostraron una expresión aumentada de este gen reportero.

25 En Pa'tek et al., *Microbiology* 142:1297 (1996) se describieron algunas secuencias de ADN de *C. glutamicum* que pueden fortalecer la expresión de un gen reportero en células de *C. glutamicum*. Estas secuencias se compararon entre sí para definir secuencias de consenso para promotores de *C. glutamicum*.

30 Otras secuencias de ADN de *C. glutamicum* que pueden utilizarse para la regulación de la expresión de gen se han descrito en la patente WO 02/40679. Estos polinucleótidos aislados representan unidades de expresión de *Corynebakterium glutamicum* que pueden utilizarse o bien para aumentar o sino para disminuir una expresión de gen. Además, en esta patente se describen plásmidos recombinantes sobre los que se asocian unidades de expresión de *Corynebakterium glutamicum* con genes heterólogos. El método descrito aquí, la fusión de un promotor de *Corynebakterium glutamicum* con un gen heterólogo, puede emplearse entre otras para la regulación de los genes de la biosíntesis de aminoácido.

35 El objetivo fundamental de la invención es proporcionar más procesos para modificar o para ocasionar la rata de transcripción de genes en el microorganismo en comparación con el tipo silvestre.

Por consiguiente, se encontró un método para modificar u ocasionar la rata de transcripción de genes en microorganismos en comparación con el tipo silvestre mediante regulación de la transcripción de genes en microorganismos por ácidos nucleicos que tienen actividad de promotor, los cuales contienen

A) la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 o

40 B) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, la cual tiene una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ.ID.NO. 1 o

C) una secuencia de ácido nucleico que se hibrida con la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 en condiciones estrictas,

en cuyo caso los genes son heterólogos con respecto a los ácidos nucleicos que tienen actividad de promotor.

45 De acuerdo con la invención, por "transcripción" se entiende el proceso por el cual a partir de una matriz de ADN se produce una molécula complementaria de ARN. En este proceso intervienen proteínas como la polimerasa de ARN, los llamados factores sigma y las proteínas reguladoras de transcripción. el ARN sintetizado sirve entonces como matriz en el proceso de la traducción que conduce luego a la proteína biosintéticamente activa.

50 La rata de formación con la que se produce una proteína biosintéticamente activa es un producto de la rata de la transcripción y de la traducción. Ambas ratas pueden afectarse de acuerdo con la invención y con esto afectar la rata de formación de productos en un microorganismo.

Por un "promotor" o un "ácido nucleico con actividad de promotor" de acuerdo con la invención se entiende un ácido nucleico que en conexión funcional con un ácido nucleico a transcribir regula la transcripción de este ácido nucleico.

5 Por una "conexión funcional" se entiende en este contexto, por ejemplo, la disposición secuencial de uno de los ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1 y de una secuencia de ácido nucleico a transcribir y, opcionalmente, otros elementos regulatorios como, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico que garantizan la transcripción de ácidos nucleicos, así como, por ejemplo, un terminador de tal modo que cada uno de los elementos regulatorios pueda cumplir su función en la transcripción de la secuencia del ácido nucleico. Para esto no es obligatoriamente necesaria una conexión directa en el sentido químico. Las secuencias genéticas de control como, por ejemplo, secuencias enhancer (intensificadoras), también pueden ejercer su función desde posiciones más alejadas o incluso desde otras moléculas de ADN sobre la secuencia objetivo. Se prefieren disposiciones en las que la secuencia de ácido nucleico a transcribirse se posiciona detrás (es decir en el extremo 3') de la secuencia de promotor de la invención de tal modo que ambas secuencias están enlazadas entre sí de modo covalente. En tal caso se prefiere que la distancia entre la secuencia de promotor y la secuencia de ácido nucleico a expresarse de modo transgénico sea menor que 200 pares de bases, particularmente preferible menor que 100 pares de bases, muy particularmente preferible menor que 50 pares de bases.

Por "actividad de promotor" de acuerdo con la invención se entiende la cantidad de ARN formada por el promotor en un tiempo determinado, es decir la tasa de transcripción.

Por "actividad de promotor específica" se entiende de acuerdo con la invención la cantidad de ARN por promotor, formada por el promotor en un tiempo determinado.

20 Por el concepto "tipo silvestre" de acuerdo con la invención se entiende el organismo de partida correspondiente.

Dependiendo del contexto, por el término "microorganismo" puede entenderse el microorganismo de partida (tipo silvestre) o un microorganismo genéticamente modificado, según la invención, o ambos.

25 Preferentemente y principalmente en los casos en los que el microorganismo o el tipo silvestre no puedan designarse de manera inequívoca, por "tipo silvestre" se entiende respectivamente un organismo de referencia para la modificación o la generación de la actividad de promotor o de la tasa de transcripción y para el aumento del contenido de productos biosintéticos.

En una forma preferida de realización este organismo de referencia es *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

30 En una forma preferida de realización se usan microorganismos de partida que ya están en capacidad de producir los productos deseados de la química fina. Particularmente se prefieren en tal caso, entre los microorganismos particularmente preferidos las bacterias del género y los productos de la química fina particularmente preferidos L-lisina, L-metionina y L-treonina, aquellos microorganismos de partida que ya están en capacidad de producir L-lisina, L-metionina y/o L-treonina. Estas son de manera particularmente preferida corinebacterias en las que, por ejemplo, el gen que codifica una aspartoquinasa (gen ask) está desregulado o la inhibición de retroalimentación (feed-back) se anuló o se redujo. Por ejemplo, tales bacterias tienen en el gen ask una mutación que conduce a una reducción o anulación de la inhibición de retroalimentación, como por ejemplo la mutación T311

En el caso de una "actividad de promotor causada" o tasa de transcripción respecto de un gen, en comparación con el tipo silvestre se causa de esta manera la formación de una ARN que, en comparación con el tipo silvestre, no estaba presente de este modo en el tipo silvestre.

40 En el caso de una actividad de promotor modificada o tasa de transcripción respecto de un gen en comparación con el tipo silvestre se modifica de este modo la cantidad formada de ARN en comparación con el tipo silvestre en un tiempo determinado.

Por "modificada" se entiende preferiblemente en este contexto aumentada o disminuida.

45 Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la actividad de promotor o tasa de transcripción aumentadas, por ejemplo mediante regulación de la transcripción de genes en el microorganismo por ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos que tienen actividad de promotor.

50 La regulación de la transcripción de genes en el microorganismo se logra preferentemente por ácidos nucleicos que tienen actividad de promotor según la reivindicación 1 introduciendo uno o varios ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control del ácido nucleico introducido que tiene actividad de promotor según la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de

- 5 promotor modificada específica, o introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de modo que la transcripción de uno o varios de los genes introducidos bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos que tienen actividad de promotor según la reivindicación 1, opcionalmente actividad de promotor modificada específica, o uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen un ácido nucleico que tiene actividad de promotor según la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, y enlazando funcionalmente al microorganismo uno o varios ácidos nucleicos a transcribirse. La secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 1 representa la secuencia de promotor del factor de elongación TS (PEF-TS) de *Corynebacterium glutamicum*. La SEQ. ID. NO. 1 corresponde a la secuencia de promotor del tipo silvestre.
- 10 Otros ejemplos naturales de promotores según la reivindicación 1 pueden recuperarse fácilmente, por ejemplo, a partir de diferentes organismos cuya secuencia genómica es conocida, mediante comparaciones de identidad de las secuencias de ácido nucleico de bancos de datos con las secuencias descritas previamente SEQ ID NO: 1.
- Las secuencias de promotor sintéticas según la reivindicación 1 pueden recuperarse fácilmente a partir de la secuencia SEQ ID NO: 1 mediante variación y mutación sintética, por ejemplo por sustitución, inserción o delección de nucleótidos.
- 15 Por el término "sustitución" debe entenderse en la descripción el intercambio de uno o varios nucleótidos por uno o varios nucleótidos. "Delección" es el reemplazo de un nucleótido por un enlace directo. Las inserciones son incorporaciones de nucleótidos a la secuencia de ácido nucleico, en cuyo caso formalmente un enlace directo se reemplaza por uno o varios nucleótidos.
- 20 Por identidad entre dos ácidos nucleicos se entiende la identidad de los nucleótidos respectivamente por toda la longitud de ácido nucleico, principalmente la identidad que se calcula mediante comparación con ayuda del programa de ordenador Vector NTI Suite 7.1 Software de la empresa Informax (USA) aplicando el método Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) estableciendo los siguientes parámetros:
- Multiple alignment parameter (parámetro de alineamiento múltiple):
- 25 Gap opening penalty (pena de abertura de brecha) 10
- Gap extension penalty (pena de extensión de brecha) 10
- Gap separation penalty range (rango de pena de separación de brecha) 8
- Gap separation penalty (pena de separación de brecha) off (desconectado)
- % identity for alignment delay (% de identidad para atraso de alineamiento) 40
- 30 Residue specific gaps (brechas específicas de residuo) off (desconectado)
- Hydrophilic residue gap (brecha de residuo hidrofílico) off (desconectado)
- Transition weighing (peso de transición) 0
- Pairwise alignment parameter (parámetros de alineamiento apareado):
- FAST algorithm (algoritmo FAST) on (conectado)
- 35 K-tuplesize (tamaño de tupla-K) 1
- Gap penalty (pena de brecha) 3
- Window size (tamaño de ventana) 5
- Number of best diagonals (número de mejores diagonales) 5
- 40 Por una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 90 % con la secuencia SEQ ID NO: 1 se entiende por consiguiente una secuencia de ácido nucleico que al comparar su secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 1, tiene una identidad de al menos 90 % principalmente según el algoritmo de programación de arriba con el conjunto de parámetros de arriba.

Promotores particularmente preferidos tienen una identidad de 91%, más preferible 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, particularmente preferible 99% con la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 1.

5 Otros ejemplos naturales de promotores pueden encontrarse fácilmente de una manera conocida per se además a partir de las secuencias de ácido nucleico arriba descritas, principalmente a partir de la secuencia SEQ ID NO: 1 de diferentes organismos cuya secuencia genómica no se conoce, mediante técnicas de hibridación.

Los ácidos nucleicos con actividad de promotor que contienen una secuencia de ácido nucleico que hibrida con la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. No. 1 en condiciones estrictas, comprenden al menos 10, más preferible más de 12,15,30,50 o particularmente preferible más de 150 nucleótidos.

10 La hibridación se efectúa según la invención en condiciones estrictas. Tales condiciones de hibridación se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., en: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 o en Current Protocols en Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6:

15 Por condiciones estrictas de hibridación se entienden principalmente: la incubación durante la noche a 42°C en una solución que se compone de formamida al 50 %, 5 x SSC (NaCl de 750 mM, citrato tri-sódico de 75 mM), fosfato de sodio de 50 mM (pH7,6), solución de 5x Denhardt, sulfato de dextrano de 10% y 20 g/ml ADN de esperma de salmón cizallado, desnaturalizado, seguido de lavado del filtro con 0,1x SSC a 65°C.

La SEQ. ID. NO. 1 se ha descrito sin designación de función en la inscripción del banco de genes AP005283.

20 Todos los ácidos nucleicos previamente mencionados que tienen actividad de promotor pueden producirse además de una manera conocida per se mediante síntesis química de las unidades estructurales de nucleótido, como por ejemplo mediante condensación de fragmentos de unidades estructurales de ácido nucleico individuales, complementarios, solapantes de la hélice doble. La síntesis química de oligonucleótidos puede efectuarse de manera conocida, por ejemplo, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2. Edición, Wiley Press New York, páginas 896-897). La adición de polinucleótidos sintéticos y el relleno de los sitios huecos con ayuda del fragmento de Klenow de la polimerasa de ADN y reacciones de ligamiento y procesos de clonación generales se describen en
25 Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Por una unidad de expresión se entiende un ácido nucleico con actividad de expresión, es decir un ácido nucleico que en conexión funcional con un ácido nucleico o gen a expresarse regula la expresión, es decir la transcripción y la traducción de este ácido nucleico o de este gen.

30 Por una "conexión funcional" se entiende en este contexto, por ejemplo, la disposición secuencial de una unidad de expresión y de una secuencia de ácido nucleico a expresarse de manera transgénica y, opcionalmente, de otros elementos regulatorios como, por ejemplo, un terminador de tal manera que cada uno de los elementos regulatorios puede cumplir su función en el caso de la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico. Para esto no es obligatoriamente necesaria una conexión directa en el sentido químico. Las secuencias genéticas de control, como por ejemplo secuencias de enhancer (intensificador), también puede ejercer su función desde posiciones más
35 alejadas o incluso desde otras moléculas de ADN sobre la secuencia objetivo. Se prefieren disposiciones en las que la secuencia de ácido nucleico a expresarse de manera transgénica se posiciona detrás (es decir en el extremo 3') de la secuencia de unidad de expresión, de modo que ambas secuencias se enlazan entre sí de manera covalente. En tal caso se prefiere que la distancia entre la secuencia de unidad de expresión y la secuencia de ácido nucleico a expresarse transgénicamente es de menos de 200 pares de bases, particularmente preferible de menos de 100
40 pares de bases, muy particularmente preferible de menos de 50 pares de bases.

Por "actividad de expresión" se entiende de acuerdo con la invención la cantidad de proteína formada por la unidad de expresión en un tiempo determinado, es decir la tasa de expresión.

Por "actividad de expresión específica" se entiende de acuerdo con la invención la cantidad de proteína formada por unidad de expresión en un tiempo determinado.

45 En el caso de una "actividad de expresión causada" o de la tasa de expresión respecto de un gen en comparación con el tipo silvestre se genera de este modo la formación de una proteína que no estaba presente en el tipo silvestre, en comparación con el tipo silvestre.

50 En el caso de una "actividad de expresión modificada" o de la tasa de expresión respecto de un gen en comparación con el tipo silvestre se modifica la cantidad de proteína formada en un tiempo determinado en comparación con el tipo silvestre.

Por "modificada" en este contexto se entiende preferiblemente aumentada o disminuida.

5 Esto puede efectuarse, por ejemplo, aumentando o disminuyendo la actividad específica de la unidad de expresión endógena, por ejemplo mediante mutación de la unidad de expresión o mediante estimulación o inhibición de la unidad de expresión. Además, la actividad de expresión elevada o la rata de expresión pueden lograrse, por ejemplo, mediante regulación de la expresión de genes en el microorganismo por unidades de expresión o por unidades de expresión que tienen actividad de expresión específica elevada, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión.

10 La regulación de la expresión de genes en el microorganismo se logra preferentemente a través de unidades de expresión o a través de unidades de expresión que tienen actividad de expresión específica elevada, introduciendo al genoma del microorganismo una o varias unidades de expresión de la invención, opcionalmente con actividad de expresión específica modificada, de modo que la expresión de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión introducidas, opcionalmente con actividad de expresión específica, modificada, o introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de tal modo que la expresión de uno o de varios genes introducidos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión endógenas, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, o introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen una unidad de expresión, opcionalmente con actividad de expresión específica modificada y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a expresar.

15 Las unidades de expresión contienen un ácido nucleico previamente descrito con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 1 y adicionalmente conectan funcionalmente una secuencia de ácido nucleico que garantiza la traducción de ácidos ribonucleicos.

20 Esta secuencia de ácido nucleico, que garantiza la traducción de ácidos ribonucleicos, contiene preferentemente la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 42 como sitio de enlace ribosómico.

La unidad de expresión contiene:

- E) la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 o
- 25 F) una secuencia, derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o deleción de nucleótidos, la cual tiene una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO. 2 o
- G) una secuencia de ácido nucleico que hibrida en condiciones estrictas con la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2.

30 La secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 representa la secuencia de ácido nucleico de la unidad de expresión del factor de elongación TS (PEF-TS) de *Corynebacterium glutamicum*. La SEQ. ID.NO. 2 corresponde a la secuencia de la unidad de expresión del tipo silvestre.

Otros ejemplos naturales de unidades de expresión pueden encontrarse fácilmente, por ejemplo, de diferentes organismos cuya secuencia genómica se conoce, mediante comparaciones de identidad de las secuencias de ácido nucleico de bancos de datos con la secuencia SEQ ID NO: 2 previamente descrita.

35 Las secuencias sintéticas de las unidades de expresión puede encontrarse fácilmente a partir de la secuencia SEQ ID NO: 2 mediante variación o mutación sintéticas, por ejemplo mediante sustitución, inserción o deleción de nucleótidos.

40 Por una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 90 % con la secuencia SEQ ID NO: 2 se entiende, por consiguiente, una secuencia de ácido nucleico que al comparar su secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 2, principalmente de acuerdo con el algoritmo de programa de arriba con el conjunto de parámetros de arriba, presenta una identidad de al menos 90 %.

Otros ejemplos naturales de unidades de expresión pueden encontrarse además fácilmente de una manera conocida per se mediante técnicas de hibridación, a partir de las secuencias de ácido nucleico previamente descritas, principalmente a partir de la secuencia SEQ ID NO: 2 de diferentes organismos cuya secuencia genómica no se conoce.

45 Por "hibridar" se entiende la capacidad de un poli- u oligonucleótido en condiciones estrictas de enlazarse a una secuencia casi complementaria mientras que en estas condiciones no tienen lugar enlaces no específicos entre socios no complementarios. Para esto, las secuencias deben ser complementarias preferentemente en 90-100%. La propiedad de las secuencias complementarias de poder enlazarse entre sí se aprovecha, por ejemplo, en la técnica de Norte- o Southern-Blot o en el enlace de cebador en PCR o RT-PCR.

La hibridación se efectúa en condiciones estrictas. Tales condiciones estrictas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., en: *Molecular Cloning (A Laboratory Manual)*, 2. edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, páginas 9.31-9.57 o en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6:

5 Por condiciones estrictas se entienden principalmente:

La incubación por una noche a 42°C en una solución que se compone de formamida de 50 %, 5 x SSC (NaCl de 750 mM, citrato trisódico de 75 mM), fosfato de sodio de 50 mM (pH7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano de 10% y 20 g/ml de ADN de esperma de salmón cizallado, desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros con 0,1x SSC a 65°C.

10 Las secuencias de nucleótidos según la reivindicación 1 hacen posible además la generación de sondas y cebadores que pueden usarse para la identificación y/o clonación de secuencias homólogas en otros tipos de células y microorganismos. Tales sondas o cebadores comprenden habitualmente una región de secuencia de nucleótido que hibrida en condiciones estrictas en por lo menos aproximadamente 12, preferentemente al menos aproximadamente 25, como por ejemplo aproximadamente 40, 50 o 75 nucleótidos sucesivos de una cadena sense (sentido) de una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 1 o de una cadena antisense (antisentido) correspondiente.

También están comprendidas tales secuencias de ácido nucleico que comprenden las llamadas mutaciones mudas o se modifican de manera correspondiente con la utilidad de codón de un organismo de procedencia especial o huésped en comparación con una secuencia mencionada en concreto, al igual que variantes que tienen lugar en la naturaleza, como por ejemplo variantes cortadas o alélicas de las mismas.

20 La secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 puede usarse como unidad de expresión, es decir para la expresión de genes.

La unidad de expresión contiene un ácido nucleico con actividad de promotor según la reivindicación 1 funcionalmente enlazado de manera adicional con una secuencia de ácido nucleico que garantiza la traducción de ácidos ribonucleicos. Las unidades de expresión comprenden uno o varios de los siguientes elementos genéticos: una secuencia menos 10 ("-10"); una secuencia menos 35 ("-35"); un inicio de transcripción, una región enhancer (de intensificador); y una región de operador.

Estos elementos genéticos son preferentemente específicos para las especies de corinebacterias, especialmente para *Corynebacterium glutamicum*.

30 Todas las unidades de expresión previamente mencionadas pueden producirse además de manera conocida per se, mediante síntesis química a partir de unidades estructurales de nucleótidos, como por ejemplo por condensación de fragmentos de unidades estructurales de ácido nucleico complementarias individuales, que se solapan, de la hélice doble. La síntesis química de oligonucleótidos puede efectuarse de manera conocida, por ejemplo, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2. Edición, Wiley Press New York, páginas 896-897). La adición de oligonucleótidos sintéticos y el llenado de sitios vacíos con ayuda de fragmentos Klenow de la polimerasa de ADN y de reacciones de ligamiento, así como métodos generales de clonación, se describen en Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

40 Para las invenciones en esta patente se utilizaron métodos y técnicas que son conocidos para el experto en técnicas microbiológicas y recombinantes de ADN. Los métodos y técnicas para el crecimiento de células bacterianas, la infiltración de moléculas de ADN aisladas a la célula huésped y el aislamiento, la clonación y la secuenciación de moléculas aisladas de ácido nucleico son ejemplo de tales técnicas y métodos. Estos métodos se describen en muchas fuentes bibliográficas estándar: Davis et al., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986); J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer and P. Berg, *Genes & Genomes*, University Science Books, Mill Valley, California (1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Keary, *Molecular Genetics of Escherichia coli*, The Guilford Press, New York, NY (1989).

50 Todas las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se presentan preferiblemente en forma de una molécula aislada de ácido nucleico. Una molécula "aislada" de ácido nucleico se separa de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y puede estar, además, esencialmente libre de

otro material celular o medio de cultivo, si se produce mediante técnicas recombinantes, o libre de de precursores químicos u otros productos químicos, si se sintetiza de manera química.

La invención comprende además las moléculas de ácido nucleico complementarias a las secuencias de nucleótidos concretamente descritas o un segmento de las mismas.

- 5 Los promotores y/o unidades de expresión pueden usarse, por ejemplo, particularmente ventajoso en procesos mejorados para la producción fermentativa de productos biosintéticos, tal como se describe a continuación.

Los promotores y/o unidades de expresión tienen principalmente la ventaja de que se inducen en microorganismos mediante estrés. Mediante control adecuado del proceso de fermentación, esta inducción por estrés puede controlarse de manera dirigida para un incremento de la tasa de expresión/transcripción de los genes deseados.

- 10 Principalmente en la producción de L-lisina se alcanza muy temprano esta fase de estrés, de tal modo que puede lograrse muy temprano aquí una tasa de expresión/transcripción de genes deseados.

Los ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1 pueden usarse para modificar, es decir para aumentar o reducir o para causar la tasa de transcripción de genes en microorganismos en comparación con el tipo silvestre.

- 15 Las unidades de expresión pueden usarse para modificar, es decir para aumentar o reducir, o para causar la tasa de expresión de genes en microorganismos en comparación con el tipo silvestre.

Además, los ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1 y las unidades de expresión para la regulación y el fortalecimiento de la formación de diferentes productos biosintéticos como, por ejemplo, productos de química fina, proteínas, principalmente aminoácidos, en microorganismos, principalmente en especies de *Corynebacterium*.

- 20

La modificación o generación de la tasa de transcripción de genes en microorganismos en comparación con el tipo silvestre se efectúa regulando la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad de promotor

A) la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 o

- 25 B) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que tiene una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ.ID.NO. 1 o

C) una secuencia de ácido nucleico que hibrida con la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 en condiciones estrictas,

en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos que tienen actividad de promotor.

- 30 Esto se logra preferiblemente

b1) introduciendo uno o varios ácidos nucleicos que tienen actividad de promotor según la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, al genoma del microorganismo de tal modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúe bajo el control del ácido nucleico introducido que tiene actividad de promotor, o

- 35 b2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de tal modo que la transcripción de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos que tienen actividad de promotor según la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, o

- 40 b3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen un ácido nucleico con actividad de promotor según la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribir.

De esta manera es posible modificar la tasa de transcripción de un gen endógeno del tipo silvestre, es decir aumentarla o reducirla de acuerdo con la forma de realización b1) introduciendo al genoma del microorganismo uno o varios ácidos nucleicos que tienen actividad de promotor, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, de tal modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúe bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad de promotor o

- 45

según la forma de realización b2) introduciendo uno o varios genes endógenos al genoma del microorganismo, de tal modo que la transcripción de uno o varios de los genes endógenos introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad de promotor, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, o

- 5 Según la forma de realización b3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen un ácido nucleico con actividad de promotor, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, y enlazando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos endógenos a transcribir.

Además, también es posible causar la tasa de transcripción de un gen exógeno en comparación con el tipo silvestre

- 10 Según la forma de realización b2) introduciendo uno o varios genes exógenos al genoma del microorganismo, de tal modo que la transcripción de uno o varios de los genes exógenos introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad de promotor, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, o

- 15 Según la forma de realización b3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico, que contienen un ácido nucleico con actividad de promotor, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, y enlazando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos exógenos a transcribir.

La inserción de genes según la forma de realización b2) puede efectuarse en tal caso de tal manera que el gen se integra en regiones codificantes o en regiones no codificantes. La inserción se efectúa preferentemente en regiones no codificantes.

- 20 La inserción de constructos de ácido nucleico según la forma de realización b3) puede efectuarse en tal caso de modo cromosómico o extracromosómico. La inserción se efectúa de los constructos de ácido nucleico se efectúa preferentemente de modo cromosómico. Una integración "cromosomática" es la inserción de un fragmento de ADN exógeno al cromosoma de una célula huésped. Este término también se utiliza para la recombinación homóloga entre un fragmento de ADN exógeno y la región correspondiente en el cromosoma de la célula huésped.

- 25 Por "endógeno" se entienden informaciones genéticas como, por ejemplo, genes que ya están contenidos en el genoma de tipo silvestre.

Por "exógeno" se entienden informaciones genéticas como, por ejemplo, genes que no están contenidos en el genoma de tipo silvestre.

- 30 Por el término "genes" respecto de la regulación de la transcripción mediante los ácidos nucleicos con actividad de promotor se entienden preferentemente ácidos nucleicos que contienen una región a transcribir, es decir por ejemplo una región que regula la traducción, una región codificante y opcionalmente otros elementos de regulación como, por ejemplo, un terminador.

Por el término "genes" respecto de la regulación, descrita a continuación, de la expresión mediante las unidades de expresión se entienden preferentemente ácidos nucleicos que contienen una región codificante así como opcionalmente otros elementos de regulación, como por ejemplo un terminador.

- 35 Por una "región codificante" se entiende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína.

Por "heterólogo" respecto de ácidos nucleicos con actividad de promotor y genes se entiende que los genes usados en el tipo silvestre no se transcriben bajo regulación de los ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1 sino que se genera una nueva conexión funcional que no existe en el tipo silvestre y la combinación funcional de ácido nucleico con actividad de promotor y el gen específico no tiene lugar en el tipo silvestre.

- 40 Por "heterólogo" con respecto de las unidades de expresión y los genes se entiende que los genes usados en el tipo silvestre no se expresan bajo regulación de las unidades de expresión previamente mencionadas sino que se genera una nueva conexión funcional que no tiene lugar en el tipo silvestre y la combinación funcional de la unidad de expresión y el gen específico no tiene lugar en el tipo silvestre.

- 45 La invención se refiere en una forma preferida de realización además a un proceso para elevar o causar la tasa de transcripción de genes en microorganismos en comparación con el tipo silvestre regulando la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad de promotor

A) la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 o

B) una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ.ID.NO. 1 o

C) una secuencia de ácido nucleico que hibrida con la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 en condiciones estrictas, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad de promotor.

5 La modificación o la generación de la rata de expresión de un gen en microorganismos puede efectuarse en comparación con el tipo silvestre mediante regulación de la expresión de genes en el microorganismo mediante las unidades de expresión previamente mencionadas, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión.

10 La modificación o la generación de la rata de expresión de genes en microorganismos en comparación con el tipo silvestre pueden efectuarse regulando la expresión de genes en el microorganismo mediante unidades de expresión. En cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión.

Esto se logra preferiblemente

15 d1) introduciendo al genoma una o varias unidades de expresión, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, de modo que la expresión de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión introducidas o

d2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de modo que la expresión de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión endógenas, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, o

20 d3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen una unidad de expresión, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a expresar.

De esta manera es posible modificar la rata de expresión de un gen endógeno del tipo silvestre, es decir aumentarla o disminuirla,

25 según la forma de realización d1), introduciendo una o varias unidades de expresión, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, al genoma del microorganismo de modo que la expresión de uno o varios genes endógenos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión introducidas o

según la forma de realización d2), introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de tal modo que a expresión de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión endógenas, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, o

30 según la forma de realización d3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen una unidad de expresión, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a expresar.

De esta manera también es posible causar la rata de la expresión de un gen exógeno en comparación con el tipo silvestre

35 según la forma de realización d2) introduciendo uno o varios genes exógenos al genoma del microorganismo de tal modo que la expresión de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión endógenas, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, o

40 según la forma de realización d3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen una unidad de expresión, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos exógenos a expresar.

La inserción de genes según la forma de realización d2) puede efectuarse en tal caso de tal manera que el gen se integra a las regiones codificantes o a las regiones no codificantes. La inserción se efectúa preferentemente a las regiones no codificantes.

45 La inserción de constructos de ácido nucleico según la forma de realización d3) puede efectuarse en tal caso de modo cromosómico o extracromosómico. La inserción de los constructos de ácido nucleico se efectúa preferentemente de modo cromosómico.

Los constructos de ácido nucleico también se denominan en lo sucesivo casetes de expresión.

La elevación o la causa de la rata de expresión de un gen en microorganismos en comparación con el tipo silvestre pueden efectuarse

5 ch) elevando la actividad de expresión específica en el microorganismo de unidades de expresión endógenas que regulan la expresión de los genes endógenos en comparación con el tipo silvestre o

dh) regulando la expresión de genes en el microorganismo mediante las unidades de expresión de la invención, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión.

La regulación de la expresión de genes en el microorganismo se logra preferentemente mediante unidades de expresión

10 dh1) introduciendo al genoma del microorganismo una o varias unidades de expresión, opcionalmente con actividad de expresión elevada específica A, de tal modo que la expresión de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión introducidas, opcionalmente con actividad de expresión elevada específica, o

15 dh2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo, de tal modo que la expresión de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión endógenas, opcionalmente con actividad de expresión elevada específica, o

dh3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen una unidad de expresión, opcionalmente con actividad de expresión elevada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a expresar.

20 En una forma preferida de realización del proceso de la invención previamente descrito para modificar o causar la rata de transcripción de genes en microorganismos, los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de productos de la química fina, en cuyo caso los genes pueden contener opcionalmente otros elementos de regulación.

25 En una forma particularmente preferida del proceso de la invención previamente descrita para la modificación o la causa de la rata de transcripción de genes en microorganismos los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dioles, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos orgánicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas, en cuyo caso los genes pueden contener opcionalmente otros elementos de regulación.

35 En una forma particularmente preferida las proteínas de la vía de biosíntesis de aminoácidos se seleccionan del grupo de aspartatoquinasa, aspartato-semialdehído-dehidrogenasa, diaminopimelato-dehidrogenasa, diaminopimelato-decarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato-reductasa, glicerinaldehído-3-fosfat-dehidrogenasa, 3-fosfoglicerato-quinasa, piruvato-carboxilasa, triosefosfato-isomerasa, regulador de transcripción LuxR, regulador de transcripción LysR1, regulador de transcripción LysR2, malato-quinona-oxidoreductasa, glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa, 6-fosfogluconato-dehidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, homoserin-O-acetiltransferasa, cistahionina-gamma-sintasa, cistationina-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metileno-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserina-dehidrogenasa, homoserina-quinasa, treonina-sintasa, soporte exportador de treonina, treonina-dehidratasa, piruvato-oxidasa, exportador de lisina, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, metionina-sintasa dependiente de coenzima B12, actividad de metionina-sintasa dependiente de coenzima B12, sulfatadeniltransferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina-sulfit-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3-fosfoglicerato dehidrogenasa, regulador RXA00655, regulador RXN2910, arginil-ARN-t-sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína de eflujo de treonina, serina-hidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, proteína de la reducción de sulfato RXA077, proteína de la reducción de sulfato RXA248, proteína de la reducción de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructoquinasa y 6-fosfofructoquinasa.

Proteínas preferidas y ácidos nucleicos que codifican estas proteínas de las proteínas descritas previamente de la vía de biosíntesis de aminoácidos son secuencias de proteína o secuencias de ácido nucleico de origen microbiano,

preferentemente de bacterias del género *Corynebacterium* o *Brevibacterium*, preferiblemente de bacterias corineformes, particularmente preferible de *Corynebacterium glutamicum*.

Ejemplos de secuencias de proteína particularmente preferidas y las secuencias de ácido nucleico correspondientes que codifican estas proteínas de la vía de biosíntesis de aminoácidos, cuyo documento de referencia y su denominación en el documento de referencia se listan en la tabla 1:

5

Tabla 1

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. en el documento de referencia
Aspartato-quinasa	ask o lysC	EP1108790	DNA: 281 Proteína: 3781
Aspartato-semialdehído-dehidrogenasa	asd	EP1108790	DNA: 331 Proteína: 3831
Dihidrodipicolinato-sintetasa	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Proteína: 56
Dihidrodipicolinato-reductasa	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Proteína: 36
Meso-diaminopimelato-D-dehidrogenasa	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Proteína : 6944
Diaminopicolinato-decarboxilasa	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.:6951
Exportador de lisina	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Arginil-ARN-t sintetasa	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Glicerinaldehído-3-fosfato-Dehidrogenasa	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Fosfoglicerato-quinasa	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Piruvato-carboxilasa	pycA	EP1108790	DNA 765 Prot.: 4265
Triosa-fosfato-isomerasa	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
Biotina-ligasa	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
PEP-carboxilasa	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Homoserina quinasa	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Treonina sintasa	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Exportador soporte de treonina	thrE	WO 0251231	DNA: 41 Prot.: 42
Proteína de eflujo de treonina	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Treonina deshidratasa	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homoserina-O-acetiltransferasa	metA	EP 1108790	DNA:727 Prot: 4227
Cistationina-gamma-sintasa	metB	EP 1108790	DNA:3491 Prot: 6991
Cistationina-beta-liasa	metC	EP 1108790	DNA:2535 Prot: 6035
Metionina-sintasa dependiente de coenzima B12	metH	EP 1108790	DNA:1663 Prot: 5163
O-Acetilhomoserina-sulfhidrilasa	metY	EP 1108790	DNA:726 Prot: 4226

ES 2 376 035 T3

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. en el documento de referencia
Metilentetrahidrofolato-reductasa	metF	EP 1108790	DNA:2379 Prot: 5879
D-3-Fosfoglicerato-dehidrogenasa	serA	EP 1108790	DNA:1415 Prot: 4915
Fosfoserina-fosfatasa 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.:154
Fosfoserina-fosfatasa 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot: 3967
Fosfoserina-fosfatasa 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot.: 3834
Fosfoserina-aminotransferasa	serC	WO 0100843	DNA: 151 Prot.: 152
Serina acetil-transferasa	cysE	WO 0100843	DNA: 243 Prot.: 244
Cisteína-sintasa I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 Prot.: 6317
Cisteína sintasa II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 Prot.: 5838
Homoserina-dehidrogenasa	hom	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Metionina-sintasa independiente de coenzima B12	metE	WO 0100843	DNA:755 Prot.: 756
Serina-Hidroximetiltransferasa	gliA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Proteína en reducción de sulfato	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Proteína en reducción de sulfato	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadeniltransferasa Subunidad 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadeniltransferasa Subunidad 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Fosfoadenosina fosfosulfato reductasa Ferredoxina-sulfito-reductasa	CysH RXA073	WO 02729029 WO 0100842	DNA: 7 Prot.: 8 DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxina NADP reductasa	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Regulador de transcripción LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Proteína: 298
Regulador de transcripción LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Proteína: 4176
Regulador de transcripción LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Proteína: 6728
Regulador de transcripción LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Proteína: 5700
Malato-quinona-oxodoreductasa	mqq	WO 0100844	DNA: 569 Proteína: 570
Transcetolasa	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolasa	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
1-Fosfofructoquinasa 1	pfk1	WO0100844	DNA: 55 Proteína: 56
1-Fosfofructoquinasa 2	pfk2	WO0100844	DNA: 57 Proteína: 58
6-Fosfofructoquinasa 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. en el documento de referencia
			Proteína: 4883
6-Fosfofructoquinasa 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Proteína: 2
Fructosa-1,6-bisfosfatasa 1	fbr1	EP1108790	DNA:1136 Proteína: 4636
Piruvato oxidasa	poxB	WO 0100844	DNA : 85 Proteína: 86
Regulador RXA00655	RXA655	US2003162267 .2	DNA: 1 Prot.: 2
Regulador RXN02910	RXN2910	US2003162267 .2	DNA: 5 Prot.: 6
6-fosfogluconolactonasa	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2

5 Otro ejemplo de una secuencia de proteína particularmente preferida y la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica esta proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos, es la secuencia de la fructosa-1,6-bisfosfatasa 2, o llamada también fbr2, (SEQ. ID. NO.20) y la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica una fructosa-1,6-bisfosfatasa 2 (SEQ. ID. NO.19).

Otro ejemplo de una secuencia de proteína particularmente preferida y la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica esta proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos, es la secuencia de la proteína en reducción de sulfato o llamada también RXA077, (SEQ. ID. NO. 3) y la secuencia de ácido nucleico correspondiente que codifica una proteína en la reducción de sulfato (SEQ. ID. NO. 4)

10 Otras secuencias de proteína particularmente preferidas de la vía de biosíntesis de aminoácidos tienen respectivamente la secuencia de aminoácidos indicada en la Tabla 1 para esta proteína, en cuyo caso la proteína respectiva en al menos una de las posiciones de aminoácido indicadas en la Tabla 2/ columna 2 para esta secuencia de aminoácido tiene respectivamente un aminoácido proteínogénico diferente del respectivo aminoácido indicado en la Tabla 2/columna 3 en el mismo renglón. En otra forma preferida de realización, las proteínas tienen en al menos
15 una de las posiciones de aminoácido indicadas en la Tabla 2/columna 2 para la secuencia de aminoácido el aminoácido indicado en la Tabla 2/columna 4 en el mismo renglón. Las proteínas indicadas en la Tabla 2 son proteínas mutadas de la vía de biosíntesis de aminoácidos que tienen propiedades particularmente ventajosas y por esto son principalmente adecuadas para la expresión de los ácidos nucleicos correspondientes mediante el promotor de la invención y para la preparación de aminoácidos. Por ejemplo, la mutación T3111 conduce a una eliminación de
20 la retroalimentación (feedback) de ask.

Los ácidos nucleicos correspondientes que codifican una proteína mutada previamente descrita de la tabla 2 pueden producirse mediante procesos usuales.

25 Como punto de partida para la preparación de las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína mutada es adecuado, por ejemplo, el genoma de una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que puede obtenerse de la American Type Culture Collection bajo la denominación ATCC 13032 o las secuencias de ácido nucleico referidas en la Tabla 1. Para la retro-traducción de la secuencia de aminoácido de las proteínas mutadas a las secuencias de ácido nucleico que codifican estas proteínas es ventajoso usar el codon usage del organismo al cual debe introducirse la secuencia de ácido nucleico o en el cual se encuentra presente la secuencia de ácido nucleico. Por
30 ejemplo, es ventajoso para *Corynebacterium glutamicum* usar el codon usage (utilización de codón) de *Corynebacterium glutamicum*. La utilización de codón (codon usage) del respectivo microorganismo puede averiguarse de manera conocida de los bancos de datos o de las solicitudes de patente que describen al menos una proteína y un gen, que codifica esta proteína, del organismo deseado.

Los datos de la Tabla 2 han de ser entendidos de la siguiente manera:

En la columna 1 "Identificación" representa una denominación unívoca para cada secuencia respecto de la Tabla 1.

35 En la columna 2 "AS-POS" se refiere al número respectivo en la posición de aminoácido de la correspondiente secuencia de polipéptido de la Tabla 1. Un "26" en la columna "AS-POS" significa por lo tanto la posición de aminoácido 26 de la secuencia de polipéptido indicada de manera correspondiente. La numeración de la posición inicia en +1 la terminación N.

ES 2 376 035 T3

En la columna 3 "AS - tipo silvestre" la letra respectiva designa el aminoácido – representado en el código de una letra – en la posición indicada en la columna 2 en la cepa de tipo silvestre correspondiente de la secuencia de la Tabla 1.

5 En la columna 4 "AS-mutante" la letra respectiva designa el aminoácido – representado en el código de una letra - en la posición indicada en la columna 2 en la cepa mutante correspondiente.

En la columna 5 "Función" representa la función fisiológica de la secuencia de polipéptido correspondiente.

10 Para una proteína mutada con una función determinada (columna 5) y una determinada secuencia de aminoácido de partida (Tabla 1) en las columnas 2, 3 y 4 se describe al menos una mutación, en algunas secuencias también se describen varias mutaciones. Estas varias mutaciones se refieren siempre a la secuencia de aminoácido de partida más próxima, que se encuentra arriba respectivamente (Tabla 1). Por el concepto "al menos una de las posiciones de aminoácido" de una determinada secuencia de aminoácidos se entiende preferentemente al menos una de las mutaciones descritas para esta secuencia de aminoácidos en la columna 2, 3 y 4.

Código de una letra de los aminoácidos proteinogénicos:

	A	Alanina
15	C	Cisteína
	D	Aspartato
	E	Glutamato
	F	Fenilalanina
	G	Glicina
20	H	Histidina
	I	Isoleucina
	K	Lisina
	L	Leucina
	M	Metionina
25	N	Asparagina
	P	Prolina
	Q	Glutamina
	R	Arginina
	S	Serina
30	T	Treonina
	V	Valina
	W	Triptofano
	Y	Tirosina

Tabla 2

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
Identificación	AS Posición	AS Tipo silvestre	AS Mutante	Función
ask	317	S	A	Aspartato-quinasa
	311	T	I	
	279	A	T	
asd	66	D	G	Aspartato-semialdehído-dehidrogenasa
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihidrodipicolinato sintetasa
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihidrodipicolinato-reductasa
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-diaminopimelato-D-dehidrogenasa
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinato-decarboxilasa
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginil-ARN- t-sintetasa
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa
	150	T	A	
	321 1	G	S	
gap	264	G	S	Glicerinaldehído-3-fosfato-dehidrogenasa
pycA	7	S	L	Piruvato-carboxilasa
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	
	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxilasa
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserina quinasa
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Treonina sintasa

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Proteína de eflujo de treonina
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserina-Dehidrogenasa
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	regulador de transcripción LysR1
lysR3	142	R	W	regulador de transcripción LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transquetolasa
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolasa
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartato-1-Decarboxilasa
	33	G	S	6- Fosfogluconolactonasa

- 5 En el método de la invención descrito previamente para modificar o causar la rata de transcripción de genes en microorganismos, así como en los métodos descritos a continuación para producir microorganismos modificados genéticamente, en los microorganismos modificados genéticamente descritos a continuación y en los métodos descritos a continuación para la producción de productos biosintéticos, la introducción de los ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1, de las unidades de expresión, de los genes descritos previamente y de los constructos de ácido nucleico o casetes de expresión descritos previamente al microorganismo, principalmente en bacterias corinefomes, se efectúa preferentemente mediante el método SacB.
- 10 El método SacB es conocido por el experto en la materia y se describe, por ejemplo, en Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul 22; 145(1):69-73 y Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57.
- 15 En una forma preferida de realización del método de la invención descrito previamente, la modificación o la causa de la rata de transcripción de genes en microorganismos ocurre introduciendo ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1 o unidades de expresión en el microorganismo.
- 20 En otra forma preferida de realización del método de la invención previamente descrito la modificación o la causa de la rata de transcripción de genes en microorganismos se efectúa introduciendo los constructos de ácido nucleico o casetes de expresión previamente descritos en el microorganismo.
- 25 Los vectores son bien conocidos para el experto en la materia y pueden inferirse, por ejemplo, de "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., editores, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985). Por vectores, además de plásmidos también han de entenderse todos los otros vectores conocidos para el experto en la materia, como por ejemplo fagos, transposons, elementos IS, fasmídeos, cosmídeos, y ADN lineal o circular. Esos vectores pueden replicarse de manera autónoma den el organismo huésped o replicarse de manera cromosómica.

5 Como plásmidos son adecuados de manera particularmente preferida aquellos que se replican en bacterias corineformes. Numerosos vectores de plásmido conocidos como, por ejemplo, pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) o pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Otros vectores de plásmido como, por ejemplo, pCLiK5MCS, o aquellos que se basan en pCG4 (US-A 4,489,160) o pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66,119-124 (1990)) o pAG1 (US-A 5,158,891), pueden usarse de igual manera.

10 Además, también son adecuados aquellos vectores de plásmido con ayuda de los cuales puede aplicarse el proceso de la amplificación de gen por integración al cromosoma, tal como fue descrito por Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)) para la duplicación o amplificación del operon hom-thrB. En este método se clona el gen a un vector de plásmido que puede replicar en un huésped (de manera típica E. coli), pero no en C. glutamicum. Como vectores vienen al caso, por ejemplo, pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1,784-791 (1983)), pK18mob o pK19mob (Schäfer et al., Gene 145,69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) o pBGS8 (Spratt et al., 15 1986, Gene 41: 337-342). El vector de plásmido que contiene el gen a amplificar se transfiere a continuación a la cepa deseada de C. Glutamicum mediante transformación. Se describen métodos para la transformación, por ejemplo, en Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican y Shivnan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) y Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123,343-347 (1994)).

20 La invención también se refiere a un microorganismo genéticamente modificado, en cuyo caso la modificación genética conduce a la modificación o causa de la rata de transcripción de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre y depende de

La regulación de la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 7, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad de promotor.

25 Tal como se ha descrito previamente en el caso de los métodos, la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo se logra mediante ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 7

30 b1) introduciendo uno o varios ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad de promotor según la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, o

b2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de modo que la transcripción de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad de promotor según la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, o

35 b3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen un ácido nucleico con actividad de promotor según la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribir.

40 La invención se refiere además a un microorganismo genéticamente modificado con rata de transcripción aumentada o causada de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre, en cuyo caso la transcripción de genes en el microorganismo se regula mediante ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 7, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad de promotor.

Tal como se describió previamente en el caso de los métodos, la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo se logra mediante ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 7

45 bh1) introduciendo al genoma del microorganismo uno o varios ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor elevada específica, de tal modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúe bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad de promotor, opcionalmente con actividad de promotor elevada específica, o

bh2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de tal modo que la transcripción de uno o de varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad de promotor según la reivindicación 7, opcionalmente con elevada específica actividad de promotor, o

50 bh3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen un ácido nucleico con actividad de promotor según la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor elevada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribir.

Microorganismos genéticamente modificados también pueden contener modificaciones genéticas que conducen a una modificación o causa de la rata de expresión de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre y dependen de la regulación de la expresión de genes en el microorganismo mediante unidades de expresión), en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión.

5 Tal como se describió previamente en el caso de los métodos, la regulación de la expresión de genes en el microorganismo se logra mediante unidades de expresión

d1) introduciendo al genoma del microorganismo una o varias unidades de expresión opcionalmente con actividad de expresión modificada específica de tal modo que la expresión de uno o varios genes endógenos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión introducidas, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, o

d2) introduciendo al genoma del microorganismo uno o varios genes de tal modo que la expresión de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión endógenas, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica o

15 d3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen una unidad de expresión, opcionalmente con actividad de expresión modificada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a expresar.

De manera particularmente preferida, la presente invención se refiere a microorganismos genéticamente modificados, principalmente a bacterias corineformes que contienen un vector, principalmente un vector de péndulo o vector de plásmido el cual tiene al menos un constructo recombinante de ácido nucleico según la definición de la invención.

En una forma preferida de realización de los microorganismos genéticamente modificados, los genes descritos previamente son al menos un ácido nucleico que codifica una proteína de la vía de biosíntesis de productos de la química fina.

En una forma particularmente preferida de los microorganismos genéticamente modificados, los genes descritos previamente se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos nucleicos proteínogénicos y no proteínogénicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dióles, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas, en cuyo caso los genes pueden contener opcionalmente otros elementos de regulación.

35 Las proteínas preferidas de la vía de biosíntesis de aminoácidos se seleccionan del grupo de aspartato-quinasa, aspartato-semialdehído-dehidrogenasa, diaminopimelato-dehidrogenasa, diaminopimelato-decarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato-reductasa, glicerinoaldehído-3-fosfato-dehidrogenasa, 3-fosfoglicerato-quinasa, piruvato-carboxilasa, triosa-fosfato-isomerasa, regulador de transcripción LuxR, regulador de transcripción LisR1, regulador de transcripción LisR2, malato-quinona-oxidoreductasa, glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa, 6-fosfogluconato-dehidrogenasa, transquetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahionina-gamma-sintasa, cistahionina-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metilen-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserina-dehidrogenasa, homoserina-quinasa, treonina-sintasa, soporte exportador de treonina, treonina-dehidratasa, piruvato-oxidasa, exportador de lisina, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, metionina – sintasa dependiente de coenzima B12, actividad de metionina – sintasa dependiente de coenzima B12, sulfato-adenil-transferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina-sulfito-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3-fosfoglicerato dehidrogenasa, regulador RXA00655, regulador RXN2910, arginil-ARN-t - sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína de eflujo de treonina, serinhidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, proteína de la sulfato-reducción RXA077, proteína de la sulfato-reducción RXA248, proteína de la sulfato-reducción RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructoquinasa y 6-fosfofructoquinasa.

Ejemplos particularmente preferidos de las proteínas y genes de la vía de biosíntesis de aminoácidos se describen previamente en la Tabla 1 y Tabla 2.

Microorganismos preferidos o microorganismos genéticamente modificados son bacterias, algas, hongos levaduras.

Microorganismos particularmente preferidos son principalmente bacterias corineformes.

5 Bacterias corineformes preferidas son bacterias del género *Corynebacterium*, principalmente de las variedades *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* y *Corynebacterium efficiens* o del género *Brevibacterium*, principalmente de las variedades *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* y *Brevibacterium divaricatum*.

10 Bacterias particularmente preferidas de los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* se seleccionan del grupo *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium efficiens* DSM 44548, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 y *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

15 La abreviatura KFCC significa Korean Federation of Culture Collection, la abreviatura ATCC significa la American type strain culture collection, la abreviatura DSM significa die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (la Colección Alemana de Microorganismos).

Otras bacterias particularmente preferidas de los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* se listan en la

Tabla 3:

Bacteria		Número de depósito							
Género	Especie	ATCC	FER	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	21054							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	19350							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	19351							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	19352							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	19353							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	19354							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	19355							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	19356							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	21055							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	21077							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	21553							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	21580							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	39101							
<i>Brevibacterium</i>	<i>butanicum</i>	21196							
<i>Brevibacterium</i>	<i>divaricatum</i>	21792	P928						
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21474							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21129							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21518							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>			B11474					
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>			B11472					
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21127							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21128							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21427							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21475							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21517							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21528							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21529							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>			B11477					
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>			B11478					
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>	21127							
<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>			B11474					
<i>Brevibacterium</i>	<i>healii</i>	15527							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ketoglutamicum</i>	21004							
<i>Brevibacterium</i>	<i>ketoglutamicum</i>	21089							

ES 2 376 035 T3

Bacteria		Número de depósito							
Género	Especie	ATCC	FER	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ketosoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.7 3		
Brevibacterium	spec.						717.7 3		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicu	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniagenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniagenes	15511							
Corynebacterium	fujikense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							
Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							

ES 2 376 035 T3

Bacteria		Número de depósito							
Género	Especie	ATCC	FER	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							
Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							

ES 2 376 035 T3

Bacteria		Número de depósito							
Género	Especie	ATCC	FER	NRRL	CEC T	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			812418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Las abreviaturas tienen el siguiente significado:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japón

5 NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, Londres, UK

10 DSMZ: Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares), Brunswick, Alemania

Mediante los ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1 es posible con ayuda de los métodos previamente descritos regular en los microorganismos genéticamente modificados descritos previamente las vías metabólicas hacia productos biosintéticos específicos.

15 Para esto se refuerzan, por ejemplo, las vías metabólicas que conducen hacia un producto biosintético específico causando o elevando la tasa de transcripción o la tasa de expresión de genes de esta vía biosintética en la que la cantidad aumentada de proteína conduce a una actividad total elevada se estas proteínas de la vía de biosíntesis deseada y con esto a un flujo metabólico reforzado hacia un producto biosintético deseado.

Además, las vías metabólicas que divergen de un producto biosintético específico pueden disminuirse reduciendo la tasa de transcripción o tasa de expresión de genes de esta vía biosintética divergente en la cual una cantidad reducida de proteína conduce a una actividad total reducida de estas proteínas de la vía biosintética indeseada y, con esto, adicionalmente a un flujo metabólico indeseado en la dirección de un producto biosintético deseado.

- 5 Los microorganismos genéticamente modificados de la invención son capaces de producir productos biosintéticos a partir de, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melasa, almidón, celulosa o glicerina y etanol.

De acuerdo con el producto biosintético deseado la tasa de transcripción de diferentes genes puede elevarse o reducirse. Por lo regular es ventajoso modificar la tasa de transcripción de varios genes, es decir elevar la tasa de transcripción de una combinación de genes y/o reducir la tasa de transcripción de de una combinación de genes.

- 10 En los microorganismos genéticamente modificados de la invención, al menos una tasa de transcripción modificada, es decir elevada o reducida, de un gen es atribuible a un ácido nucleico con actividad de promotor según la reivindicación 1.

- 15 Otras tasas de transcripción adicionales modificadas, es decir adicionalmente elevadas o adicionalmente reducidas, de otros genes en el microorganismo modificado genéticamente pueden, pero no tienen que atribuirse a los ácidos nucleicos con actividad de promotor según la reivindicación 1.

Los microorganismos genéticamente modificados de la invención pueden utilizarse en un método para la producción de productos biosintéticos.

Productos biosintéticos preferidos son productos de la química fina.

- 20 La expresión "productos de la química fina" es conocida en el campo especializado y comprende compuestos que son producidos por un organismo y encuentran aplicaciones en diferentes ramas de la industria como, por ejemplo, aunque no se restringe a, la industria farmacéutica, la agricultura, la industria de cosméticos, de alimentos para humanos y de comida para animales. Estos compuestos comprenden ácidos orgánicos como, por ejemplo, ácido tartárico, ácido itacónico y ácido diaminopimélico, aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, bases purina y bases pirimidina, nucleósidos y nucleótidos (tal como se describe en Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, páginas 561-612, en Biotechnology volumen 6, Rehm et al., Editores VCH: Weinheim y las referencias citadas allí), lípidos, ácidos grasos saturados e insaturados (por ejemplo, ácidos araquidónico), dioles (por ejemplo, propandiol y butandiol), carbohidratos (por ejemplo, ácido hialurónico y trehalosa), compuestos aromáticos (por ejemplo, aminas aromáticas, vanilina e índigo), vitaminas y cofactores (tal como se describe en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, volumen A27, "Vitamins", páginas 443-613 (1996) VCH: Weinheim y las referencias citadas allí; y Ong, A.S., Niki, E. y Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia, celebrado el 1 - 3 de septiembre de 1994 en Penang, Malasia, AOCS Press (1995)), Enzimas y todos los otros compuestos químicos descritos por Gutcho (1983) en Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 y las citas bibliográficas allí indicadas. El metabolismo i los usos de determinados productos de la química fina se explican más adelante.
- 35

I. Metabolismo y usos de aminoácido

- Los aminoácidos comprenden las unidades estructurales fundamentales de todas las proteínas y de esta manera son esenciales para las funciones celulares normales. El término "aminoácido" es conocido en el campo técnico especializado. Los aminoácidos proteinogénicos, de los cuales existen 20 tipos, sirven como unidades estructurales para proteínas, en las que se conectan entres sí a través de enlaces peptídicos, mientras que los aminoácidos no proteinogénicos (de los cuales se conocen cientos) usualmente no tienen lugar en proteínas (véase Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, volumen A2, páginas 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Los aminoácidos pueden presentarse en la configuración D o L a pesar de que los L-aminoácidos son habitualmente el único tipo que se encuentra en las proteínas de procedencia natural. Las vías de biosíntesis y de degradación de cada una de los 20 aminoácidos proteinogénicos están bien caracterizados tanto en células procariotas como también eucariotas (véase por ejemplo Stryer, L. Biochemistry, 3. Edición, páginas 578-590 (1988)). Los aminoácidos "esenciales" (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano y valina), así denominados porque tienen que ser ingeridos con la alimentación debido a la complejidad de su biosíntesis, se convierten mediante vías de biosíntesis sencillas en los demás 11 aminoácidos "no esenciales" (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina). Los animales superiores poseen la capacidad de sintetizar algunos de estos aminoácidos, aunque los aminoácidos esenciales tienen que ingerirse con la alimentación para que tenga lugar una síntesis normal de proteínas.
- 50

Aparte de su función en la biosíntesis de proteína, estos aminoácidos son compuestos químicos interesantes per se y se ha descubierto que muchos se emplean en aplicaciones diferentes en la industria de productos alimenticios, de

comida para animales, de la química, los cosméticos, la agricultura y farmacéutica. La lisina es un aminoácido importante no solo para la nutrición humana sino también para animales monogástricos como las aves domésticas y los cerdos. El glutamato se usa la mayoría de las veces como aditivo de sabor (glutamato monosódico, MSG) así como además en la industria de alimentos, como también aspartato, fenilalanina, glicina y cisteína. Glicina, L-metionina y triptofano se usan todos en la industria farmacéutica. Glutamina, valina, leucina, isoleucina, histidina, arginina, prolina, serina y alanina se usan en la industria farmacéutica y en la industria de cosméticos. Treonina, Triptofano y D-/L-metionina son aditivos ampliamente usados en comida para animales (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, páginas 466-502 en Rehm et al., (editores) Biotechnology volumen 6, capítulo 14a, VCH: Weinheim). Se ha descubierto que estos aminoácidos son adecuados además como precursores para la síntesis de aminoácidos y proteínas sintéticos, como N-acetil-cisteína, S-carboximetil-L-cisteína, (S)-5-hidroxitriptofano y otras sustancias descritas en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, volumen A2, páginas 57-97, VCH, Weinheim, 1985.

La biosíntesis de estos aminoácidos naturales en organismos que los pueden producir, por ejemplo bacterias, ha sido bien caracterizada (para una revisión general de la biosíntesis bacteriana de aminoácidos y su regulación, véase Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). El glutamato se sintetiza mediante aminación reductiva de -ceto-glutarato, un producto intermedio en el ciclo de ácido cítrico. Glutamina, prolina y arginina se generan cada una sucesivamente a partir de glutamato. La biosíntesis de serina se efectúa en un proceso de tres pasos e inicia con 3-fosfoglicerato (un producto intermedio en la glicólisis) y después de los pasos de oxidación, transnominación e hidrólisis da lugar a estos aminoácidos. Cisteína y glicina se producen respectivamente de serina; la primera por condensación de homo-cisteína con serina, y la última por transferencia del átomo de carbono de la cadena lateral al tetrahidrofolato, en una reacción catalizada por serina transhidroximetilasa. Fenilalanina y tirosina se sintetizan a partir de los precursores de la vía de glicólisis y pentosa-fosfato, eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato en una vía de biosíntesis de 9 pasos que solo en los dos últimos pasos se diferencia después de la síntesis de prefenato. El triptofano también se produce a partir de estas dos moléculas de partida, aunque su síntesis se efectúa en una vía de 11 pasos- La tirosina también puede producirse de fenilalanina en una reacción catalizada por fenilalaninhidroxilasa. Alanina, valina y leucina son respectivamente productos de biosíntesis de piruvato, el producto final de la glicólisis. El aspartato se forma a partir de oxalacetato, un producto intermedio del ciclo de citrato. Asparagina, metionina, treonina y lisina se producen respectivamente mediante conversión de aspartato. La isoleucina se forma a partir de treonina. En una vía compleja de 9 pasos la formación de histidina se efectúa a partir de 5-fosforibosil-1-pirofosfato, un azúcar activado.

No pueden almacenarse aminoácidos cuya cantidad exceda la demanda de biosíntesis de proteína de la célula, y en lugar de esto se degradan, de tal modo que los productos intermedios se proporcionan para las vías metabólicas principales de la célula (para una revisión general véase Strier, L., Biochemistry, 3. Edición, capítulo 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle"; páginas 495-516 (1988)). Si bien la célula es capaz de convertir aminoácidos indeseados en productos intermediarios útiles, no obstante la producción de aminoácido es costosa en términos de la energía, de las moléculas precursoras y de las enzimas necesarias para su síntesis. Por lo tanto no sorprende que la biosíntesis de aminoácido se regule mediante la inhibición de retroalimentación (feedback), en cuyo caso la presencia de un aminoácido determinado torna más lenta su propia producción o la finaliza enteramente (para una revisión general sobre el mecanismo de retroalimentación en vías de biosíntesis de aminoácido véase Strier, L., Biochemistry, 3. Edición, capítulo 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", páginas 575-600. (1988)). El rendimiento de un aminoácido determinado se restringe por lo tanto por la cantidad de este aminoácido en la célula.

II. Metabolismo y usos de vitaminas, cofactores y nutraceuticos

Vitaminas, cofactores y nutraceuticos comprenden otro grupo de moléculas. Los animales superiores han perdido la capacidad de sintetizar éstos y tienen que ingerirlos a pesar de que otros organismos como las bacterias las sintetizan fácilmente. Estas moléculas son, o bien moléculas biológicamente activas per se, o bien precursores de sustancias biológicamente activas que sirven como portadores de electrones o productos intermedios en una serie de vías metabólicas. Estos compuestos también tienen, además de su valor nutritivo, un valor industrial significativo como colorantes, antioxidantes y catalizadores u otros auxiliares de procesamiento. (Para una revisión general sobre la estructura, actividad y las aplicaciones industriales de estos compuestos véase por ejemplo Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", volumen A27, páginas 443-613, VCH: Weinheim, 1996). El término "vitamina" es conocido en el campo especializado y comprende nutrientes que un organismo requiere para una función normal aunque este mismo organismo no puede sintetizarlas. El grupo de las vitaminas puede comprender cofactores y compuestos nutraceuticos. El término "cofactor" comprende compuestos no proteinogénicos que son necesarios para la ocurrencia de actividad enzimática normal. Estos compuestos pueden ser orgánicos o inorgánicos; las moléculas co-factores de la invención son preferentemente orgánicas. El término "nutraceutico" comprende aditivos nutritivos que promueven la salud en plantas y animales, principalmente en las personas. Ejemplos de tales moléculas son vitaminas, antioxidantes e igualmente determinados lípidos (por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados).

La biosíntesis de estas moléculas en organismos que son capaces de su producción, tales como las bacterias, se ha caracterizado de manera completa (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", volumen A27,

páginas 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley & Sons: Ong, A.S., Niki, E. y Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asia, celebrado el 1 – 3 de septiembre de 1994 en Penang, Malasia, AOCs Press, Champaign, IL X, 374 S).

La tiamina (vitamina B1) se forma mediante acoplamiento químico de unidades de pirimidina y de tiazol. Riboflavina (vitamina B2) se sintetiza a partir de guanosina-5'-trifosfato (GTP) y ribosa-5'-fosfato. La riboflavina se emplea a su vez para la síntesis de flavinmononucleótido (FMN) y flavinadeninucleótido (FAD). La familia de compuestos que se denominan conjuntamente como "vitamina B6" (por ejemplo piridoxina, piridoxamina, piridoxal-5'-fosfato y el hidrocloreuro de piridoxina usado comercialmente), son todos los derivados de la unidad estructural común 5-hidroxi-6-metilpiridina. Pantotenato (ácido pantoténico, R-(+)-N-(2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-1-oxobutil)-alanina) puede producirse o bien mediante síntesis química o bien mediante fermentación. Los últimos pasos en la biosíntesis de pantotenato consisten en la condensación de -alanina y ácido pantóico accionada por ATP. Las enzimas responsables por los pasos de biosíntesis para la conversión en ácido pantóico, en -alanina y para la condensación en ácido pantoténico son conocidas. La forma metabólicamente activa de pantotenato es la coenzima A cuya biosíntesis transcurre por 5 pasos enzimáticos. El pantotenato, piridoxal-5'-fosfato, cisteína y ATP son los precursores de la coenzima A. Estas enzimas catalizan no solo la formación de pantotenato sino también la producción de ácido (R)-pantóico, (R)-pantolactona, (R)-pantenol (provitamina B5), panteteina (y sus derivados) y coenzima A.

La biosíntesis de biotina a partir de la molécula precursora pimeloil-CoA en microorganismos se ha investigado de manera detallada, y se han identificado varios de los genes que intervienen. Se ha comprobado que muchas de las proteínas correspondientes intervienen en la síntesis de agrupamiento de Fe y pertenecen a la clase de las nifS-proteínas. El ácido lipóico se deriva del ácido octanoico y sirve como coenzima en el metabolismo de energía, donde se vuelve componente del complejo piruvato-dehidrogenasa y del complejo -cetoglutarato-dehidrogenasa. Los folatos son un grupo de sustancias que se derivan todas del ácido fólico el cual se deriva a su vez de ácido L-glutámico, ácido p-aminobenzoico y 6-metil-pterina. La biosíntesis del ácido fólico y de sus derivados a partir de los productos metabólicos intermedios guanosina-5'-trifosfato (GTP), ácido L-glutámico y ácido p-aminobenzoico se ha investigado en detalle en determinados microorganismos.

Corrinoides (como las cobalaminas y principalmente la vitamina B12) y las porfirinas pertenecen a un grupo de compuestos químicos que se distinguen por un sistema anular tetrapirrol. La biosíntesis de la vitamina B12 es tan compleja que aún no ha sido completamente caracterizada aunque entretanto la mayoría de las enzimas y sustratos que intervienen son conocidos. El ácido nicotínico (nicotinato) y la nicotinamida son derivados de piridina que también se denominan "niacina". La niacina es la precursora de las coenzimas más importantes NAD (nicotinamid-adenin-dinucleótido) y NADP (nicotinamid-adenin-dinucleótido-fosfato) y sus formas reducidas.

La producción de estos compuestos a escala industrial se basa en su mayor parte en síntesis químicas libres de células aunque algunos de estos compuestos químicos se han producido igualmente mediante cultivo a gran escala de microorganismos, tal como la riboflavina, la vitamina B6, pantotenato y biotina. Solo la vitamina B12 se produce por fermentación debido a la complejidad de su síntesis. Los métodos in-vitro requieren un gasto considerable en materiales y tiempo y con frecuencia altos costes.

III. Metabolismo y usos de purina, pirimidina, nucleósido y nucleótido

Los genes para el metabolismo de purina y pirimidina y sus proteínas correspondientes son objetivos importantes para la terapia de patologías tumorales e infecciones virales. El término "purina" o "pirimidina" comprende bases nitrogenadas que son un componente de los ácidos nucleicos, coenzimas y nucleótidos. El término "nucleótido" comprende las unidades estructurales fundamentales de moléculas de ácido nucleico que comprenden una base nitrogenada, un azúcar de pentosa (en el caso de ARN es el azúcar ribosa, en el caso de ADN es el azúcar D-desoxiribosa) y ácido fosfórico. El término "nucleósido" comprende moléculas que sirven como precursores de nucleótidos pero que no tienen unidad de ácido fosfórico por contraste con los nucleótidos. Inhibiendo la biosíntesis de estas moléculas o su inmovilización para la formación de moléculas de ácido nucleico es posible inhibir la síntesis de ARN y de ADN; si esta actividad se inhibe en las células cancerígenas de manera dirigida al objetivo, puede inhibirse la capacidad de dividirse y replicarse que tienen las células tumorales.

Existen, además, nucleótidos que no forman una molécula de ácido nucleico aunque sirven como almacenadores de energía (es decir, AMP) o como coenzimas (es decir, FAD y NAD).

Muchas publicaciones han descrito el uso de estos productos químicos para indicaciones medicinales, en cuyo caso el metabolismo de purina y/o de pirimidina se ve afectado (por ejemplo, Christopherson, R.I. y Lions, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", *Med. Res. Reviews* 10: 505-548). Las investigaciones de enzimas que intervienen en el metabolismo de purina y pirimidina se han concentrado en el desarrollo de nuevos medicamentos que pueden usarse, por ejemplo, como agentes de

inmunosupresión o antiproliferantes (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 (1995) 752-757; *Biochem. Soc. Transact.* 23 (1995) 877-902). Las bases de purina y pirimidina, nucleósidos y nucleótidos no obstante también tienen otras posibilidades de empleo: como productos intermedios en la biosíntesis de diferentes productos de la química fina (por ejemplo, tiamina, S-adenosil-metionina, folatos o riboflavina), como portadores de energía para la célula (por ejemplo ATP o GTP) y para los mismos compuestos químicos, usualmente se usan como reforzadores de sabor (por ejemplo IMP o GMP) o para muchas aplicaciones medicinales (véase, por ejemplo, Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology volumen 6, Rehm et al., editores VCH: Weinheim, páginas 561-612). Enzimas que intervienen en el metabolismo de purina, pirimidina, nucleósido o nucleótido, también sirven cada vez con más fuerza como objetivos para desarrollar compuestos químicos para protección vegetal, incluidos fungicidas, herbicidas e insecticidas.

El metabolismo de estos compuestos en bacterias se ha caracterizado (para revisiones generales véanse, por ejemplo, Zalkin, H. y Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" en *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*, volumen 42, Academic Press, páginas 259-287; y Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; capítulo 8 en: *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, Wiley, New York). El metabolismo de purina, el objeto de investigación más intensa, es esencial para el funcionamiento normal de las células. Un metabolismo perturbado de purina en animales superiores puede causar patologías severas, por ejemplo gota. Los nucleótidos de purina se sintetiza por una serie de pasos mediante el compuesto intermedio inosin-5'-fosfato (IMP) de ribosa-5-fosfato, lo cual conduce a la producción de guanosina-5'-monofosfato (GMP) o adenosina-5'-monofosfato (AMP), a partir de los cuales pueden producirse fácilmente las formas trifosfato usadas como nucleótidos. Estos compuestos también se usan como almacenadores de energía de tal modo que su degradación suministra energía para muchos procesos bioquímicos diferentes en la célula. La biosíntesis de pirimidina se efectúa a través de la formación de uridina-5'-monofosfato (UMP) a partir de ribosa-5-fosfato. UMP se convierte a su vez en citidina-5'-trifosfato (CTP). Las desoxiformas de todos los nucleótidos se producen en una reacción de reducción de un paso a partir de la forma difosfato-ribosa del nucleótido en dirección de la forma difosfato-desoxirribosa del nucleótido. Después de la fosforilación estas moléculas pueden participar en la síntesis de ADN.

IV. Metabolismo y usos de trealosa

La trealosa se compone de dos moléculas de glucosa que están enlazadas entre sí a través de un enlace α,α -1,1. Habitualmente se usa en la industria de alimentos como edulcorante, como aditivo para alimentos secos o congelados o en bebidas. Sin embargo también se aplica en la industria farmacéutica, en la industria de cosméticos y en la industria de la biotecnología (véase, por ejemplo, Nishimoto et al., (1998) patente estadounidense No. 5 759 610; Singer, M.A. y Lindquist, S. *Trends Biotech.* 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. y Panek, A.D. *Biotech Ann. Rev.* 2 (1996) 293-314; y Shiosaka, M. *J. Japan* 172 (1997) 97-102). La trealosa se produce mediante enzimas de muchos microorganismos y se libera al medio circundante del cual puede obtenerse mediante métodos conocidos en el campo especializado.

Productos biosintéticos particularmente preferidos se seleccionan del grupo de los ácidos orgánicos, proteínas, nucleótidos y nucleósidos, así como aminoácidos proteinogénicos como también aminoácidos no proteinogénicos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, enzimas y proteínas.

Ácidos orgánicos preferidos son ácido tartárico, ácido itacónico y ácido diaminopimélico

Nucleósidos y nucleótidos preferidos se describen, por ejemplo, en Kuninaka, A. (1996) *Nucleotides and related compounds*, páginas 561-612, en *Biotechnology* volumen 6, Rehm et al., editores VCH: Weinheim y las referencias allí citadas.

Productos biosintéticos preferidos son, además, lípidos, ácidos grasos saturados e insaturados como, por ejemplo, ácido araquidónico, dioles como, por ejemplo, propandiol y butandiol, carbohidratos como, por ejemplo, ácido hialurónico y trealosa, compuestos aromáticos como, por ejemplo, aminas aromáticas, vanilina e índigo, vitaminas y cofactores, tal como se describe por ejemplo en *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, volumen A27, "Vitamins", páginas 443-613 (1996) VCH: Weinheim y las referencias citadas allí; y Ong, A.S., Niki, E. y Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" *Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia*, celebrada el 1 - 3 de septiembre de 1994 en Penang, Malasia, AOCS Press (1995)), enzimas, policétidos (Cane et al. (1998) *Science* 282: 63-68), y todos los otros compuestos químicos descritos por Gutcho (1983) en *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 y las citas bibliográficas indicadas allí.

Productos biosintéticos particularmente preferidos son aminoácidos, particularmente preferidos son aminoácidos esenciales, particularmente L-glicina, L-alanina, L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-lisina, L-glutamina, ácido L-glutámico, L-serina, L-prolina, L-valina, L-isoleucina, L-cisteína, L-tirosina, L-histidina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico y L-treonina, L-homoserina, principalmente L-lisina, L-metionina y L-treonina. En lo

sucesivo, por un aminoácido como, por ejemplo, lisina, metionina y treonina, se entiende tanto la forma L y la forma D del aminoácido, preferentemente la forma L; es decir, por ejemplo, L-lisina, L-metionina y L-treonina.

5 En el proceso para preparar productos biosintéticos, al paso de cultivo de los microorganismos genéticamente modificados preferentemente se asocia un aislamiento de productos biosintéticos de los microorganismos y/o del caldo de fermentación. Estos pasos pueden tener lugar simultáneamente y/o preferentemente después del paso de cultivo.

10 Los microorganismos genéticamente modificados de la invención pueden cultivarse continuamente o discontinuamente en el proceso por lotes (batch) (cultivo por lotes) o en fed batch (proceso de lote alimentado) o proceso de repeated fed batch (proceso de alimentación repetitiva de lote) para la producción de productos biosintéticos, principalmente L-lisina, L-metionina y L-treonina. Una composición mediante métodos de cultivo conocidos puede encontrarse en el libro texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Ingeniería de bioprocesos 1. Introducción a la ingeniería de bioprocesos) (Gustav Fischer Verlag (editorial), Stuttgart, 1991)) o en libro texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Bioreactores y dispositivos periféricos) (Vieweg Verlag (Editorial), Brunswick/Wiesbaden, 1994)).

15 El medio de cultivo a usarse tiene que satisfacer de manera adecuada las demandas de la cepa respectiva. Descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos están contenidas en el libro "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981).

Estos medios aplicables comprenden habitualmente una o varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o microelementos.

20 Las fuentes de carbono preferidas son azúcares como los mono-, di- o polisacáridos. Fuentes de carbono muy buenas son, por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. A los medios pueden adicionarse azúcares a través de compuestos complejos como melasas u otros productos secundarios de la refinación de azúcar. También puede ser ventajoso adicionar mezclas de diferentes fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuate y grasa de coco, ácidos grasos como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico, o ácido linoléico; alcoholes como, por ejemplo, glicerina, metanol o etanol y ácidos orgánicos como, por ejemplo, ácido acético o ácido láctico.

30 Las fuentes de nitrógeno son habitualmente compuestos orgánicos o inorgánicos de nitrógeno o materiales que contienen estos compuestos. Las fuentes de nitrógeno ejemplares comprenden gas de amoníaco o sales de amonio, como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes complejas de nitrógeno como agua de maíz macerado, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse individualmente o como mezcla.

35 Los compuestos de sal inorgánica que pueden estar contenidos en los medios comprenden las sales de cloruro, fósforo o sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, cinc, cobre y hierro.

Como fuente de azufre para la producción de productos de química fina, principalmente de metionina, pueden usarse compuestos inorgánicos como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetraionitos, tiosulfatos, sulfuros pero también compuestos orgánicos de azufre como mercaptanos y tioles.

40 Como fuente de fósforo pueden usarse ácido fosfórico, dihidrofosfato de potasio o hidrofosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio.

Al medio pueden adicionarse formadores de quelato a fin de mantener iones metálicos en solución. Formadores de quelato particularmente adecuados comprenden dihidroxifenoles como la catequina o protocatecuato, o ácidos orgánicos como ácido cítrico.

45 Los medios de fermentación empleados también contienen usualmente otros factores de crecimiento como vitaminas o promotores de crecimiento a los cuales pertenecen, por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Muchas veces los factores de crecimiento y las sales provienen de componentes complejos de los medios como extracto de levadura, melasas, agua de maíz macerado y similares. Además, al medio de cultivo pueden adicionarse precursores adecuados. La composición exacta de los compuestos de los medios depende fuertemente del respectivo experimento y se decide individualmente para cada caso específico. Puede obtenerse información sobre optimización de medios del libro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (editores P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) páginas 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Los medios de crecimiento también pueden obtenerse de proveedores comerciales como Standard 1 (Merck) o BHI (Brain heart infusion, DIFCO) y similares.

Todos los componentes de medios de esterilizan ya sea calentando (20 min a 1,5 bar y 121°C) o mediante filtración de esterilización. Los componentes pueden esterilizarse juntos o, en caso de necesidad, por separado. Todos los componentes de medios pueden estar presentes al inicio del cultivo o adicionarse opcionalmente de manera continua o por cargas.

5 La temperatura del cultivo se encuentra normalmente entre 15°C y 45°C, preferentemente a 25°C a 40°C y puede mantenerse constante o modificarse durante el experimento. El valor de pH del medio debe encontrarse en el rango de 5 a 8,5, preferentemente alrededor de 7,0. El valor de pH para el cultivo puede controlarse durante el cultivo
10 adicionando compuestos básicos como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso o compuestos ácidos como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para controlar el desarrollo de espuma pueden emplearse
15 productos anti-espumantes como, por ejemplo, ésteres de poliglicol y ácido grasos. Para mantener la estabilidad de plásmidos pueden adicionarse a l medio sustancias adecuadas con efecto selectivo como, por ejemplo, antibióticos. Con el fin de mantener condiciones aeróbicas al cultivo se introduce oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, como por ejemplo aire del ambiente. La temperatura del cultivo se encuentra normalmente en 20°C a 45°C. El cultivo continúa hasta que se forme un máximo del producto deseado. Este objetivo normalmente se logra en el transcurso de 10 horas hasta 160 horas.

Los caldos de fermentación obtenidos de esta manera tienen habitualmente una masa seca de 7,5 a 25 % en peso.

Además, también es ventajoso si la fermentación opera, al menos al final, aunque principalmente durante al menos 30% de la duración de la fermentación, con limitación de azúcar. Esto significa que durante este tiempo la
20 concentración de azúcar utilizable en el medio de fermentación se mantiene en, o se reduce a 0 a 3 g/l. El aislamiento de productos biosintéticos del caldo de fermentación y/o de los microorganismos se efectúa de una manera conocida per se en correspondencia con las propiedades físico-químicas del producto biosintético valioso y de los productos biosintéticos secundarios.

El caldo de fermentación puede seguir procesándose a continuación, por ejemplo. Dependiendo del requerimiento la biomasa puede retirarse total o parcialmente del caldo de fermentación mediante métodos de separación como, por
25 ejemplo, centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos métodos o dejarse completamente en el mismo.

A continuación el caldo de fermentación puede condensarse o concentrarse por medio de métodos conocidos como, por ejemplo, con ayuda de un evaporador de rotación, evaporador de capa delgada, evaporador de película caída, mediante ósmosis inversa o mediante nanofiltración. Este caldo de fermentación concentrado puede procesarse a
30 continuación mediante secamiento por congelamiento, secamiento por aspersión, granulación por aspersión o mediante otros métodos.

Pero también es posible purificar adicionalmente los productos biosintéticos, principalmente L-lisina, L-metionina y L-treonina. Para este propósito, después de separarse de la biomasa el caldo que contiene producto se somete a una
35 cromatografía con una resina adecuada, en cuyo caso el producto deseado o las impurezas quedan retenidas total o parcialmente sobre la resina de cromatografía. Estos pasos de cromatografía pueden repetirse en caso de necesitarse, en cuyo caso se usan las mismas resinas de cromatografía o diferentes. El experto en la materia tiene experiencia en la elección de las resinas adecuadas de cromatografía y en su aplicación más efectiva. El producto purificado puede concentrarse mediante filtración o ultrafiltración y almacenarse a una temperatura en la que sea máxima la estabilidad del producto.

40 Los productos biosintéticos pueden producirse en formas diferentes, por ejemplo en forma de sus sales o ésteres.

La identidad y pureza del (los) compuesto(s) aislado(s) puede determinarse mediante técnicas del estado de la técnica. Estas abarcan cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), métodos espectroscópicos, procesos de coloración, cromatografía de capa delgada, NIRS, ensayos enzimáticos o ensayos microbiológicos. Estos métodos de análisis se recopilan en: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996)
45 Biotekhnologiya 11 27-32; y Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) volumen A27, VCH: Weinheim, páginas 89-90, páginas 521-540, páginas 540-547, páginas 559-566, 575-581 y páginas 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry en: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, volumen 17.

50 Ahora la invención se describe más detalladamente mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1

Preparación del vector pCLiK5MCS

Primero se amplificó la resistencia a ampicilina y el origen de replicación del vector pBR322 usando cebadores de oligonucleótidos de SEQ ID NO 5: y SEQ ID NO 6: con la ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

SEQ ID NO 5:

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGGCGCGCCGGCCGGCCCGGTGTGAAATACCGCACAG-3'

5 SEQ ID NO 6:

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGCCGGCCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTCAG-3'

Además de las secuencias complementarias a pBR322, el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO 5: contiene en la dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción SmaI, BamHI, NheI y AclI y el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO 6: contiene en dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción XbaI, XhoI, NotI y DraI. La reacción de PCR se realizó según métodos estándar como Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) con polimerasa PfuTurbo (Stratagene, La Jolla, USA). El fragmento de ADN obtenido con un tamaño de aproximadamente 2,1 kb se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. Los extremos romos del fragmento de ADN se ligaron entre sí con el Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA) según métodos estándar como los descritos en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)). Se seleccionaron células que tienen plásmido mediante el plaquetamiento sobre agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) que contiene ampicilina (50 µg/ml).

El ADN de plásmido de un clon individual se aisló usando el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según indicaciones del fabricante y se verificó por digestores de restricción. El plásmido obtenido de esta manera obtiene el nombre de pCLiK1.

A partir del plásmido pWLT1 (Liebl et al., 1992) como plantilla para una reacción de PCR se amplificó un casete de resistencia a canamicina usando los oligonucleótidos cebadores de SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8.

SEQ ID NO:7:

25 5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ 10 NO:8

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

Junto a las secuencias complementarias pWLT1, el cebador de oligonucleótido de SEQ ID NO: 7 contiene en dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción XbaI, SmaI, BamHI, NheI y el cebador de oligonucleótido SEQ ID NO:8 contiene en dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción AclI y NheI. La reacción de PCR se realizó según métodos estándar como Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) con polimerasa PfuTurbo (Stratagene, La Jolla, USA). El fragmento de ADN obtenido con un tamaño de aproximadamente 1,3 kb se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. El fragmento de ADN se cortó con las nucleasas de restricción XbaI y AclI (New England Biolabs, Beverly, USA) y a continuación se purificó nuevamente con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. El vector pCLiK1 fue cortado igualmente con las endonucleasas de restricción XbaI y AclI y se desfosforiló con fosfatasa alcalina (1 (Roche Diagnostics, Mannheim)) según las indicaciones del fabricante. Después de la electroforesis, en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (aproximadamente 2,1 kb) con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según las indicaciones del fabricante con el fragmento de PCR cortado y la mezcla de ligazón se transformó en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA) según métodos estándar, tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)). Una selección en células que tenían plásmido se logró mediante preparación de cultivos en placas sobre agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) que contiene ampicilina (50 µg/ml) y canamicina (20 µg/ml).

El ADN de plásmido de un clon individual se aisló usando Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según las indicaciones del fabricante y se verificó por digestores de restricción. El plásmido obtenido de esta manera obtiene el nombre de pCLiK2.

5 El vector pCLiK2 se cortó con la endonucleasa de restricción Dral (New England Biolabs, Beverly, USA). Después de la electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló un fragmento de vector de aproximadamente 2,3 kb de tamaño usando GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector se reguló con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según las indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA) según métodos estándar tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)). Se logró una selección en células que tenían plásmido mediante preparación de cultivos en placas sobre agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) que contiene canamicina (20 µg/ml).

10 El ADN de plásmido de un clon individual se aisló usando el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según las indicaciones del fabricante y se verificó por digestores de restricción. El plásmido obtenido de esta manera obtiene el nombre de pCLiK3.

A partir del plásmido pWLQ2 (Liebl et al., 1992) como plantilla para una reacción de PCR se amplificó el origen de replicación pHM1519 con los cebadores de oligonucleótido SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10.

15 SEQ ID NO:9:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO:10:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

20 Además de las secuencias complementarias a pWLQ2, los cebadores de oligonucleótido SEQ ID NO:9 y SEI ID NO:10 contienen sitios de corte para la endonucleasa de restricción NotI. La reacción PCR se realizó usando polimerasa PfuTurbo (Stratagene, La Jolla, USA) según métodos estándar como Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to methods and Applications, Academic Press (1990)). El fragmento de ADN obtenido con un tamaño de aproximadamente 2,7 kb se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. El fragmento de ADN se cortó con la endonucleasa de restricción NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) y a continuación de esto se purificó nuevamente con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. El vector pCLiK3 igualmente fue cortado con la endonucleasa de restricción NotI y se defosforiló con fosfatasa alcalina (1 Roche Diagnostics, Mannheim) según las indicaciones del fabricante. Después de la electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (cerca de 2,3kb) con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con el fragmento PCR cortado con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según las indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA) de acuerdo con métodos estándar, tal como se describe en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)). Una selección en células que tenían plásmido se logró mediante la preparación de cultivos en placas sobre agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) que contiene canamicina (20 µg/ml).

35 El ADN de plásmido de un clon individual se aisló usando el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según las indicaciones del fabricante y se verificó por digestores de restricción. El plásmido obtenido de esta manera recibe el nombre pCLiK5.

40 Para la ampliación de pCLiK5 en un "multiple cloning site" (MCS) (sitio de clonación múltiple) se unieron en la mayor medida posible ambos oligonucleótidos complementarios SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, que contienen los sitios de corte para las endonucleasas de restricción SwaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, Sall, ClaI, BamHI, XbaI y SmaI, calentando conjuntamente a 95°C y enfriando lentamente para producir un fragmento de ADN bicatenario.

45 SEQ ID NO:11:

**5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCGGTACCACGCGTCATAT
GACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTTCTGCGTTAATTAAC
AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTTAAAT-3'**

SEQ ID NO:12:

**5'-GATCATTTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAG
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAAGTATCATATGACGCGTGGTACCG
GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTTAAAT-3'**

El vector pCLiK5 fue cortado con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI (New England Biolabs, Beverly, USA) y se defosforiló con fosfatasa alcalina (1 (Roche Diagnostics, Mannheim)) según las indicaciones del fabricante. Después de la electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (cerca de 5,0 kb) usando el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante. Este fragmento de vector fue ligado con el fragmento de ADN bicatenario con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según las indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó en *E.coli* XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) competente según métodos estándar tal como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)). Una selección en células que tenían plásmido se logró mediante la preparación de cultivos en placas sobre agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) que contenía canamicina (20 µg/ml).

El ADN de plásmido de un clon individual se aisló usando el Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según las indicaciones del fabricante y se verificó por digestores de restricción. El plásmido obtenido de esta manera recibe el nombre pCLiK5MCS.

Las reacciones de secuenciación se realizaron según Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciación se fraccionaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido generado pCLiK5MCS es listado como SEQ ID NO:13.

Ejemplo 2

Preparación del plásmido P EF-TS metA

Se preparó ADN cromosómico a partir de *C. glutamicum* ATCC 13032 de acuerdo con Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 o Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828. El gen metA que codifica para la homoserina-O-acetiltransferasa fue amplificado con los cebadores de oligonucleótido BK 1849 SEQ ID NO 14 y BK 1862 SEQ ID NO 15 33, el ADN cromosómico como plantilla y usando polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), con ayuda de la reacción en cadena – polimerasa (PCR) de acuerdo con métodos estándar, tal como se describen en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to methods and Applications, Academic Press.

BK 1849 SEQ ID NO 14

5'-gtgtgtcgacttagatgtagaactcgatgtag -3'

y

BK 1862 SEQ ID NO 15

5'-atgccaccctcgcgcc -3'

El fragmento de ADN obtenido, de un tamaño de aproximadamente 1134 bp, se purificó con el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante.

Con los cebadores de oligonucleótido Haf 26 SEQ ID NO 16 y Haf 27 SEQ ID NO 17, el ADN cromosómico como plantilla y usando polimerasa Pfu Turbo (empresa Stratagene), se amplificó la unidad de expresión del gen (SEQ ID 2) que codifica para el factor de elongación TS con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar, tal como se describe en Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to methods and Applications, Academic Press.

Haf 26 SEQ ID NO 16

5'-gagaggatccccccacgacaatggaac-3'

y

Haf 27 SEO ID NO 17

5'-cctgaaggcgcgaggggtgggcattacggggcgatcctcctatg -3'

El fragmento de ADN obtenido, de un tamaño de aproximadamente 195 bp, se purificó usando el GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según las indicaciones del fabricante.

5 Los cebadores Haf 27 y BK 1862 contienen una secuencia solapante y son homólogos entre sí en sus extremos 5'.

Los productos de PCR arriba obtenidos se emplearon como planilla para otra PCR en la que se utilizaron los cebadores BK 1849 (SEQ. ID. NO. 14) y Haf 26 (SEQ. ID. NO. 16).

10 Con esta mezcla pudo amplificarse un fragmento de ADN que correspondían al tamaño esperado de 1329 bp. Esta fusión de P EF-TS/metA se clonó luego en el vector pClik 5a MCS (SEQ. ID. NO. 13) mediante los sitios de restricción BamH1 y Sall.

15 El fragmento de vector se ligó junto con el fragmento de PCR con ayuda del Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según las indicaciones del fabricante y la mezcla de ligazón se transformó en E.coli XL-1 Blue competente (Stratagene, La Jolla, USA) según métodos estándar como se describen en Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989)). Una selección en células que contenían plásmido se logró mediante preparación de cultivos en placas sobre agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) que contenía canamicina (20 µg/ml).

20 La preparación del ADN de plásmido se realizó según métodos y con materiales de la empresa Quiagen. Reacciones de secuenciación se realizaron de acuerdo con Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciación se fraccionaron y se evaluaron mediante ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido resultante se denominó pClik 5a MCS P EF-TS metA (SEQ. ID. NO. 18).

Ejemplo 3

Actividades MetA

25 La cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 se transformó respectivamente con los plásmidos pClikS MCS, pClik MCS EF-TS metA de acuerdo con el método descrito (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303). La mezcla de transformación se cultivó en placas CM que contenían adicionalmente 20mg/l de canamicina a fin de lograr una selección de células que contenían plásmido. Los clones resistentes a canamicina obtenidos se seleccionaron y se aislaron.

30 Las cepas de *C. glutamicum* que contenían uno de estos constructos de plásmido se cultivaron en medio MMA ((40 g/l de sacarosa, 20 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de K₂HPO₄, 0,25g/l de MgSO₄ x 7H₂O, 54 g de Aces, 1 ml de CaCl₂ (10 g/l), 1 ml de protocatecoato (300 mg/10 ml), 1 ml de solución de microelementos (10 g/l de FeSO₄ x /H₂O, 10 g/l de MnSO₄ x H₂O, 2 g/l de ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/l de CuSO₄, 0,02 g/l de NiCl₂ x 6 de H₂O), 100 µg/l de vitamina B12, 0,3 mg/l de tiamina, 1mM de leucina, 1 mg/l de piridoxal HCl, 1 ml de biotina (100 mg/l), pH7,0) por una noche a 30°C. Las células se centrifugaron a 4°C y se lavaron dos veces con búfer frío de tris-HCl (0,1 %, pH 8,0). Después de una nueva centrifugación las células se llevan a un búfer frío de tris-HCl (0,1%, pH 8,0) y se ajusta una OD₆₀₀ de 160. Para la ruptura celular se transfirió 1 ml de esta suspensión celular a tubos Ribolyser de 2 ml de la empresa Hibaïd y se lisó tres veces, respectivamente por 30 segundos, en un Ryboliser de la empresa Hibaïd a un ajuste de rotación de 6,0. El lisado fue clarificado por centrifugación a 15 000 rpm durante 30 minutos a 4°C en una centrífuga de Eppendorf y el sobrenadante se transfiere a una nueva copa Eppendorrf. El contenido de proteína se determinó de acuerdo con Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254.

40 La medición de la actividad enzimática de MetA se realizó tal como sigue. Las mezclas de reacción de 1 ml contenían búfer de fosfato de potasio (pH 7,5) de 100 mM, MgCl₂ de 5mM, acetilo-CoA de 100 µM, L-homoserina de 5mM, DTNB de 500 µM (reactivo de Ellmans) y extracto celular. El ensayo se inició adicionando el lisado de proteína respectivo y se incubó a temperatura ambiente. Entonces se registró una cinética a 412 nm por 10 minutos.

45 Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Cepa	Actividad específica [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS P EF-TS metA	2339,1

La actividad de MetA incrementarse considerablemente usando la unidad de expresión heteróloga PEF-TS.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> BASF Aktiengesellschaft
 <120> PEF-TS-Unidades de expresión
 <130> 20040509
 <160> 20
 <170> PatentIn version 3.1
- 10 <210> 1
 <211> 178
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
- 15 <221> Promotor
 <222> (1)..(178)
 <223>
 <400> 1
- ccccacgac aatggaactt tgacttttaa aatttcacg ccgtgggggc tttttgggca 60**
gccagccgc cgtgtcgcaa cgtaatcgac tgaatacctg tacgatcact ttttagacgg 120
gcgggtaggg ctactgtgcc ctaacctaag cttgtaaagc attaattatc catacata 178
- 20 <210> 2
 <211> 195
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
- 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(195)
 <223> Unidad de expresión

ES 2 376 035 T3

<400> 2

```
ccccacgac aatggaactt tgacttttaa aatttcacg ccgtgggggc tttttgggca    60
gccagccgc cgtgtcgcaa cgtaatcgac tgaatacctg tacgatcact ttttagacgg    120
gcgggtaggg ctactgtgcc ctaacctaag cttgtaaagc attaattatc catacataag    180
gaggatcgcc ccgta                                                    195
```

<210> 3

5 <211> 1365

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1365)

<223>

<400> 3

ES 2 376 035 T3

atg Met 1	aat Asn	gat Asp	gag Glu	aat Asn 5	att Ile	caa Gln	agc Ser	tcc Ser	aac Asn 10	tat Tyr	cag Gln	cca Pro	ttc Phe 15	ccg Pro	agt Ser	48
ttt Phe	gac Asp	gat Asp	tgg Trp 20	aaa Lys	cag Gln	atc Ile	gag Glu	gtg Val 25	tcg Ser	ctc Leu	tta Leu	gat Asp	gtc Val 30	atc Ile	gaa Glu	96
tcc Ser	tca Ser	cgc Arg 35	cat His	ttt Phe	tct Ser	gat Asp	ttg Leu 40	aaa Lys	gat Asp	agc Ser	act Thr	gat Asp 45	cgt Arg	tct Ser	gcg Ala	144
tta Leu	gat Asp 50	gct Ala	gcg Ala	cta Leu	gag Glu	aga Arg 55	gca Ala	aaa Lys	aga Arg	gct Ala	gcc Ala 60	gca Ala	gtt Val	gat Asp	acc Thr	192
aat Asn 65	gcc Ala	ata Ile	gaa Glu	gga Gly 70	atc Ile	ttc Phe	caa Gln	act Thr	gat Asp	cgc Arg 75	ggt Gly	ttt Phe	acc Thr	cat His 80	aca Thr	240
gtt Val	gca Ala	acg Thr	cag Gln	gta Val 85	ggg Gly	gct Ala	tgg Trp	gag Glu	caa Gln 90	caa Gln	atg Met	gcg Ala	atg Met	aaa Lys 95	ggc Gly	288
aaa Lys	cat His	gtt Val	aag Lys 100	cct Pro	gcg Ala	ttt Phe	gac Asp	gat Asp 105	act Thr	cta Leu	gaa Glu	ggc Gly	ttt Phe 110	gag Glu	tat Tyr	336
gtt Val	ctc Leu	gat Asp 115	gca Ala	gta Val	act Thr	ggt Gly	aga Arg 120	act Thr	cca Pro	atc Ile	tct Ser	cag Gln 125	caa Gln	tgg Trp	att Ile	384
aga Arg	aat Asn 130	ttg Leu	cac His	gcc Ala	gtc Val 135	att Ile 135	ctg Leu	cgg Arg	agc Ser	caa Gln	gaa Glu 140	agc Ser	cac His	gag Glu	gtt Val	432
ttt Phe 145	aca Thr	gcc Ala	ggt Val	gga Gly	gtc Val 150	caa Gln	aat Asn	cag Gln	gcg Ala	ctt Leu 155	cag Gln	aaa Lys	ggc Gly	gag Glu	tat Tyr 160	480
aaa Lys	act Thr	cag Gln	cca Pro	aat Asn 165	agt Ser	cca Pro	cag Gln	cgc Arg	tca Ser 170	gat Asp	gga Gly	tct Ser	gta Val	cat His 175	gca Ala	528
tac Tyr	gcc Ala	cca Pro	ggt Val 180	gaa Glu	gat Asp	act Thr	cct Pro	gct Ala 185	gaa Glu	atg Met	gct Ala	aga Arg	ttt Phe 190	att Ile	tca Ser	576
gaa	ctt	gaa	tct	aag	gaa	ttc	tta	gca	gcc	gag	aag	gtt	att	caa	gct	624

Glu	Leu	Glu	Ser	Lys	Glu	Phe	Leu	Ala	Ala	Glu	Lys	Val	Ile	Gln	Ala		
		195					200					205					
gcc	tat	gcc	cac	tat	gct	ttc	gta	tgt	att	cat	cct	ttt	gca	gat	ggg	672	
Ala	Tyr	Ala	His	Tyr	Ala	Phe	Val	Cys	Ile	His	Pro	Phe	Ala	Asp	Gly		
	210					215					220						
aat	gga	cga	ggt	gca	cga	gcc	ttg	gct	agt	gtt	ttt	cta	tac	aaa	gat	720	
Asn	Gly	Arg	Val	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Ser	Val	Phe	Leu	Tyr	Lys	Asp		
	225				230					235					240		
cct	ggt	gtc	cct	ctc	gta	atc	tac	caa	gat	caa	cgc	aga	gat	tac	atc	768	
Pro	Gly	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Tyr	Gln	Asp	Gln	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ile		
				245					250					255			
cat	gct	cta	gaa	gca	gcg	gac	aag	aat	aac	ccg	ctc	ctg	ctg	att	aga	816	
His	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro	Leu	Leu	Leu	Ile	Arg		
			260					265						270			
ttc	ttt	gct	gaa	cga	gtg	acc	gat	act	att	aac	tct	att	atc	gtt	gat	864	
Phe	Phe	Ala	Glu	Arg	Val	Thr	Asp	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ile	Val	Asp		
		275					280					285					
ctc	act	acc	ccg	atc	gcg	ggt	aaa	tct	ggt	tcg	gct	aag	ctt	tcg	gat	912	
Leu	Thr	Thr	Pro	Ile	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Ser	Asp		
	290					295					300						
gcg	cta	cgc	ccc	act	cgc	gta	tta	cca	gaa	tta	cat	gat	gct	gca	cat	960	
Ala	Leu	Arg	Pro	Thr	Arg	Val	Leu	Pro	Glu	Leu	His	Asp	Ala	Ala	His		
	305				310					315					320		
agg	ctc	caa	gaa	agt	tta	ttt	aca	gaa	atc	cga	tct	cga	ttg	gat	gaa	1008	
Arg	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Glu	Ile	Arg	Ser	Arg	Leu	Asp	Glu		
				325					330					335			
gaa	gga	aaa	agg	aat	ggg	ttg	gag	ttt	cta	ctt	caa	cgg	att	ttt	atc	1056	
Glu	Gly	Lys	Arg	Asn	Gly	Leu	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Arg	Ile	Phe	Ile		
			340					345					350				
ggt	tcc	cca	ttc	aat	ctg	cca	gag	ggc	tat	aac	gct	ttc	cct	gat	agc	1104	
Gly	Ser	Pro	Phe	Asn	Leu	Pro	Glu	Gly	Tyr	Asn	Ala	Phe	Pro	Asp	Ser		
		355					360					365					
tat	tgt	ctg	acc	tta	gct	ttc	aat	agc	aac	tct	cca	aaa	caa	atc	ttc	1152	
Tyr	Cys	Leu	Thr	Leu	Ala	Phe	Asn	Ser	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Ile	Phe		
	370					375					380						
cac	ccg	cta	tcc	ata	gta	ata	gca	gct	cga	gat	ggg	aaa	aga	gcg	agc	1200	
His	Pro	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Ala	Ala	Arg	Asp	Gly	Lys	Arg	Ala	Ser		
	385				390					395					400		
agc	gac	ctc	gtg	gca	gct	act	tct	att	gga	tac	aac	ttt	cac	gct	tac	1248	
Ser	Asp	Leu	Val	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Gly	Tyr	Asn	Phe	His	Ala	Tyr		
				405					410					415			
gga	cgt	gaa	gtc	gag	cct	gtt	gtt	act	gaa	agc	ttt	cga	gaa	cgt	gtg	1296	
Gly	Arg	Glu	Val	Glu	Pro	Val	Val	Thr	Glu	Ser	Phe	Arg	Glu	Arg	Val		
			420					425					430				
aaa	att	tac	gcc	gac	ggg	att	gta	gat	cac	ttc	tta	acc	gaa	ctg	gct	1344	
Lys	Ile	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ile	Val	Asp	His	Phe	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala		
		435					440					445					
aaa	aag	ttt	caa	cag	aat	taa										1365	
Lys	Lys	Phe	Gln	Gln	Asn												
	450																

<210> 4

<211> 454

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 4

ES 2 376 035 T3

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

ES 2 376 035 T3

Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp
290 295 300

Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His
305 310 315 320

Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu
325 330 335

Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile
340 345 350

Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser
355 360 365

Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe
370 375 380

His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser
385 390 395 400

Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr
405 410 415

Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val
420 425 430

Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala
435 440 445

Lys Lys Phe Gln Gln Asn
450

<210> 5

<211> 52

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(52)

<223> Primer

10 <400> 5

cccggtatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 6

<211> 53

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(53)

<223> Primer

<400> 6

tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

10 <210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> Primer

<222> (1)..(47)

<223> Primer

<400> 7

gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

20 <210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> Primer

<222> (1)..(38)

<223> Primer

<400> 8

gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

30 <210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

5 <222> (1)..(34)

<223> Primer

<400> 9

gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tga 34

<210> 10

10 <211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

15 <222> (1)..(34)

<223> Primer

<400> 10

gagagggcgg ccgctcaagt cggtaagcc acgc 34

<210> 11

20 <211> 140

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

25 <222> (1)..(140)

<223> Primer

<400> 11

tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgctca tatgactagt 60

tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120

tctagaccg ggatttaaat 140

<210> 12

ES 2 376 035 T3

<211> 140

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(140)

<223> Primer

<400> 12

```
gatcatttaa atcccgggtc tagaggatcc caattgtaa ttaacgcaga agagcatcga      60
tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc    120
aggcctctcg agatttaa                                140
```

10 <210> 13

<211> 5091

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (15091)..()

<223> Plasmid

<400> 13

ES 2 376 035 T3

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggccccggtac cacgcgatcat atgactagtt	60
cggacctagg gatatcgctc acatcgatgc tcttctgctg taattaacaa ttgggatcct	120
ctagacccgg gatttaaadc gctagcgggc tgctaaagga agcggaacac gtagaaagcc	180
agtccgcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg	240
gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgcaagt ggcttacatg gcgatagcta	300
gactgggcgg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt	360
aaggttggga agccctgcaa agtaaactgg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg	420
cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcat gattgaacaa	480
gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg	540
gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggagc	600
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca	660
gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgct cagctgtgct cgacgttgct	720
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca	780
tctcacctg ctctgcca gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat	840
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca	900
cgtactcgga tggagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg	960
ctcgcgccag ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc	1020
gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct	1080
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct	1140
acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc cgtgctttac	1200

ggtatcgccg ctcccgatc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 1260
 tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 1320
 atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg 1380
 ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440
 gcgcgccggc cggccccgtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 1500
 aggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgctc cggtcggtc gctgcggcga 1560
 gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 1680
 ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 1740
 cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaaagctcc 1800
 ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc ttttctccct 1860
 tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920
 gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 1980
 tccgtaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040
 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggag gtgctacaga gttcttgaag 2100
 tgggtgccta actacggcta cactagaagg acagtattg gtatctgccc tctgctgaag 2160
 ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaacaac caccgctggt 2220
 agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 2280
 gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 2340
 attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ggccggccgc 2400
 ggccgcgcaa agtcccgtt cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460
 ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520
 gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580
 gtcgatttaa aaacggatg cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640
 tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgac ctagaactc tcgtggcggg tcttgaggag 2700
 ctggctgacg agctgctgac tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760
 atcagttgag cctactgagg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgagc aggcggcgc 2820
 gcaaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcgc caacaaacgc 2880
 cacgccgagg agctggaggc ggctaggtcg caaatggcgc tggaaagtgc tccccgagc 2940
 gaaattttgg ccatggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg 3000
 gcggtgcccg caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060
 aggacgtgac agcgcgccca ccacctgcac cgaatcggca gcagcgtcgc gcgtcgaaaa 3120
 agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180
 gtgagcggta actcacaggc cgtcggctaa cccccagtcc aaacctggga gaaagcgtc 3240
 aaaaatgact ctacgggatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300
 tctgttcgac acccatcccc agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360
 ccgcgaattc ctgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420
 cgccagcgtc tggatcaaag acccggacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt 3480

ggttcaaaat cgcttgcccg gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgca gcacgcagcc 3540
 gtgcttgtcc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta 3600
 aaccccgagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg 3660
 atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720
 gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgcctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780
 acccgcgttt tcggcgtga ccaggctttt tcacatagc tgagccgtgg cactgcact 3840
 ctccgacgat cccagccgta ccgctggcat gcccagcaca atcgcgtgga tcgcctagct 3900
 gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaaaa acgctatgag 3960
 caggagtttt ctagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020
 aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcggcg ctgaagcgtc tggagagctg 4080
 atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccaggggcgtg ccgcccgtga tgagacggct 4140
 tttcgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200
 accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggg cggaggaggc 4260
 cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgctc 4320
 ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380
 ccgagggcga aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
 tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500
 caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcagggtg gtttatgact 4560
 gttgaggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
 tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680
 ccgaaagctt cccagtaaat gtgccatctc gtaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740
 tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct aggggggctc 4800
 acaccatagg cagataacgt tccccaccg ctcgcctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860
 caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaaatct 4920
 cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980
 tggattctta ccgtggaat tcttcgcaaa aatcgtcccc tgatcgccct tgcgacgttg 5040
 gcgtcgggtg cgctgggtgc gcttggcttg accgacttga tcagcggccg c 5091

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(32)

<223> Primer

<400> 14

gtgtgtcgac ttagatgtag aactcgatgt ag 32

<210> 15

5 <211> 17

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

10 <222> (1)..(17)

<223> Primer

<400> 15

atgccacccc tcgcgcc 17

<210> 16

15 <211> 28

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

20 <222> (1)..(28)

<223> Primer

<400> 16

gagaggatcc cccccacgac aatggaac 28

<210> 17

25 <211> 44

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

30 <222> (1)..(44)

<223> Primer

ES 2 376 035 T3

<400> 17 cctgaaggcg cgagggtggg cattacgggg cgatcctct tatg 44

<210> 18

<211> 6389

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(6389)

<223> Plasmid

10 <400> 18

ES 2 376 035 T3

tcgatttaaa	tctcgagagg	cctgacgtcg	ggccccgtac	cacgcgtcat	atgactagtt	60
cggacctagg	gatatcgctg	acttagatgt	agaactcgat	gtaggtcgaa	gggttgctct	120
cgtctgggga	gatgaggctg	aagaagttcc	tcacgatgcg	atccatttgg	cggctttcgg	180
tgaggaaagc	atcgtggccg	acaggggata	cgatttttgc	cattgccagt	agatttccca	240
ggtttctgga	gaggtgttct	tgctggtggt	aggggtacaa	aatatcggta	tctacgcctg	300
cgacaaggac	tggaactttg	atggattcga	gtgccttggt	gaggcctccg	cggtcgcgac	360
caatgtcgtg	gcggttgagg	gcgtcggtag	gcaagacgta	ggagccggcg	tcgaaacgct	420
gtactagctt	gtctgcttgg	tagtccaagt	aggattccac	ggcgaagcgc	tggtcgggct	480
tgcggtaggg	accgagtggg	ttttcgttct	tttgggcttt	ggtgccgaag	cgttcgtcga	540
tttctagttc	gccacggtag	gtgaggtggg	cgatgcgtcg	ggcggcgccg	agtcgggtgg	600
ctgggttgca	gccggattcg	tagtagttgc	cttcgtgcca	gtggtggtcg	ttttcaatcg	660
ccttaatttg	ggcggattga	atgccgattt	gccaggcgct	ggcgcgtgca	gaaactgcaa	720
gaacagcagc	tgcgccaaca	gtttctgggt	acattgcggc	ccactctagg	gtgcgggcac	780
cacctatgga	accaccaagt	actgcggcga	ccgtgggtgat	gccgagtgcg	tcgaggaatt	840
gtttttcggc	gtttacctga	tcacgaatgg	acgtggcggg	gaagcgatta	ccccagaaat	900
ttccatctgg	atgcatggag	ccaggtccgg	tggaaccggt	gcaaccaccg	atgacgttgg	960
tacagatcac	gcagtaaata	tcagtgttga	tggctttgcc	gggaccgagc	aagtcagccc	1020
accaatcggc	tgcgttggaa	tctccagtga	gggcgtgttc	gatgagaacg	acattgctgc	1080
gtccttcttt	atctacgcgg	tattcacccc	agcggtgata	ggcgatttca	gcgtttgtaa	1140
tgattgctcc	ggcttcggtg	gagacatcac	cgatcgcttg	gatttcaagt	tgacctgaag	1200
gcgcgagggg	gggcattacg	ggcgcgtcct	ccttatgtat	ggataattaa	tgctttacaa	1260
gcttaggtta	gggcacagta	gccctacccg	cccgtctaaa	aagtgatcgt	acaggtattc	1320
agtcgattac	gttgcgacac	ggcgggctgg	ctgcccaaaa	agccccacg	gcgatgaaat	1380
tttaaaagtc	aaagttccat	tgctcgtggg	gggatcctct	agacccggga	tttaaatcgc	1440
tagcgggctg	ctaaaggaag	cggaacacgt	agaaagccag	tccgcagaaa	cggtgctgac	1500
cccggatgaa	tgctcagctac	tggtctatct	ggacaagggg	aaacgcaagc	gcaaagagaa	1560
agcaggtagc	ttgcagtggg	cttacatggc	gatagctaga	ctgggcgggt	ttatggacag	1620
caagcgaacc	ggaattgccca	gctggggcgc	cctctggtaa	ggttgggaag	ccctgcaaag	1680

taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgatc 1740
 aagagacagg atgaggatcg tttcgcataa ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 1800
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 1860
 ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 1920
 acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 1980
 cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga agggactggc 2040
 tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcacc tcacctgct cctgccgaga 2100
 aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 2160
 cattcgacca ccaagcgaac catcgcacg agcagcagc tactcggatg gaagccggctc 2220
 ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 2280
 ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgcct 2340
 gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 2400
 tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 2460
 ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc 2520
 agcgcacgac cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga 2580
 aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 2640
 ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 2700
 cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg 2760
 aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc 2820
 tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg 2880
 cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag 2940
 gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc 3000
 gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag 3060
 gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga 3120
 ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctccctc ggggaagcgtg gcgctttctc 3180
 atagctcacg ctgtaggtat ctcaagtccg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg 3240
 tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggttaactat cgtcttgagt 3300
 ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 3360
 gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca 3420
 ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag 3480
 ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca 3540
 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg 3600
 ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat tttggctatg agattatcaa 3660
 aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgagg ccgcgcaaag tcccgttcg 3720
 tgaaaatttt cgtgccgctg gatcttccgc caaaaacttt aacgaacggt cgttataatg 3780
 gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga atcatcagct atggatctct 3840
 ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt cgatttaaaa acgggtgatcg 3900
 gatttttccg agctctcgat acgacggagc cgccagcacc acgagactgg gccagtgccg 3960

cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct ggctgacgag ctgctgctc 4020
 ggcagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat cagttgccc tactgctgtg 4080
 gcctgattcc tccccggcct gacccgagc gacggcgcgc aaaatattgc tcagatgctg 4140
 gtcgtgccc agccagccc gagcgcgcca acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg 4200
 ctaggctgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccagcga aatgttgcc atggctgctca 4260
 cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc ggtgcccga ggcagacaa 4320
 acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc 4380
 acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg 4440
 ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt gagcggtaac tcacagggcg 4500
 tcggctaacc cccagtcctc acctgggaga aagcgtcaa aatgactct agcggattca 4560
 cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgac tggtcgacac ccatcccag 4620
 ctgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg 4680
 ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg ccagcgttg gatcaaagac 4740
 ccggacacgg agaaacacag ccgaagtat accgagttgg tcaaaatcg cttgcccggt 4800
 gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt gcttgcctg gacattgatg 4860
 tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa ccccagggtc tacgcgattt 4920
 tggagcgtg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat cggcgtgat cactgagcg 4980
 ggaaatgcca gctcatctgg ctcatgac cgggtgatgc cgcagcaggc atgagcagcc 5040
 cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac ccgcgtttc ggcgctgacc 5100
 aggcttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct ccgacgatcc cagccgtacc 5160
 gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga tcttatggag gttgctcga 5220
 tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca ggagttttc agcggacggg 5280
 cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggagcaaa agcacttgcc acgcttgaag 5340
 caagcctgcc gagcgcgct gaagcgtctg gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct 5400
 ggactgctcc agggcgtgcc gcccgctgat agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg 5460
 gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgc taaaagacac caagggtcat cgagcctacg 5520
 agcgtgccta caccgtcgtc caggcgtcg gaggaggccg tgagcctgat ctgccccgg 5580
 actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgagg ctacgtcgt aaaggccagc 5640
 cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc gaggcgaaa gctctggcca 5700
 ctatgggaag acgtggcggg aaaaaggccg cagaacgtg gaaagacca aacagtgagt 5760
 acgcccagc acagcgagaa aactagcta agtccagtca acgacaagct aggaaagcta 5820
 aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt tgagggagag actggctcgt 5880
 ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc acgtcagacc gtgaatagag 5940
 cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc gaaagcttcc cagtaaatgt 6000
 gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggctc tctcttgcc tccttctag 6060
 gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac accataggca gataacgttc 6120
 cccaccggct cgctcgtaa gcgcacaagg actgctcca aagatcttca aagccactgc 6180
 cgcgactgcc ttcgcaagc cttgccccgc ggaatttcc tccaccgagt tcgtgcacac 6240

ES 2 376 035 T3

ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg gattcttacc gtggaaattc 6300
ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc gtcggtgccg ctggttgccg 6360
ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6389

<210> 19

<211> 1005

<212> DNA

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1005)

<223>

10 <400> 19

ES 2 376 035 T3

atg	aac	cta	aag	aac	ccc	gaa	acg	cca	gac	cgt	aac	ctt	gct	atg	gag	48
Met	Asn	Leu	Lys	Asn	Pro	Glu	Thr	Pro	Asp	Arg	Asn	Leu	Ala	Met	Glu	
1				5					10					15		
ctg	gtg	cga	ggt	acg	gaa	gca	gct	gca	ctg	gct	tct	gga	cgt	tgg	gtt	96
Leu	Val	Arg	Val	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	Trp	Val	
			20					25					30			
gga	cgt	ggc	atg	aag	aat	gaa	ggc	gac	ggt	gcc	gct	gtt	gac	gcc	atg	144
Gly	Arg	Gly	Met	Lys	Asn	Glu	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Met	
		35					40					45				
cgc	cag	ctc	atc	aac	tca	gtg	acc	atg	aag	ggc	gtc	gtt	gtt	atc	ggc	192
Arg	Gln	Leu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Met	Lys	Gly	Val	Val	Val	Ile	Gly	
	50					55					60					
gag	ggc	gaa	aaa	gac	gaa	gct	cca	atg	ctg	tac	aac	ggc	gaa	gag	gtc	240
Glu	Gly	Glu	Lys	Asp	Glu	Ala	Pro	Met	Leu	Tyr	Asn	Gly	Glu	Glu	Val	
65					70					75					80	
gga	acc	ggc	ttt	gga	cct	gag	ggt	gat	atc	gca	gtt	gac	cca	gtt	gac	288
Gly	Thr	Gly	Phe	Gly	Pro	Glu	Val	Asp	Ile	Ala	Val	Asp	Pro	Val	Asp	
				85					90					95		
ggc	acc	acc	ctg	atg	gct	gag	ggt	cgc	ccc	aac	gca	att	tcc	att	ctc	336
Gly	Thr	Thr	Leu	Met	Ala	Glu	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Ile	Ser	Ile	Leu	
			100					105					110			
gca	gct	gca	gag	cgt	ggc	acc	atg	tac	gat	cca	tcc	tcc	gtc	ttc	tac	384
Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Thr	Met	Tyr	Asp	Pro	Ser	Ser	Val	Phe	Tyr	
		115					120					125				
atg	aag	aag	atc	gcc	gtg	gga	cct	gag	gcc	gca	ggc	aag	atc	gac	atc	432
Met	Lys	Lys	Ile	Ala	Val	Gly	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Lys	Ile	Asp	Ile	
	130					135					140					
gaa	gct	cca	ggt	gcc	cac	aac	atc	aac	gcg	gtg	gca	aag	tcc	aag	gga	480
Glu	Ala	Pro	Val	Ala	His	Asn	Ile	Asn	Ala	Val	Ala	Lys	Ser	Lys	Gly	
145					150					155					160	
atc	aac	cct	tcc	gac	gtc	acc	ggt	gtc	gtg	ctt	gac	cgt	cct	cgc	cac	528
Ile	Asn	Pro	Ser	Asp	Val	Thr	Val	Val	Val	Leu	Asp	Arg	Pro	Arg	His	
				165					170					175		
atc	gaa	ctg	atc	gca	gac	att	cgt	cgt	gca	ggc	gca	aag	gtt	cgt	ctc	576
Ile	Glu	Leu	Ile	Ala	Asp	Ile	Arg	Arg	Ala	Gly	Ala	Lys	Val	Arg	Leu	
			180					185					190			
atc	tcc	gac	ggc	gac	ggt	gca	ggt	gca	ggt	gca	gca	gct	cag	gat	tcc	624
Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Gln	Asp	Ser	
		195					200					205				

aac	tcc	gtg	gac	atc	atg	atg	ggc	acc	ggc	gga	acc	cca	gaa	ggc	atc	672
Asn	Ser	Val	Asp	Ile	Met	Met	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Pro	Glu	Gly	Ile	
	210					215					220					
atc	act	gcg	tgc	gcc	atg	aag	tgc	atg	ggc	ggc	gaa	atc	cag	ggc	atc	720
Ile	Thr	Ala	Cys	Ala	Met	Lys	Cys	Met	Gly	Gly	Glu	Ile	Gln	Gly	Ile	
	225				230					235					240	
ctg	gcc	cca	atg	aac	gat	ttc	gag	cgc	cag	aag	gca	cac	gac	gct	ggc	768
Leu	Ala	Pro	Met	Asn	Asp	Phe	Glu	Arg	Gln	Lys	Ala	His	Asp	Ala	Gly	
				245					250					255		
ctg	ggt	ctt	gat	cag	ggt	ctg	cac	acc	aac	gat	ctg	gtg	agc	tcc	gac	816
Leu	Val	Leu	Asp	Gln	Val	Leu	His	Thr	Asn	Asp	Leu	Val	Ser	Ser	Asp	
			260					265					270			
aac	tgc	tac	ttc	gtg	gca	acc	ggc	gtg	acc	aac	ggc	gac	atg	ctc	cgt	864
Asn	Cys	Tyr	Phe	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Thr	Asn	Gly	Asp	Met	Leu	Arg	
		275					280					285				
ggc	ggt	tcc	tac	cgc	gca	aac	ggc	gca	acc	acc	cgt	tcc	ctg	ggt	atg	912
Gly	Val	Ser	Tyr	Arg	Ala	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Arg	Ser	Leu	Val	Met	
	290					295					300					
cgc	gca	aag	tca	ggc	acc	atc	cgc	cac	atc	gag	tct	gtc	cac	cag	ctg	960
Arg	Ala	Lys	Ser	Gly	Thr	Ile	Arg	His	Ile	Glu	Ser	Val	His	Gln	Leu	
				310						315					320	
tcc	aag	ctg	cag	gaa	tac	tcc	gtg	ggt	gac	tac	acc	acc	gcg	acc		1005
Ser	Lys	Leu	Gln	Glu	Tyr	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Thr	Thr	Ala	Thr		
				325					330					335		

<210> 20

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 20

ES 2 376 035 T3

Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp Arg Asn Leu Ala Met Glu
 1 5 10 15

Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu Ala Ser Gly Arg Trp Val
 20 25 30

Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly Ala Ala Val Asp Ala Met
 35 40 45

Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys Gly Val Val Val Ile Gly
 50 55 60

Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu Tyr Asn Gly Glu Glu Val
 65 70 75 80

Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile Ala Val Asp Pro Val Asp
 85 90 95

Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro Asn Ala Ile Ser Ile Leu
 100 105 110

Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr
 115 120 125

Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile
 130 135 140

Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly
 145 150 155 160

Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His
 165 170 175

Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu
 180 185 190

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Gln Asp Ser
 195 200 205

Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile
 210 215 220

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

Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly
 245 250 255

Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp
 260 265 270

Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg
 275 280 285

Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met
 290 295 300

Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu
 305 310 315 320

Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr
 325 330 335
 PF 55757

1

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> PEF-TS-Unidades de expresión

5 <130> 20040509

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 178

<212> DNA

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> Promotor

<222> (1)..(178)

<223>

10 <400> 1

```

ccccacgac aatggaactt tgacttttaa aatttcacg ccgtgggggc ttttgggca 60
gccagcccg cgtgtcgcaa cgtaatcgac tgaatacctg tacgatcact ttttagacgg 120
gcgggtaggg ctactgtgcc ctaacctaag cttgtaaagc attaattatc catacata 178

```

<210> 2

<211> 195

<212> DNA

15 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(195)

<223> Unidad de expresión

20 <400> 2

```

ccccacgac aatggaactt tgacttttaa aatttcacg ccgtgggggc ttttgggca 60
gccagcccg cgtgtcgcaa cgtaatcgac tgaatacctg tacgatcact ttttagacgg 120
gcgggtaggg ctactgtgcc ctaacctaag cttgtaaagc attaattatc catacataag 180
gaggatcgcc ccgta 195

```

<210> 3

<211> 1365

25 <212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1365)

<223>

<400> 3

ES 2 376 035 T3

atg Met 1	aat Asn	gat Asp	gag Glu	aat Asn 5	att Ile	caa Gln	agc Ser	tcc Ser	aac Asn 10	tat Tyr	cag Gln	cca Pro	ttc Phe 15	ccg Pro	agt Ser	48
ttt Phe	gac Asp	gat Asp	tgg Trp 20	aaa Lys	cag Gln	atc Ile	gag Glu	gtg Val 25	tcg Ser	ctc Leu	tta Leu	gat Asp	gtc Val 30	atc Ile	gaa Glu	96
tcc Ser	tca Ser	cgc Arg 35	cat His	ttt Phe	tct Ser	gat Asp	ttg Leu 40	aaa Lys	gat Asp	agc Ser	act Thr	gat Asp 45	cgt Arg	tct Ser	gcg Ala	144
tta Leu	gat Asp 50	gct Ala	gcg Ala	cta Leu	gag Glu	aga Arg 55	gca Ala	aaa Lys	aga Arg	gct Ala	gcc Ala 60	gca Ala	gtt Val	gat Asp	acc Thr	192
aat Asn 65	gcc Ala	ata Ile	gaa Glu	gga Gly	atc Ile 70	ttc Phe	caa Gln	act Thr	gat Asp	cgc Arg 75	ggt Gly	ttt Phe	acc Thr	cat His	aca Thr 80	240
gtt Val	gca Ala	acg Thr	cag Gln	gta Val 85	ggg Gly	gct Ala	tgg Trp	gag Glu	caa Gln 90	caa Gln	atg Met	gcg Ala	atg Met	aaa Lys 95	ggc Gly	288
aaa Lys	cat His	gtt Val	aag Lys 100	cct Pro	gcg Ala	ttt Phe	gac Asp	gat Asp 105	act Thr	cta Leu	gaa Glu	ggc Gly	ttt Phe 110	gag Glu	tat Tyr	336
gtt Val	ctc Leu	gat Asp 115	gca Ala	gta Val	act Thr	ggt Gly	aga Arg 120	act Thr	cca Pro	atc Ile	tct Ser	cag Gln 125	caa Gln	tgg Trp	att Ile	384
aga Arg	aat Asn 130	ttg Leu	cac His	gcc Ala	gtc Val	att Ile 135	ctg Leu	cgg Arg	agc Ser	caa Gln	gaa Glu 140	agc Ser	cac His	gag Glu	gtt Val	432
ttt Phe 145	aca Thr	gcc Ala	gtt Val	gga Gly	gtc Val 150	caa Gln	aat Asn	cag Gln	gcg Ala	ctt Leu 155	cag Gln	aaa Lys	ggc Gly	gag Glu	tat Tyr 160	480
aaa Lys	act Thr	cag Gln	cca Pro	aat Asn 165	agt Ser	cca Pro	cag Gln	cgc Arg	tca Ser 170	gat Asp	gga Gly	tct Ser	gta Val	cat His 175	gca Ala	528
tac Tyr	gcc Ala	cca Pro	gtt Val 180	gaa Glu	gat Asp	act Thr	cct Pro	gct Ala 185	gaa Glu	atg Met	gct Ala	aga Arg	ttt Phe 190	att Ile	tca Ser	576
gaa	ctt	gaa	tct	aag	gaa	ttc	tta	gca	gcc	gag	aag	gtt	att	caa	gct	624

Glu	Leu	Glu	Ser	Lys	Glu	Phe	Leu	Ala	Ala	Glu	Lys	Val	Ile	Gln	Ala		
		195					200					205					
gcc	tat	gcc	cac	tat	gct	ttc	gta	tgt	att	cat	cct	ttt	gca	gat	ggg		672
Ala	Tyr	Ala	His	Tyr	Ala	Phe	Val	Cys	Ile	His	Pro	Phe	Ala	Asp	Gly		
	210					215					220						
aat	gga	cga	ggt	gca	cga	gcc	ttg	gct	agt	gtt	ttt	cta	tac	aaa	gat		720
Asn	Gly	Arg	Val	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Ser	Val	Phe	Leu	Tyr	Lys	Asp		
225					230					235					240		
cct	ggt	gtc	cct	ctc	gta	atc	tac	caa	gat	caa	cgc	aga	gat	tac	atc		768
Pro	Gly	Val	Pro	Leu	Val	Ile	Tyr	Gln	Asp	Gln	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ile		
				245					250					255			
cat	gct	cta	gaa	gca	gcg	gac	aag	aat	aac	ccg	ctc	ctg	ctg	att	aga		816
His	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Asp	Lys	Asn	Asn	Pro	Leu	Leu	Leu	Ile	Arg		
			260					265					270				
ttc	ttt	gct	gaa	cga	gtg	acc	gat	act	att	aac	tct	att	atc	gtt	gat		864
Phe	Phe	Ala	Glu	Arg	Val	Thr	Asp	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ile	Val	Asp		
		275					280					285					
ctc	act	acc	ccg	atc	gcg	ggt	aaa	tct	ggt	tcg	gct	aag	ctt	tcg	gat		912
Leu	Thr	Thr	Pro	Ile	Ala	Gly	Lys	Ser	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Ser	Asp		
	290					295					300						
gcg	cta	cgc	ccc	act	gcg	gta	tta	cca	gaa	tta	cat	gat	gct	gca	cat		960
Ala	Leu	Arg	Pro	Thr	Arg	Val	Leu	Pro	Glu	Leu	His	Asp	Ala	Ala	His		
305					310					315					320		
agg	ctc	caa	gaa	agt	tta	ttt	aca	gaa	atc	cga	tct	cga	ttg	gat	gaa		1008
Arg	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Glu	Ile	Arg	Ser	Arg	Leu	Asp	Glu		
				325					330					335			
gaa	gga	aaa	agg	aat	ggg	ttg	gag	ttt	cta	ctt	caa	cgg	att	ttt	atc		1056
Glu	Gly	Lys	Arg	Asn	Gly	Leu	Glu	Phe	Leu	Leu	Gln	Arg	Ile	Phe	Ile		
			340					345					350				
ggt	tcc	cca	ttc	aat	ctg	cca	gag	ggc	tat	aac	gct	ttc	cct	gat	agc		1104
Gly	Ser	Pro	Phe	Asn	Leu	Pro	Glu	Gly	Tyr	Asn	Ala	Phe	Pro	Asp	Ser		
		355					360					365					
tat	tgt	ctg	acc	tta	gct	ttc	aat	agc	aac	tct	cca	aaa	caa	atc	ttc		1152
Tyr	Cys	Leu	Thr	Leu	Ala	Phe	Asn	Ser	Asn	Ser	Pro	Lys	Gln	Ile	Phe		
	370					375					380						
cac	ccg	cta	tcc	ata	gta	ata	gca	gct	cga	gat	ggg	aaa	aga	gcg	agc		1200
His	Pro	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Ala	Ala	Arg	Asp	Gly	Lys	Arg	Ala	Ser		
385					390					395					400		
agc	gac	ctc	gtg	gca	gct	act	tct	att	gga	tac	aac	ttt	cac	gct	tac		1248
Ser	Asp	Leu	Val	Ala	Ala	Thr	Ser	Ile	Gly	Tyr	Asn	Phe	His	Ala	Tyr		
				405					410					415			
gga	cgt	gaa	gtc	gag	cct	gtt	gtt	act	gaa	agc	ttt	cga	gaa	cgt	gtg		1296
Gly	Arg	Glu	Val	Glu	Pro	Val	Val	Thr	Glu	Ser	Phe	Arg	Glu	Arg	Val		
			420					425					430				
aaa	att	tac	gcc	gac	ggg	att	gta	gat	cac	ttc	tta	acc	gaa	ctg	gct		1344
Lys	Ile	Tyr	Ala	Asp	Gly	Ile	Val	Asp	His	Phe	Leu	Thr	Glu	Leu	Ala		
		435					440					445					
aaa	aag	ttt	caa	cag	aat	taa											1365
Lys	Lys	Phe	Gln	Gln	Asn												
	450																

<211> 454

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 4

ES 2 376 035 T3

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

Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His
 305 310 315 320
 Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu
 325 330 335
 Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile
 340 345 350
 Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser
 355 360 365
 Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe
 370 375 380
 His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser
 385 390 395 400
 Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr
 405 410 415
 Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val
 420 425 430
 Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala
 435 440 445
 Lys Lys Phe Gln Gln Asn
 450

<210> 5

<211> 52

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(52)

<223> Primer

10 <400> 5

cccgatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgta aataccgcac ag 52

<210> 6

<211> 53

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(53)

<223> Primer

<400> 6

tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

10 <210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> Primer

<222> (1)..(47)

<223> Primer

<400> 7

gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

20 <210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> Primer

<222> (1)..(38)

<223> Primer

<400> 8

gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

30 <210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

5 <222> (1)..(34)

<223> Primer

<400> 9

gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tga 34

<210> 10

10 <211> 34

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

15 <222> (1)..(34)

<223> Primer

<400> 10

gagagggcgg ccgctcaagt cggtaagcc acgc 34

<210> 11

20 <211> 140

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

25 <222> (1)..(140)

<223> Primer

<400> 11

tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggta ccacgcgtca tatgactagt 60

tcggacctag ggatatcgtc gacatcgatg ctcttctgcg ttaattaaca attgggatcc 120

tctagaccg ggatttaaat 140

<210> 12

ES 2 376 035 T3

<211> 140

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> Primer

<222> (1)..(140)

<223> Primer

<400> 12

```
gatcatttaa atcccgggct tagaggatcc caattgtaa ttaacgcaga agagcatcga    60
tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgct    120
aggcctctcg agatttaaat                                         140
```

10 <210> 13

<211> 5091

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (15091)..()

<223> Plasmid

<400> 13

ES 2 376 035 T3

tcgatttaaa	tctcgagagg	cctgacgtcg	ggcccggtag	cacgcgtcat	atgactagtt	60
cggacctagg	gatatcgtag	acatcgatgc	tcttctgcgt	taattaacaa	ttgggatcct	120
ctagacccgg	gatttaaadc	gctagcgggc	tgctaaagga	agcggaacac	gtagaaagcc	180
agtccgcaga	aacggtgctg	accccggatg	aatgtcagct	actgggctat	ctggacaagg	240
gaaaacgcaa	gcgcaaagag	aaagcaggta	gcttgcagtg	ggcttacatg	gcgatagcta	300
gactgggcgg	ttttatggac	agcaagcgaa	ccggaattgc	cagctggggc	gccctctggt	360
aaggttggga	agccctgcaa	agtaaactgg	atggctttct	tgccgccaag	gatctgatgg	420
cgcaggggat	caagatctga	tcaagagaca	ggatgaggat	cgtttcgcat	gattgaacaa	480
gatggattgc	acgcaggttc	tccggccgct	tggtgggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	540
gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggagc	600
ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	660
gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgct	720
actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	780
tctcaccttg	ctctgcccga	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgag	gcggctgcat	840
acgcttgatc	cggctacctg	cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	900
cgtactcgga	tggaagccgg	tcttgtcgat	caggatgatc	tggaagcaga	gcatcagggg	960
ctcgcgccag	ccgaactggt	cgccaggctc	aaggcgcgca	tgcccagcgg	cgaggatctc	1020
gtcgtgacct	atggcgtatg	ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaagcagg	ccgcttttct	1080
ggattcatcg	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	agcgttggtc	1140
acccgtgata	ttgctgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttcct	cgtgctttac	1200

ES 2 376 035 T3

ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 1260
 tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 1320
 atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa gggtgggctt cggaatcggt ttccgggacg 1380
 ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg 1440
 gcgcgccggc cggcccggtg tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc 1500
 aggcgctctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgctcg gctgcggcga 1560
 gcggtatcag ctcaactcaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcggtg 1680
 ctggcgtttt tccataggct ccgccccctc gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 1740
 cagaggtggc gaaaccgcac aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc 1800
 ctcgtgcgct ctctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860
 tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920
 gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgvcctta 1980
 tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040
 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100
 tggtgcccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2160
 ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaac caccgctggt 2220
 agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa 2280
 gatcctttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 2340
 attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ggccggccgc 2400
 ggccgcgcaa agtcccgtt cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460
 ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgcatg acctcacga cgaagtacta aaattggccc 2520
 gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580
 gtcgatttaa aaacggtgat cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640
 tcacgagact gggccagtgc cgcgagcgac ctagaaactc tcgtggcggg tcttgaggag 2700
 ctggctgacg agctgcgctc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760
 atcagttgcg cctactgcgg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggacggcgc 2820
 gcaaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcgc caacaaacgc 2880
 cacgccgagg agctggaggc ggctaggtcg caaatggcgc tggaaagtgcg tccccgagc 2940
 gaaattttg ccattggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg 3000
 gcggtgcccg caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060
 aggacgtgct agcgcgccca ccacctgcac cgaatcgga gcagcgtcgc gcgtcgaaaa 3120
 agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180
 gtgagcggta actcacaggc cgctcggctaa cccccagtcc aaacctggga gaaagcgtc 3240
 aaaaatgact ctacgggatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300
 tctgttcgac accatccccg agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360
 ccgcgaattc ctcgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420
 cgccagcgtc tggatcaaa gaccggacac ggagaaacac agccgaagt ataccgagtt 3480

ggttcaaaat cgcttgcccc gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgca gcacgcagcc 3540
 gtgcttgtcc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaat cgagcacgta 3600
 aaccccgagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttgg 3660
 atcggcgtga atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720
 gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgcctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780
 acccgcgttt tcggcgtga ccaggctttt tcacataggc tgagccgtgg cactgcaact 3840
 ctccgacgat cccagccgta ccgctggcat gccagcaca atcgcgtgga tcgcctagct 3900
 gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggacagaaa aacctaaaa acgctatgag 3960
 caggagtttt ctagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020
 aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcggcg ctgaagcgtc tggagagctg 4080
 atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccaggggcgtg ccgcccgtga tgagacggct 4140
 tttcgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200
 accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggg cggaggaggc 4260
 cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggcccg acgtgtgctg 4320
 ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380
 ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
 tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcgag aaaaactagc taagtccagt 4500
 caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcaggttg gtttatgact 4560
 gttgaggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
 tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680
 ccgaaagctt cccagtaaat gtgccatctc gtaggcagaa aacggttccc ccgtagggtc 4740
 tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct aggggggctc 4800
 acaccatagg cagataacgt tccccaccg ctcgcctcgt aagcgcacaa ggactgctcc 4860
 caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaaattt 4920
 cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980
 tggattctta ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcgtcccc tgatcgcct tgcgacgttg 5040
 gcgtcgggtg cgctgggtg gcttggcttg accgacttga tcagcggccg c 5091

<210> 14

<211> 32

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> Primer

<222> (1)..(32)

<223> Primer

<400> 14

gtgtgtcgac ttgatgtag aactcgatgt ag 32

5 <210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <221> Primer

<222> (1)..(17)

<223> Primer

<400> 15

atgccacccc tcgcgcc 17

15 <210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <221> Primer

<222> (1)..(28)

<223> Primer

<400> 16

gagaggatcc cccccacgac aatggaac 28

25 <210> 17

<211> 44

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <221> Primer

<222> (1)..(44)

ES 2 376 035 T3

<223> Primer

<400> 17

cctgaaggcg cgaggggtggg cattacgggg cgatcctcct tatg 44

<210> 18

5 <211> 6389

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(6389)

<223> Plasmid

<400> 18

ES 2 376 035 T3

tcgatttaa	tctcgagagg	cctgacgtcg	ggcccggtag	cacgcgcat	atgactagtt	60
cggacctagg	gatatcgctc	acttagatgt	agaactcgat	gtaggtcgaa	gggttgctct	120
cgtctgggga	gatgaggctg	aagaagtcc	tcacgatgcg	atccatttg	cggtttcgg	180
tgaggaaagc	atcgtggccg	acaggggata	cgatttttgc	cattgccagt	agatttccca	240
ggtttctgga	gaggtgttct	tgctggtggt	aggggtacaa	aatatcggt	tctacgcctg	300
cgacaaggac	tggaactttg	atggattcga	gtgccttggt	gaggcctccg	cggtcgcgac	360
caatgctcgtg	gcggttgagg	gcgtcgggta	gcaagacgta	ggagccggcg	tcgaaacgct	420
gtactagctt	gtctgcttgg	tagtccaagt	aggattccac	ggcgaagcgc	tggtcgggct	480
tgcggtaggg	accgagtggg	tttctgttct	tttgggcttt	ggtgccgaag	cgttcgtcga	540
tttctagttc	gccacggtag	gtgaggtggg	cgatgcgtcg	ggcggcgccg	agtccggtgg	600
ctgggttgca	gccggattcg	tagtagttgc	cttcgtgcc	gtggtggtcg	ttttcaatcg	660
ccttaatttg	ggcggattga	atgccgattt	gccaggcgc	ggcgcgtgca	gaaactgcaa	720
gaacagcagc	tcgccaaca	gtttctgggt	acattgcggc	ccactctagg	gtgcggggac	780
cacccatgga	accaccaagt	actgcggcga	ccgtggtgat	gccgagtgcg	tcgaggaatt	840
gtttttcggc	gtttacctga	tcacgaatgg	acgtggcggg	gaagcgatta	cccagaaat	900
ttccatctgg	atgcatggag	ccagggtccg	tggaaccggt	gcaaccaccg	atgacgttgg	960
tacagatcac	gcagtaaata	tcagtgttga	tggctttgcc	gggaccgagc	aagtcagccc	1020
accaatcggc	tcggttgaa	tctccagtga	gggcgtgttc	gatgagaacg	acattgctgc	1080
gtccttcttt	atctacgagg	tattcacccc	agcggtgata	ggcgatttca	gcgtttgtaa	1140
tgattgctcc	ggcttcggtg	gagacatcac	cgatcgcttg	gatttcaagt	tgacctgaag	1200
gcgcgagggg	gggcattacg	gggcgatcct	ccttatgtat	ggataattaa	tgctttacaa	1260
gcttaggtta	gggcacagta	gccctacccg	cccgtctaaa	aagtgatcgt	acaggtattc	1320
agtcgattac	gttgcgacac	ggcgggctgg	ctgccccaaa	agccccacg	gcgatgaaat	1380
tttaaaagtc	aaagtcccat	tgctgtgggg	gggatcctct	agaccggga	tttaaatcgc	1440
tagcgggctg	ctaaaggaag	cggaacacgt	agaaagccag	tccgcagaaa	cggtgctgac	1500
cccggatgaa	tgctagctac	tgggctatct	ggacaaggg	aaacgcaagc	gcaaagagaa	1560
agcaggtagc	ttgcagtggg	cttacatggc	gatagctaga	ctgggcgggt	ttatggacag	1620
caagcgaacc	ggaattgcc	gctggggcgc	cctctggtaa	ggttgggaag	ccctgcaaag	1680

taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca agatctgatc 1740
 aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 1800
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 1860
 ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 1920
 acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 1980
 cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 2040
 tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttget cctgccgaga 2100
 aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 2160
 cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc 2220
 ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 2280
 ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat ggcgatgcct 2340
 gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttcttg attcatcgac tgtggccggc 2400
 tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgatgatatt gctgaagagc 2460
 ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tategccgct cccgattcgc 2520
 agcgcacatc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga 2580
 aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgccgcctt 2640
 ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg 2700
 cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgccggccg gcccggtgtg 2760
 aaataaccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttcctcgc 2820
 tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg 2880
 cggaataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaaag 2940
 gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc 3000
 gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag 3060
 gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga 3120
 ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctccctc ggggaagcgtg gcgctttctc 3180
 atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg 3240
 tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt 3300
 ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca 3360
 gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca 3420
 ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag 3480
 ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca 3540
 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg 3600
 ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtaagggat tttggctatg agattatcaa 3660
 aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgagg ccgcgcaaag tcccgcttcg 3720
 tgaaaatttt cgtgccgcgt gattttccgc caaaaacttt aacgaacggt cgttataatg 3780
 gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga atcatcagct atggatctct 3840
 ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgctcg atgctgccgt cgatttaaaa acggtgatcg 3900
 gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc acgagactgg gccagtgccg 3960

cgagcgacct agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct ggctgacgag ctgctgctc 4020
 ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat cagttgccc tactgcggtg 4080
 gcctgattcc tccccggcct gaccgcgag gacggcgcgc aaaatattgc tcagatcggt 4140
 gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca cgccgaggag ctggaggcgg 4200
 ctaggtcgca aatggcgtg gaagtgcgtc ccccgagcga aattttgcc atggtcgta 4260
 cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc ggtgcccgca ggcatgacaa 4320
 acatcgtaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag gacgtgtcag cgccgccacc 4380
 acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag cgcacaggcg gcaagaagcg 4440
 ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt gagcggtaac tcacaggcgg 4500
 tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgtcaa aaatgactct agcggattca 4560
 cgagacattg acacaccggc ctggaaatth tccgctgatc tgttcgacac ccatcccag 4620
 ctcgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc gcgaattcct cgctcacctg 4680
 ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg ccagcgttg gatcaaagac 4740
 ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg ttcaaatcg cttgcccgg 4800
 gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt gcttgtcctg gacattgatg 4860
 tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaa ccccgaggtc tacgcgattt 4920
 tggagcgtg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat cggcgtgaat cactgagcg 4980
 ggaaatgcca gctcatctgg ctcatctgat cgggtgatgc cgcagcaggc atgagcagcc 5040
 cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac ccgcgttttc ggcgctgacc 5100
 aggctttttc acataggctg agccgtggcc actgcaactc ccgacgatcc cagccgtacc 5160
 gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga tcttatggag gttgctcgca 5220
 tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca ggagttttct agcggacggg 5280
 cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaagcaaa agcacttgcc acgcttgaag 5340
 caagcctgcc gagcgcgct gaagcgtctg gagagctgat cgacggcgtc cgtgtcctct 5400
 ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg agacggcttt tcgccacgct ttgactgtgg 5460
 gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgc taaaagacac caagggtcat cgagcctacg 5520
 agcgtgccta caccgtcgt caggcggctg gaggaggccg tgagcctgat ctgccgccgg 5580
 actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgagg ctacgtcgt aaaggccagc 5640
 cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc gaggcgaaaa gctctggcca 5700
 ctatgggaag acgtggcggg aaaaaggccg cagaacgctg gaaagaccca aacagtgagt 5760
 acgcccgagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca acgacaagct aggaaagcta 5820
 aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttggg ttatgactgt tgaggagag actggctcgt 5880
 ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc acgtcagacc gtgaatagag 5940
 cacttaaggt ctgcccggcat tgaacttcca cgaggacgcc gaaagcttcc cagtaaatgt 6000
 gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggcttc tctcttggcc tcctttctag 6060
 gtcgggctga ttgctctga agctctctag gggggctcac accataggca gataacgttc 6120
 cccaccggct cgctcgtaa gcgcacaagg actgctcca aagatcttca aagccactgc 6180
 cgcgactgcc ttcgcaagc cttgccccgc ggaatttcc tccaccgagt tcgtgcacac 6240

ES 2 376 035 T3

```
ccctatgcca agcttctttc accctaaatt cgagagattg gattcttacc gtggaaattc 6300
ttcgcaaaaa tcgtcccctg atcgcccttg cgacgttggc gtcggtgccg ctggttgcg 6360
ttggcttgac cgacttgatc agcggccgc 6389
```

7

<210> 19

<211> 1005

5 <212> DNA

<213> corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1005)

10 <223>

<400> 19

ES 2 376 035 T3

atg aac cta aag aac ccc gaa acg cca gac cgt aac ctt gct atg gag Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp Arg Asn Leu Ala Met Glu 1 5 10 15	48
ctg gtg cga gtt acg gaa gca gct gca ctg gct tct gga cgt tgg gtt Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu Ala Ser Gly Arg Trp Val 20 25 30	96
gga cgt ggc atg aag aat gaa ggc gac ggt gcc gct gtt gac gcc atg Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly Ala Ala Val Asp Ala Met 35 40 45	144
cgc cag ctc atc aac tca gtg acc atg aag ggc gtc gtt gtt atc ggc Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys Gly Val Val Val Ile Gly 50 55 60	192
gag ggc gaa aaa gac gaa gct cca atg ctg tac aac ggc gaa gag gtc Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu Tyr Asn Gly Glu Glu Val 65 70 75 80	240
gga acc ggc ttt gga cct gag gtt gat atc gca gtt gac cca gtt gac Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile Ala Val Asp Pro Val Asp 85 90 95	288
ggc acc acc ctg atg gct gag ggt cgc ccc aac gca att tcc att ctc Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro Asn Ala Ile Ser Ile Leu 100 105 110	336
gca gct gca gag cgt ggc acc atg tac gat cca tcc tcc gtc ttc tac Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr 115 120 125	384
atg aag aag atc gcc gtg gga cct gag gcc gca ggc aag atc gac atc Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile 130 135 140	432
gaa gct cca gtt gcc cac aac atc aac gcg gtg gca aag tcc aag gga Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly 145 150 155 160	480
atc aac cct tcc gac gtc acc gtt gtc gtg ctt gac cgt cct cgc cac Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His 165 170 175	528

atc gaa ctg atc gca gac att cgt cgt gca ggc gca aag gtt cgt ctc	576
Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu	
180 185 190	
atc tcc gac ggc gac gtt gca ggt gca gtt gca gca gct cag gat tcc	624
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Gln Asp Ser	
195 200 205	
aac tcc gtg gac atc atg atg ggc acc ggc gga acc cca gaa ggc atc	672
Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile	
210 215 220	
atc act gcg tgc gcc atg aag tgc atg ggt ggc gaa atc cag ggc atc	720
Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile	
225 230 235	
ctg gcc cca atg aac gat ttc gag cgc cag aag gca cac gac gct ggt	768
Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly	
245 250 255	
ctg gtt ctt gat cag gtt ctg cac acc aac gat ctg gtg agc tcc gac	816
Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp	
260 265 270	
aac tgc tac ttc gtg gca acc ggt gtg acc aac ggt gac atg ctc cgt	864
Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg	
275 280 285	
ggc gtt tcc tac cgc gca aac ggc gca acc acc cgt tcc ctg gtt atg	912
Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met	
290 295 300	
cgc gca aag tca ggc acc atc cgc cac atc gag tct gtc cac cag ctg	960
Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu	
305 310 315 320	
tcc aag ctg cag gaa tac tcc gtg gtt gac tac acc acc gcg acc	1005
Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr	
325 330 335	

<210> 20

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 20

ES 2 376 035 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Método para modificar o causar la rata de transcripción de genes en microorganismos en comparación con el tipo silvestre mediante regulación de la transcripción de genes en el microorganismo por ácidos nucleicos con actividad de promotor, que contiene

5 A) la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 o

B) una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o deleción de nucleótidos, que tiene una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ.ID.NO. 1 o

C) una secuencia de ácido nucleico que hibrida con la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 en condiciones estrictas,

10 en cuyo caso los genes respecto de los ácidos nucleicos con actividad de promotor son heterólogos.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo por los ácidos nucleicos con actividad de promotor se logra

15 b1) introduciendo al genoma del microorganismo uno o varios de los ácidos nucleicos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, de tal modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad de promotor o

b2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de tal modo que la transcripción de uno o varios genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, o

20 b3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen un ácido nucleico con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, y conectando funcionalmente uno o varios de los ácidos nucleicos a transcribir.

25 3. Método según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque para aumentar o causar la rata de transcripción de genes en microorganismos en comparación con el tipo silvestre se regula la transcripción de genes en el microorganismo por ácidos nucleicos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 1, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad de promotor.

4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo por ácidos nucleicos con actividad de promotor se logra

30 bh1) introduciendo al genoma del microorganismo uno o varios de los ácidos nucleicos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor incrementada específica, de tal modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad de promotor o

35 bh2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de tal modo que la transcripción de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor elevada específica o

bh3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contiene un ácido nucleico con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 1, opcionalmente con actividad de promotor elevada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribir.

40 5. Método según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dioles, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas, en cuyo caso los genes pueden obtener opcionalmente otros elementos de regulación.

6. Método según la reivindicación 5, caracterizado porque las proteínas de la vía de biosíntesis de aminoácidos se seleccionan del grupo de aspartato-quinasa, aspartato-semialdehído-dehidrogenasa, diaminopimelato-dehidrogenasa, diaminopimelato-decarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato-reductasa, glicerina-aldehído-3-fosfato-dehidrogenasa, 3-fosfoglicerato-quinasa, piruvato-carboxilasa, triosa-fosfato isomerasa, regulador de transcripción LuxR, regulador de transcripción LisR1, regulador de transcripción LisR2, malato-quinona-oxireductasa, glucosa-6-Ffosfato-dehidrogenasa, 6-fosfogluconato-dehidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahionina-gamma-sintasa, cistahionina-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metileno-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserina-dehidrogenasa, homoserina-quinasa, treonina-sintasa, exportador – soporte de treonina, treonina-dehidratasa, piruvato-oxidasa, exportador de lisina, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, metionina-sintasa dependiente de coenzima B12, metionina-sintasa independiente de coenzima B12, sulfatadeniltransferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina-sulfito-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3-fosfoglicerato dehidrogenasa, regulador RXA00655, regulador RXN2910, arginilo-ARN-t-sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína de eflujo de treonina, serinhidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-bifosfatasa, proteína de la reducción de sulfato RXA077, proteína de la reducción de sulfato RXA248, proteína de la reducción de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructoquinasa y 6-fosfofructoquinasa.

7. Microorganismo genéticamente modificado en el cual la modificación genética conduce a modificar o a causar la rata de transcripción de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre y depende de la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo por ácidos nucleicos con actividad de promotor que contienen

20 A) la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 o

B) una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ.ID.NO. 1 o

C) una secuencia de ácido nucleico que hibrida con la secuencia de ácido nucleico SEQ.ID.NO. 1 en condiciones estrictas,

25 en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad de promotor.

8. Microorganismo genéticamente modificado según la reivindicación 7, caracterizado porque la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo por ácidos nucleicos con actividad de promotor se logra

30 b1) introduciendo al genoma del microorganismo uno o varios de los ácidos nucleicos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, de tal modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad de promotor o

b2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de tal modo que la transcripción de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, o

35 b3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico, que contienen un ácido nucleico con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor modificada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribir.

9. Microorganismo genéticamente modificado según la reivindicación 7 u 8 con rata de transcripción elevada o causada de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre, caracterizado porque la transcripción de genes en el microorganismo se regula por ácidos nucleicos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 7, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad de promotor.

40 10. Microorganismo genéticamente modificado según la reivindicación 9, caracterizado porque la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo por los ácidos nucleicos con actividad de promotor se logra

45 bh1) introduciendo al genoma del microorganismo uno o varios de los ácidos nucleicos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor aumentada específica, de tal modo que la transcripción de uno o varios genes endógenos se efectúa bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad de promotor, o

50 bh2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de tal modo que la transcripción de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor elevada específica, o

bh3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen un ácido nucleico con actividad de promotor de acuerdo con la reivindicación 7, opcionalmente con actividad de promotor elevada específica, y conectando funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribir.

- 5 11. Microorganismo genéticamente modificado según una de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado porque los genes se seleccionan del grupo de los ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dioles, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas, en cuyo caso los genes pueden contener opcionalmente otros elementos de regulación.
- 10
- 15 12. Microorganismo genéticamente modificado según la reivindicación 11, caracterizado porque las proteínas de la vía de biosíntesis de aminoácidos se seleccionan del grupo de aspartatoquinasa, aspartato-semialdehído-dehidrogenasa, diaminopimelato-dehidrogenasa, diaminopimelato-decarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato-reductasa, gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa, 3-fosfoglicerato-quinasa, piruvato-carboxilasa, triosafosfato-isomerasa, regulador de transcripción LuxR, regulador de transcripción LisR1, regulador de transcripción LisR2, malato-quinona-oxireductasa, glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa, 6-fosfogluconato-dehidrogenasa, transquetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahioningamma-sintasa, cistahionin-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metilen-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserina-dehidrogenasa, homoserina-quinasa, treonina-sintasa, exportador – soporte de treonina, treonina-dehidratasa, piruvato-oxidasa, exportador de lisina, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, metionin-sintasa dependiente de coenzima B12, metionina-sintasa independiente de coenzima B12, sulfatadeniltransferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina-sulfito-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3-fosfoglicerato dehidrogenasa, regulador RXA00655, regulador RXN2910, arginilo-ARN-t-sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína de eflujo de treonina, serinhidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-bifosfatasa, proteína de la reducción de sulfato RXA077, proteína de la reducción de sulfato RXA248, proteína de la reducción de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructoquinasa y 6-fosfofructoquinasa.
- 20
- 25
- 30