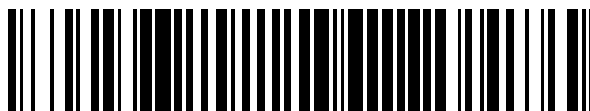


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 607**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 19/32 (2006.01)

C12P 19/40 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2007 E 07741792 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2011860**

54 Título: **Bacteria que puede producir una sustancia de purina y procedimiento para producir una sustancia de purina**

30 Prioridad:

24.04.2006 JP 2006119315

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

23.04.2013

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**ASAHARA, TAKAYUKI;
MATSUNO, KIYOSHI y
MORI, YUKIKO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 401 607 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

Bacteria que puede producir una sustancia de purina y procedimiento para producir una sustancia de purina.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir sustancias derivadas de purina, tales como nucleótidos de purina, incluyendo típicamente el ácido 5'-inosínico y el ácido 5'-guanílico, y nucleótidos de purina tales como la inosina y la guanosina, las cuales son sustancias importantes como materias primas para la síntesis de los nucleótidos de purina, utilizando una bacteria perteneciente al género *Bacillus* utilizada para el procedimiento. Las sustancias derivadas de purina resultan útiles como condimentos, fármacos, materias primas de los mismos, y otros.

15 **Antecedentes de la técnica**

Son conocidos procedimientos para producir inosina y guanosina mediante la fermentación utilizando cepas auxotróficas de adenina de bacterias *Bacillus* y derivados de las mismas dotadas adicionalmente de resistencia a diversos fármacos, tales como análogos de purina (documentos de patente nº 1 a nº 8), y microorganismos de este tipo del género *Brevibacterium* (documentos de patente nº 9 y nº 10, documento no de patente nº 1), etc.

20 Dichas cepas mutantes típicamente se obtienen mediante tratamiento de un microorganismo con irradiación ultravioleta o nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) y selección de un mutante diana utilizando un medio de selección adecuado.

25 Además, también se han cultivado cepas que producen sustancias derivadas de purina utilizando técnicas de ingeniería genética en bacterias *Bacillus* (documentos de patente nº 11 a nº 20), en bacterias *Brevibacterium* (documento de patente nº 21) y bacterias *Escherichia* (documento de patente nº 22). Específicamente, por ejemplo, se da a conocer un procedimiento para producir eficientemente un compuesto derivado de ácidos nucleicos, tal como hipoxantina, uracilo, guanina y adenina con una bacteria *Bacillus* en la que se ha interrumpido un gen (*purR*) codificante del represor del operón de la purina (documento de patente nº 23).

30 En *Bacillus subtilis*, el represor del operón de la purina tal como se ha indicado anteriormente es conocido que regula, aparte de los genes del operón de la purina, el gen *purA*, que participa en la biosíntesis del AMP (documento no de patente nº 2), el gen *glyA*, que participa en la biosíntesis del ácido formiltetrahidrofólico (documento no de patente nº 3), el gen *pbuG*, que codifica el transportador de hipoxantina/guanina (documento no de patente nº 4), y otros.

35 Además, se da a conocer un microorganismo que produce eficientemente inosina derivado al proporcionar auxotrofia de la adenina mediante la interrupción del gen de la succinil-AMP sintasa (*purA*), además de la interrupción del gen *purR* y la supresión de la descomposición de la inosina en hipoxantina por la interrupción del gen de la purina nucleósido fosforilasa (*deoD*), y un procedimiento para producir inosina utilizando el microorganismo (documento de patente nº 8).

40 La fructosa bisfosfatasa es uno de los enzimas gluconeogénicos, que cataliza la reacción de generación de fructosa-6-fosfato a partir de fructosa-1,6-bisfosfato. Se conoce poco sobre la relación entre este enzima y la ruta biosintética de las sustancias derivadas de purinas y no se ha intentado producir una bacteria productora de sustancia derivada de purina mediante la reducción de la actividad de este enzima.

45 Documento de patente nº 1: publicación de patente japonesa (KOKOKU) nº 38-23099.

50 Documento de patente nº 2: publicación de patente japonesa nº 54-17033.

Documento de patente nº 3: publicación de patente japonesa nº 55-2956.

55 Documento de patente nº 4: publicación de patente japonesa nº 55-45199.

Documento de patente nº 5: publicación de patente japonesa nº 57-14160.

60 Documento de patente nº 6: publicación de patente japonesa nº 57-41915.

Documento de patente nº 7: patente japonesa abierta al público (KOKAI) nº 59-42895.

Documento de patente nº 8: patente japonesa abierta al público nº 2004-242610.

65 Documento de patente nº 9: publicación de patente japonesa nº 51-5075.

Documento de patente nº 10: publicación de patente japonesa nº 58-17592.

Documento de patente nº 11: patente japonesa abierta al público nº 58-158197.

5 Documento de patente nº 12: patente japonesa abierta al público nº 58-175493.

Documento de patente nº 13: patente japonesa abierta al público nº 59-28470.

10 Documento de patente nº 14: patente japonesa abierta al público nº 60-156388.

Documento de patente nº 15: patente japonesa abierta al público nº 1-27477.

Documento de patente nº 16: patente japonesa abierta al público nº 1-174385.

15 Documento de patente nº 17: patente japonesa abierta al público nº 3-58787.

Documento de patente nº 18: patente japonesa abierta al público nº 3-164185.

20 Documento de patente nº 19: patente japonesa abierta al público nº 5-84067.

Documento de patente nº 20: patente japonesa abierta al público nº 5-192164.

Documento de patente nº 21: patente japonesa abierta al público nº 63-248394.

25 Documento de patente nº 22: publicación de patente internacional nº WO99/03988

Documento de patente nº 23: patente US nº 6.284.495.

30 Documento no de patente nº 1: Agric. Biol. Chem. 42:399-405, 1978.

Documento no de patente nº 2: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7455-7459, 1995.

Documento no de patente nº 3: J. Bacteriol. 183:6175-6183, 2001.

35 Documento no de patente nº 4: J. Bacteriol. 185:5200-5209, 2003.

Exposición de la invención

Objetivos que deben ser alcanzados por la invención

40 Un objetivo de la presente invención es construir una bacteria *Bacillus* adecuada para la producción mediante fermentación de sustancias derivadas de purinas, tales como nucleósidos purina y/o nucleótidos purina, y proporcionar un procedimiento para producir sustancias derivadas de purina utilizando dicha bacteria.

Medios para alcanzar el objetivo

50 En el contexto de la presente invención se han llevado a cabo diversas investigaciones con el fin de alcanzar el objetivo anteriormente indicado. En consecuencia, se ha descubierto que, al reducir la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa de la ruta de la gluconeogénesis en una bacteria *Bacillus*, se mejora la capacidad de la bacteria de producir un nucleósido de purina o un nucleótido pura, y han llevado a cabo la presente invención.

De esta manera, la presente memoria da a conocer lo siguiente.

55 (1) Una bacteria perteneciente al género *Bacillus* que presenta la capacidad de producir sustancias derivadas de purinas, en la que la bacteria ha sido modificada de manera que se ha reducido la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa.

60 (2) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, en la que la sustancia derivada de purina es un nucleósido de purina seleccionado de entre el grupo que consiste en inosina, xantosina, guanosina y adenosina.

(3) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, en la que la sustancia derivada de purina es un nucleótido de purina seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido inosínico, ácido xantílico, ácido guanílico y ácido adenílico.

65

(4) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, en la que se ha reducido la actividad de fructosa bisfosfatasa mediante la interrupción de un gen codificante de la fructosa bisfosfatasa.

(5) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, en la que el gen codificante de la fructosa bisfosfatasa es un gen codificante de una de las proteínas (A) o (B) siguientes:

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1,

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 que incluye sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones o inversiones de uno o varios residuos aminoácidos y presenta actividad de fructosa bisfosfatasa.

(6) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, que ha sido modificada adicionalmente de manera que se incrementa la actividad de la fosforibosil pirofosfato sintetasa.

(7) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, que se ha modificado adicionalmente de manera que se incremente la cantidad de expresión del operón de purina.

(8) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, en la que la cantidad de expresión del operón de purina se incrementa mediante la interrupción del gen *purR*, que es un gen codificante de un represor del operón de purina.

(9) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, que ha sido modificada adicionalmente de manera que se reduzca la actividad de nucleósido de purina fosforilasa.

(10) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, que ha sido modificada adicionalmente de manera que se ha reducido la actividad de IMP deshidrogenasa.

(11) La bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente, que es *Bacillus subtilis*.

(12) Un procedimiento para producir una sustancia derivada de purina, que comprende cultivar la bacteria perteneciente al género *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente en un medio con el fin de provocar la acumulación de una sustancia derivada de purina en células de la bacteria o en el medio, y recoger la sustancia derivada de purina de las células o del medio.

(13) El procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, en el que la sustancia derivada de purina es un nucleósido de purina o un nucleótido de purina.

(14) El procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, en el que la sustancia derivada de purina es un nucleósido de purina seleccionado de entre el grupo que consiste de inosina, xantosina, guanosina y adenosina.

(15) El procedimiento tal como se ha descrito anteriormente, en el que la sustancia derivada de purina es un nucleótido de purina seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido inosínico, ácido xantílico, ácido guanílico y ácido adenílico.

(16) Un procedimiento para producir un nucleótido de purina, que comprende producir un nucleósido de purina mediante el procedimiento descrito anteriormente, hacer reaccionar el nucleósido de purina con un donante de fosfatos seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido polifosfórico, fosfato de fenilo y fosfato de carbamilo, y un microorganismo que presenta la capacidad de producir un éster de ácido nucleósido-5'-fosfórico o fosfatasa ácida para producir un nucleótido de purina, y recoger el nucleótido de purina.

Mejor modo de poner en práctica la invención

<1> Bacteria *Bacillus*

(I) Provisión de la capacidad de producir una sustancia derivada de purina.

En la presente invención, la expresión "de actividad reducida" comprende un estado en que la actividad es inferior a la actividad en una cepa no modificada, tal como una bacteria *Bacillus* de tipo salvaje, y un estado en el que la actividad ha sido sustancialmente eliminada.

La bacteria *Bacillus* indicada en la presente memoria es una bacteria *Bacillus* que presenta la capacidad de producir una sustancia derivada de purina y que ha sido modificada de manera que la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa ha sido reducida.

La expresión "sustancia derivada de purina" se refiere a una sustancia que presenta un esqueleto de purinas, y entre los ejemplos de la misma se incluyen los nucleósidos de purina, los nucleótidos de purina, etc. Entre los nucleósidos

de purina se incluyen inosina, xantosina, guanosina, adenosina y otros, y entre los nucleótidos de purina se incluyen los ésteres de ácido 5'-fosfórico de nucleósidos de purina, denominados en adelante "IMP"), ácido xantílico (xantosín-5'-fosfato, en adelante también denominada "XMP"), ácido guanílico (guanosín-5'-monofosfato, en adelante denominado "GMP"), ácido adenílico (adenosín-5'-monofosfato, en adelante denominado "AMP"), y otros.

La expresión "capacidad de producir una sustancia derivada de purina" se refiere a la capacidad de la bacteria *Bacillus* indicada en la presente memoria de producir, secretar o causar la acumulación de una sustancia derivada de purina en las células bacterianas o en un medio en el que se cultiva la bacteria, en grado suficiente para poder recoger la sustancia derivada de purina a partir de las células o del medio. La bacteria *Bacillus* indicada en la presente memoria puede presentar una capacidad de producir dos o más tipos de las sustancias derivadas de purina anteriormente indicadas.

La bacteria *Bacillus* que presenta la capacidad de producir una sustancia derivada de purina puede ser una bacteria que presenta inherentemente la capacidad de producir una sustancia derivada de purina, o una bacteria obtenible mediante la modificación de dichas bacterias *Bacillus* tal como se indica posteriormente utilizando una técnica de mutagénesis o de ADN recombinante de manera que presenten la capacidad de producir una sustancia derivada de purina. Además, puede ser una bacteria *Bacillus* a la que se proporciona la capacidad de producir una sustancia derivada de purina o en la que se incrementa la capacidad de producir una sustancia derivada de purina mediante la modificación de la bacteria de manera que se reduzca la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa, de la manera descrita posteriormente.

En la presente invención, la expresión "se reduce la actividad enzimática" comprende un estado en el que la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa indicada anteriormente o un enzima que descompone una sustancia derivada de purina indicada posteriormente, tal como la inosina monofosfato (IMP) deshidrogenasa o similar, es inferior a la de una cepa no modificada, por ejemplo una cepa de tipo salvaje de la bacteria *Bacillus*, y un estado en el que la actividad ha sido sustancialmente eliminada. Lo mismo resulta de aplicación a la actividad del represor de operón de purina indicado posteriormente.

Entre los ejemplos de la bacteria *Bacillus* utilizada para la bacteria *Bacillus* del presente procedimiento se incluyen *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus pumilus*.

Entre los ejemplos de *Bacillus subtilis* se incluyen *Bacillus subtilis* 168 Marburg (ATCC nº 6051), *Bacillus subtilis* PY79 (Plasmid 12:1-9, 1984) y otros, y entre los ejemplos de *Bacillus amyloliquefaciens* se incluyen *Bacillus amyloliquefaciens* T (ATCC nº 23842), *Bacillus amyloliquefaciens* N (ATCC nº 23845), y otros. Entre los ejemplos de *Bacillus pumilus* se incluyen *Bacillus pumilus* Gottheil nº 3218 (ATCC nº 21005, patente US nº 3.616.206), y otros. Estas cepas pueden obtenerse de la American Type Culture Collection (dirección: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos de América).

Puede obtenerse una bacteria *Bacillus* que presenta la capacidad de producir una sustancia derivada de purina proporcionando, por ejemplo, auxotrofia de nucleósido de purina o resistencia a un fármaco tal como un análogo de purina, a dicha bacteria *Bacillus* tal como se ha indicado anteriormente (publicaciones de patente japonesa nº 38-23099, nº 54-17033, nº 55-45199, nº 57-14160, nº 57-41915 y nº 59-42895). Puede obtenerse una bacteria *Bacillus* que presente auxotrofia o resistencia a fármacos mediante el tratamiento de la bacteria con mutágeno utilizado para la mutagénesis habitual, tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o EMS (metanosulfonato de etilo).

Entre los ejemplos de bacterias *Bacillus* que producen un nucleósido de purina se incluyen los siguientes.

A título de ejemplo específico de cepa productora de inosina perteneciente al género *Bacillus*, puede utilizarse la cepa *Bacillus subtilis* KMBS16. Esta cepa se deriva de la cepa conocida *Bacillus subtilis* trpC2 (168 Marburg), en la que se encuentran interrumpidos el gen *purR* codificante del represor de operón de purina (*purR::spc*), el gen *purA* codificante de la succinil-AMP sintasa (*purA::erm*) y el gen *deoD* codificante de una nucleósido de purina fosforilasa (*deoD::kan*) (patente japonesa abierta al público nº 2004-242610, documento US 2004/166575A1). También puede utilizarse la cepa *Bacillus subtilis* AJ3772 (FERM P-2555, patente japonesa abierta al público nº 62-014794) y otros.

Entre los ejemplos de bacterias *Bacillus* que presentan una capacidad de producir guanosina se incluyen una bacteria *Bacillus* que presenta una actividad de IMP deshidrogenasa incrementada (patente japonesa abierta al público nº 3-58787), una bacteria *Bacillus* que se obtiene mediante la introducción de un vector que comprende un gen que proporciona resistencia a análogos de purina o a decoyinina en un mutante auxotrófico para la adenina (publicación de patente japonesa nº 4-28357) y otros.

Entre los ejemplos de bacterias *Bacillus* que producen un nucleótido de purina se incluyen los siguientes.

A modo de bacteria *Bacillus* productora de ácido inosínico, se ha informado de cepas productoras de inosina de *Bacillus subtilis* que presentan actividad de fosfatasa atenuada (Uchida K. *et al.*, Agr. Biol. Chem. 25:804-805, 1961; Fujimoto M., Uchida K., Agr. Biol. Chem. 29:249-259, 1965). Entre los ejemplos de bacterias *Bacillus* productoras de ácido guanílico se incluyen mutantes de bacterias *Bacillus* que presentan auxotrofia para la adenina, resistencia a la

decoyina o al sulfóxido de metionina, y capacidad de producir ácido 5'-guanílico (guanosín-5'-monofosfato, en adelante denominado "GMP") (publicación de patente japonesa nº 56-12438).

Además, puede construirse una bacteria productora de ácido xantílico mediante el procedimiento utilizado para cultivar las bacterias corineformes, incluyendo *Corynebacterium ammoniagenes*. Por ejemplo, mediante la obtención de una cepa potenciada para la PRPP amidotransferasa (patente japonesa abierta al público nº 8-168383), una cepa resistente a aminoácidos alifáticos (patente japonesa abierta al público nº 4-262790) o una cepa resistente a la deshidroprolina (publicación de patente surcoreana no examinada nº 2003-56490), puede construirse una bacteria productora de ácido xantílico.

Además, un ejemplo de un procedimiento para cultivar bacterias *Bacillus* que presentan la capacidad de producir una sustancia derivada de purina también incluye el incremento en las células bacterianas de las actividades de los enzimas participantes en la biosíntesis de las purinas que son comunes a la biosíntesis de los nucleósidos de purina y de los nucleótidos de purina, es decir, los enzimas de biosíntesis de las purinas. La actividad del enzima en las células preferentemente se incrementa hasta un nivel superior al de una cepa no modificada de bacteria *Bacillus*, por ejemplo una bacteria *Bacillus* de tipo salvaje. La expresión "se incrementa la actividad" comprende, por ejemplo, el caso de que se incremente el número de moléculas de enzima en cada célula, y el caso del incremento de la actividad específica por molécula de enzima, y otros. Por ejemplo, la actividad puede incrementarse mediante el incremento del nivel de expresión del gen del enzima.

Entre los ejemplos de un enzima implicado en la biosíntesis de las purinas se incluyen, por ejemplo, fosforibosil pirofosfato amidotransferasa, fosforibosil pirofosfato sintetasa (PRPP sintetasa [EC: 2.7.6.1]), y otros.

Algunos de los catabolitos producidos mediante el metabolismo de las fuentes de azúcares tales como la glucosa y que fluyen hasta la ruta de las pentosas fosfato se convierten en ribosa-5-fosfato pasando por ribulosa-5-fosfato. A partir de la ribosa-5-fosfato biosintetizada, se produce PRPP, que es un precursor indispensable de las biosíntesis de nucleósido de purina, histidina y triptófano. Específicamente, la ribosa-5-fosfato es convertida en PRPP por la fosforibosil pirofosfato sintetasa. Por lo tanto, puede proporcionarse una capacidad de producir una sustancia derivada de purinas a una bacteria *Bacillus* mediante modificación, de manera que se incremente la actividad de PRPP sintetasa de la misma.

La expresión "se incrementa la actividad de la fosforibosil pirofosfato sintetasa" se refiere a que se incrementa la actividad de la fosforibosil pirofosfato sintetasa en comparación con una cepa no modificada, tal como una cepa de tipo salvaje o una cepa parental. La actividad de la fosforibosil pirofosfato sintetasa puede medirse mediante, por ejemplo, el procedimiento de Switzer *et al.* (Methods Enzymol. 51:3-11, 1978) o de Roth *et al.* (Methods Enzymol. 51:12-17, 1978). Puede producirse una bacteria *Bacillus* en la que se haya incrementado la actividad de la fosforibosil pirofosfato sintetasa mediante, por ejemplo, el incremento de la expresión de un gen codificante de la fosforibosil pirofosfato sintetasa en una bacteria *Bacillus* según un procedimiento de utilización de un plásmido que contiene el gen, o mediante la integración del gen en un cromosoma, lo que puede llevarse a cabo de la misma manera que en el procedimiento descrito en la patente japonesa abierta al público nº 2004-242610. Aunque el gen *prs* de SEC ID nº 3 derivado de una bacteria *Bacillus* (GenBank nº de acceso X16518) puede mencionarse como el gen codificante de la fosforibosil pirofosfato sintetasa utilizable para la presente invención, pueden utilizarse cualesquiera genes derivados de otras bacterias, animales o plantas codificantes de una proteína que presente la actividad de fosforibosil pirofosfato sintetasa.

Además, tras producirse PRPP, que es un precursor indispensable de las biosíntesis de los nucleósidos de purina, de la histidina y del triptófano, parte de la misma es convertida en nucleótidos de purina y nucleósidos de purina por enzimas implicados en la biosíntesis de las purinas. Entre los ejemplos de genes codificantes de dichos enzimas se incluyen los genes del operón de purinas de *Bacillus subtilis*, específicamente los genes del operón purEKB-purC(orf) QLF-purMNH (J)-purD (Ebole D.J. y Zalkin H., J. Biol. Chem. 262(17):8274-87, 1987) (en la actualidad, también denominado purEKBCSQLFMNHD, *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives, editor jefe: A.L. Sonenshein, ASM Press, Washington D.C., 2002, nº de acceso GenBank NC_000964) y los genes del regulón pur de *Escherichia coli* (*Escherichia* and *Salmonella*, segunda edición, editor jefe: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el incremento de la expresión de dichos genes proporciona o incrementa la capacidad de producir una sustancia derivada de purina. Además, los genes del operón de purina que pueden utilizarse para la presente invención no se encuentran limitados a ellos y también pueden utilizarse genes derivados de otros microorganismos, animales y plantas.

Entre los ejemplos del procedimiento para incrementar el nivel de expresión del operón de purina se incluyen incrementar la expresión de genes del operón de purina en una bacteria *Bacillus* mediante un procedimiento de utilización de un plásmido que contiene los genes o integrando los genes en un cromosoma o similar.

El segundo procedimiento para incrementar el nivel de expresión del operón de purina incluye sustituir un promotor del operón de purina por uno más fuerte, y sustituir la región -35 o -10 del promotor nativo por una secuencia de consenso.

Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* (cepa de *B. subtilis* 168 Marburg, ATCC nº 6051), la secuencia -35 del operón de purina es una secuencia de consenso (TTGACA), pero la secuencia -10 es TAAGAT, que es diferente de la secuencia de consenso TATAAT (Ebbole D.J. y H. Zalikh, J. Biol. Chem. 262:8274-8287, 1987). Por lo tanto, mediante la modificación de la secuencia -10 (TAAGAT) por la secuencia de consenso similar TATAAT, TATGAT o TAAAAT, puede incrementarse la actividad transcripcional del operón de purina. Puede sustituirse una secuencia de promotor mediante el mismo procedimiento que el de la sustitución génica, el cual se describe a continuación.

El tercer procedimiento para incrementar el nivel de expresión del operón de purina incluye reducir el nivel de expresión del represor del operón de purina (patente US nº 6.284.495). La expresión "expresión de un represor del operón de purina" incluye tanto la transcripción de un gen del operón de purina como la traducción de un producto de transcripción. Además, la expresión "se reduce el nivel de expresión" incluye el caso de que el nivel de expresión sea inferior al de una cepa no modificada, tal como una bacteria *Bacillus* de tipo salvaje, y el caso en que la expresión ha sido sustancialmente eliminada.

El nivel de expresión del represor del operón de purina (represor de purina) puede reducirse mediante, por ejemplo, el tratamiento de una bacteria *Bacillus* con irradiación de rayos ultravioleta o los mutágenos utilizados en el tratamiento habitual de mutagénesis, tal como NTG o EMS, y realizarse la selección de un mutante que muestre un nivel de expresión reducido del represor de purina.

Además, también puede obtenerse una bacteria *Bacillus* que muestre un nivel de expresión reducida del represor de purina mediante, por ejemplo, además de un tratamiento de mutagénesis, la sustitución de un gen codificante del represor de purina situado en un cromosoma (*purR*, GenBank nº de acceso NC_000964; la región codificante corresponde a los números de nucleótido 54439 a 55293, SEC ID nº 5) por un gen correspondiente que no funciona con normalidad (en adelante también denominado "gen de tipo interrumpido") mediante recombinación homóloga utilizando una técnica de recombinación génica (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972; Matsuyama S. y Mizushima S., J. Bacteriol. 162:1196-1202, 1985).

Por ejemplo, un gen de tipo interrumpido para un gen normal puede sustituirse por un gen de tipo interrumpido en el cromosoma del huésped de la manera que se indica a continuación. A continuación se explica la interrupción del gen *purR*. De manera similar, pueden interrumpirse otros genes, tales como *purA*, *deoD*, *guaB* y *fbp*.

Al introducir en una célula un plásmido o similar que presenta una secuencia homóloga respecto a una secuencia en el cromosoma y que no es capaz de replicarse en células bacterianas de *Bacillus*, resultando en la recombinación a una determinada frecuencia en el sitio de la secuencia que presenta la homología, se recombina el plásmido entero con el cromosoma. Si posteriormente se produce adicionalmente recombinación en el sitio de la secuencia que presenta homología en el cromosoma, el plásmido resulta extraído del cromosoma. En este momento, dependiendo del sitio en que se produzca la recombinación, puede mantenerse el gen de tipo interrumpido dentro del cromosoma y el gen normal original puede resultar extraído del mismo conjuntamente con el plásmido. Mediante la selección de dicha cepa, resulta posible obtener una cepa en la que el gen *purR* normal en el cromosoma ha sido sustituido por el gen *purR* de tipo interrumpido.

Dichas técnicas de interrupción génica basadas en la recombinación homóloga ya están establecidas y entre ellas se incluye un procedimiento que utiliza un ADN lineal, un procedimiento que utiliza un plásmido sensible a la temperatura, y otros. Además, el gen *purR* también puede interrumpirse mediante la utilización de un plásmido que contiene el gen *purR* en el que se ha insertado un gen marcador tal como un gen de resistencia a fármacos y que no es capaz de replicarse en la célula bacteriana diana. Es decir, en un transformante que ha sido transformado con dicho plásmido tal como se ha indicado anteriormente, se ha incorporado el gen marcador en el ADN cromosómico, proporcionando resistencia a fármacos. Debido a que el gen marcador se incorpora en el cromosoma a una tasa elevada mediante recombinación homóloga de las secuencias del gen *purR* en el plásmido que flanquean el gen marcador en el plásmido con el gen *purR* en el cromosoma, puede seleccionarse eficientemente una cepa con gen *purR* interrumpido.

El gen *purR* de tipo interrumpido utilizado para la interrupción génica puede obtenerse mediante, específicamente, la delección de una región determinada del gen *purR* mediante digestión con un enzima de restricción y la religación, insertando otro fragmento de ADN (gen marcador, etc.) en el gen *purR*, o provocando la sustitución, delección, inserción, adición o inversión de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la región codificante, región promotora o similar del gen *purR* mediante una mutagénesis específica de sitio (Kramer W. y Frits H.J., Methods in Enzymology 154:350-367, 1987) o mediante PCR recombinante (PCR Technology, Stockton Press, 1989) o mediante tratamiento con un agente químico tal como hiposulfito sódico o hidroxilamina (Shortle D. y Nathans D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:2170-2174, 1978), seguido de la selección de una cepa en la que la actividad del represor codificado por el gen *purR* se haya reducido o en la que la transcripción del gen se haya reducido. Entre estos procedimientos resulta preferente la delección de una región determinada del gen *purR* mediante digestión con un enzima de restricción y la religación o inserción de otro fragmento de ADN, en vista de la fiabilidad y estabilidad. La región determinada del gen *purR* que debe deleccionarse puede ser una secuencia 5'-terminal, una secuencia interna o una secuencia 3'-terminal del gen *purR*. Sin embargo, en el caso de que la región

constituya 90% o más, más preferentemente 95% o más, particularmente 97% o más, de la longitud completa del gen *purR*, se incrementa la certidumbre de la reducción de la actividad de represor. Además, en el caso de que se produzca una mutación por desplazamiento de marco mediante delección o inserción de nucleótidos en la región codificante del gen *purR*, resulta preferible provocar la delección o la inserción de nucleótidos en múltiples sitios y provocar la delección o la inserción de nucleótidos en el lado del extremo 3', en vista de que se reducirá con seguridad la actividad de represor.

La reducción de la actividad de represor de purina también puede conseguirse, aparte de la interrupción génica anteriormente indicada, mediante la introducción en el gen *purR* en el cromosoma de una mutación que reduzca la actividad intracelular de represor de purina basándose en un procedimiento convencional de mutagénesis. Por ejemplo, puede conseguirse mediante la introducción de una sustitución de aminoácido (mutación de sentido erróneo), un codón de parada (mutación sin sentido) o una mutación por desplazamiento de marco que añada o deleccione uno o dos nucleótidos, o mediante la delección parcial o total del gen. Además, la actividad del represor también puede reducirse mediante la inserción de un trasposón en el gen *purR* en el cromosoma.

La reducción de la actividad del represor de purina también puede conseguirse mediante la sustitución de una secuencia de control de la expresión del gen *purR*, tal como un promotor en el ADN cromosómico, por una más débil. Se define la potencia de un promotor a partir de la frecuencia de actos de inicio de síntesis de ARN. Se describen ejemplos de procedimientos para evaluar la potencia de los promotores y los promotores fuertes en el artículo de Goldstein *et al.* (Prokaryotic promoters in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev. 1:105-128, 1995), y otros. Además, también resulta posible introducir una sustitución de nucleótido para varios nucleótidos en una región promotora de un gen diana y de esta manera modificar el promotor, debilitándolo, tal como se da a conocer en la publicación de patente internacional nº WO00/18935. Además, es conocido que la sustitución de varios nucleótidos en el espaciador entre el sitio de unión ribosómica (RBS) y el codón de inicio, en particular una secuencia situada inmediatamente cadena arriba del codón de inicio, afecta mucho a la eficiencia de traducción del ARNm. Esta modificación del RBS puede combinarse con una reducción de la transcripción de un gen diana.

Además, puede prepararse un ADN recombinante en el que se introduzca una mutación que inestabilice el ARN mensajero transcrito a partir del gen *purR*, y transformarse en una bacteria huésped *Bacillus*.

Las actividades de los enzimas codificados por los genes *purA*, *deoD*, *guaB* y *fbp* indicados posteriormente también pueden reducirse de la misma manera que anteriormente.

El gen *purR* puede obtenerse a partir de un ADN cromosómico de un microorganismo que presente el operón de purina, mediante PCR con oligonucleótidos preparados basándose en la secuencia de nucleótidos conocida del gen *purR* como cebador. El gen *purR* también puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADN cromosómica de un microorganismo que presente el operón de purina, mediante hibridación utilizando un oligonucleótido preparado basándose en la secuencia de nucleótidos conocida del gen *purR* a modo de sonda. Se ha informado de la secuencia de nucleótidos del gen *purR* de la cepa *Bacillus subtilis* 168 Marburg (GenBank nº de acceso D26185 (la región codificante corresponde a los números de nucleótido 118041 a 118898) o NC_000964 (la región codificante corresponde a los números de nucleótido 54439 a 55296). La secuencia de nucleótidos del gen *purR* y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen se muestra en SEC ID nº 5 y nº 6 del listado de secuencias (patente japonesa abierta al público nº 2004-242610).

Los cebadores utilizados en la PCR para obtener el gen *purR* pueden ser cualesquiera de los que permiten amplificar una parte o la longitud completa del gen *purR*, y entre los ejemplos específicos se incluyen los oligonucleótidos que presentan las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID nº 15 (GAAGTTGATGATCAAAA) y SEC ID nº 16 (ACATATTGTTGACGATAAT).

Entre los ejemplos del gen marcador indicado anteriormente se incluyen genes de resistencia a fármacos tales como el gen de resistencia a la espectinomicina y el gen de resistencia a la canamicina. El gen de resistencia a la espectinomicina de *Enterococcus faecalis* puede obtenerse mediante la preparación del plásmido pDG1726 a partir de la cepa *Escherichia coli* ECE101 disponible del Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) y la eliminación del gen de resistencia en forma de un casete del plásmido. El gen de resistencia a la eritromicina de *Staphylococcus aureus* puede obtenerse mediante la preparación del plásmido pDG646 de la cepa *Escherichia coli* ECE91 disponible comercialmente del Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) y eliminación del gen de resistencia en forma de un casete del plásmido. El gen de resistencia a la canamicina derivado de *Streptococcus faecalis* puede obtenerse mediante la preparación del plásmido pDG783 a partir de la cepa *Escherichia coli* ECE94 disponible comercialmente del Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) y la eliminación del gen de resistencia en forma de un casete del plásmido. Además, el gen de resistencia al cloranfenicol de *Staphylococcus aureus* puede obtenerse mediante la preparación del plásmido pC194 a partir de la cepa *Bacillus subtilis* 1E17 disponible comercialmente del Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) y realizando una PCR utilizando ese plásmido como molde para amplificar el plásmido.

Al utilizar un gen de resistencia a fármaco como el gen marcador, puede obtenerse una cepa con interrupción del gen *purR* mediante la inserción de un gen de resistencia a fármaco en el gen *purR* en un plásmido en un sitio

apropiado, la transformación de un microorganismo con el plásmido obtenido y la selección de un transformante que se haya convertido en resistente a un fármaco. La interrupción del gen *purR* en el cromosoma puede confirmarse mediante análisis del gen *purR* o del gen marcador en el cromosoma utilizando la transferencia southern o la PCR. La incorporación de los genes de resistencia a la espectinomicina, a la eritromicina o a la canamicina anteriormente indicados en un ADN cromosómico puede confirmarse mediante PCR utilizando cebadores que puedan amplificar estos genes.

También es conocido que la expresión del operón de purina se encuentra regulado por el terminador-secuencia antiterminador situados cadena abajo del promotor (en adelante denominado secuencia atenuadora) (Ebbole D.J. y Zalkin H., J. Biol. Chem. 262:8274-8287, 1987; Ebbole D.J. y Zalkin H., J. Biol. Chem. 263:10894-10902, 1988; Ebbole D.J. y Zalkin H., J. Bacteriol. 171:2136-2141, 1989). Por lo tanto, el nivel de expresión del operón de purina puede incrementarse mediante delección de la secuencia atenuadora. La delección de la secuencia atenuadora puede llevarse a cabo mediante el mismo procedimiento que el utilizado para la interrupción de *purR*.

Con el fin de incrementar adicionalmente la transcripción del operón de purina, pueden combinarse los procedimientos descritos anteriormente. Por ejemplo, puede interrumpirse el gen *purR*, y además, el operón de purina del que se ha delecionado la secuencia atenuadora puede amplificarse utilizando un plásmido o pueden introducirse múltiples copias de dicho operón de purina en un cromosoma.

Las actividades de un enzima que participa en la biosíntesis de las purinas también pueden incrementarse mediante la desensibilización del enzima que participa en la biosíntesis de las purinas a la regulación de la misma, según el procedimiento anteriormente indicado de desensibilización de un enzima a la inhibición por retroalimentación (documento WO 99/03988).

Además, la capacidad de producir sustancias derivadas de purinas también puede incrementarse mediante atenuación de la incorporación de sustancias derivadas de purinas por parte de las células. Por ejemplo, la incorporación de nucleósidos de purina por parte de las células puede atenuarse mediante el bloqueo de una reacción implicada en la incorporación de nucleósidos de purina por parte de las células. Un ejemplo de la reacción implicada en la incorporación de los nucleósidos de purina por parte de las células incluye las reacciones provocadas por las nucleósido permeasas.

Además, al producirse un nucleósido de purina, puede reducirse la actividad de un enzima que descompone el nucleósido de purina con el fin de incrementar la capacidad de producir un nucleósido de purina. Un ejemplo de dicho enzima incluye la purina nucleósido fosforilasa.

Los nucleótidos de purina biosintetizados a partir de PRPP por enzimas participantes en la biosíntesis de las purinas se desfosforilan y convierten de esta manera en un nucleósido de purina. Para provocar eficientemente la acumulación de un nucleósido de purina, resulta preferible reducir la actividad de las purina nucleósido fosforilasas, que degradan adicionalmente los nucleósidos de purina en hipoxantina o similar. Es decir, resulta preferible atenuar o eliminar la actividad de una purina nucleósido fosforilasa que utilice nucleósidos de purina, tales como la inosina, a modo de sustrato.

Específicamente, la actividad de purina nucleósido fosforilasa puede reducirse mediante la interrupción de los genes *deoD* y *pupG* codificantes de la purina nucleósido fosforilasa en las bacterias *Bacillus*. La bacteria *Bacillus* utilizada en el presente procedimiento puede modificarse mediante interrupción de cualquiera de los genes *deoD* y *pupG* o de ambos. Al igual que los genes *deoD* y *pupG*, pueden utilizarse, por ejemplo, aquellos genes derivados de bacterias *Bacillus* (*deoD*: GenBank nº de acceso NC_000964 (SEC ID nº 7), *pupG*: GenBank nº de acceso NC_000964 (SEC ID nº 9) y puede obtenerse una cepa con interrupción génica de la misma manera que la utilización para la interrupción anteriormente indicada del gen *purR*.

La capacidad de producir una sustancia derivada de purina también puede incrementarse mediante la reducción de la actividad e la succinil-AMP sintasa. Un ejemplo del gen codificante de la succinil-AMP-sintasa incluye el gen *purA*. Un ejemplo del gen *purA* incluye, por ejemplo, aquellos que presentan la secuencia de nucleótidos registrada como GenBank nº de acceso NC_000964 (región codificante correspondiente a los números de nucleótido 4153460 a 4155749 de la cadena complementaria, SEC ID nº 11).

La capacidad de producir una sustancia derivada de purina también puede incrementarse mediante la reducción de la actividad de la inosina monofosfato (IMP) deshidrogenasa. Un ejemplo del gen codificante de la IMP deshidrogenasa incluye el gen *guaB*. Un ejemplo del gen *guaB* incluye, por ejemplo, aquellos que presentan la secuencia de nucleótidos registrada como GenBank nº de acceso NC_000964 (la región codificante corresponde a los números de nucleótido 15913 a 17376, SEC ID nº 13).

Además, como procedimiento para incrementar la capacidad de producir sustancia derivada de purina, puede contemplarse la amplificación de un gen codificante de una proteína que presenta una actividad de secreción de una sustancia derivada de purina. Un ejemplo de una bacteria en la que dicho gen ha sido amplificado incluye una bacteria *Bacillus* en la que se ha amplificado el gen *rhtA* (patente japonesa abierta al público nº 2003-219876).

Los genes *purR*, *deoD*, *pupG*, *purA* y *guaB* que deben interrumpirse tal como se ha indicado anteriormente, y el gen *prs* del que se debe incrementar la expresión, pueden ser ADN variantes que codifican proteínas con las secuencias de aminoácidos SEC ID nº 6, nº 8, nº 10, nº 12, nº 14, nº 16 y nº 4, las cuales incluyen sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones o inversiones de uno a 10 residuos aminoácidos, respectivamente, y que presentan actividad de represor de purina, de purina nucleósido fosforilasa, de succinil-AMP sintasa, de IMP deshidrogenasa o de fosforibosil pirofosfato sintetasa, respectivamente.

Dicho cambio de las secuencias de aminoácidos tal como se ha indicado anteriormente es habitualmente un cambio conservador que mantiene las actividades de las proteínas. Entre los ejemplos de sustitución conservadora de aminoácidos se incluyen la sustitución de Ser o Thr por Ala, la sustitución de Gln, His o Lys por Arg, la sustitución de Glu, Gln, Lys, His o Asp por Asn, la sustitución de Asn, Glu o Gln por Asp, la sustitución de Ser o Ala por Cys, la sustitución de Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg por Gln, la sustitución de Asn, Gln, Lys o Asp por Glu, la sustitución de Pro por Gly, la sustitución de Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr por His, la sustitución de Leu, Met, Val o Phe por Ile, la sustitución de Ile, Met, Val o Phe por Leu, la sustitución de Asn, Glu, Gln, His o Arg por Lys, la sustitución de Ile, Leu, Val o Phe por Met, la sustitución de Trp, Tyr, Met, Ile o Leu por Phe, la sustitución de Thr o Ala por Ser, la sustitución de Ser o Ala por Thr, la sustitución de Phe o Tyr por Trp, la sustitución de His, Phe o Trp por Tyr y la sustitución de Met, Ile o Leu por Val.

Entre los ejemplos específicos de otras variantes conservadoras de los genes *purR*, *deoD*, *pupG*, *purA*, *guaB* y *fbp* y del gen *prs* indicados en la presente memoria se incluyen los ADN que muestran una homología de, por ejemplo, 70% o superior, preferentemente de 80% o superior, más preferentemente de 90% o superior, particularmente preferentemente 95% o superior, respecto a los ADN que presentan las secuencias de nucleótidos SEC ID nº 5, nº 7, nº 9, nº 11, nº 13, nº 15 y nº 3, respectivamente. Más específicamente, entre los ejemplos de las variantes conservadas indicadas en la presente memoria se incluyen los ADN que son capaces de hibridarse con ADN que presentan secuencias de nucleótidos complementarias a las secuencias de nucleótidos SEC ID nº 5, nº 7, nº 9, nº 11, nº 13, nº 15 y nº 3 bajo condiciones restrictivas. Un ejemplo de las condiciones restrictivas incluye condiciones de lavado a 60°C y concentraciones salinas de 1xSSC, SDS al 0,1%, preferentemente 0,1xSSC, SDS al 0,1%, una o más veces, preferentemente dos o tres veces.

La homología de los ADN puede evaluarse mediante una búsqueda de BLAST, una búsqueda de FASTA, el procedimiento de cálculo de Crustal W, y otros.

BLAST (herramienta de búsqueda de alineación local básica) es un algoritmo de búsqueda heurística utilizado por los programas blastp, blastn, blastx, megablast, tblastn y tblastx, y los resultados obtenidos por estos programas se consideran significativos, basándose en la utilización del procedimiento estadístico de Karlin, Samuel y Stephen F. Altschul (Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990; Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-7, 1993). El procedimiento de búsqueda FASTA fue descrito por W.R. Pearson (Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA, Methods in Enzymology 183:63-98, 1990). El procedimiento Clustal W fue descrito por Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T.J. (CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680, 1994).

Además, el ADN utilizado para la preparación de un gen de tipo interrumpido también puede ser una variante conservadora del gen *purR*, *deoD*, *pupG*, *purA* o *guaB*.

La incorporación de un gen diana en el ADN cromosómico de la bacteria *Bacillus* puede llevarse a cabo de la misma manera que para el gen codificante de la fructosa bisfosfatasa descrita posteriormente.

(II) Modificación para reducir la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa

La bacteria *Bacillus* utilizada en el procedimiento de la presente invención puede obtenerse mediante modificación de una cepa que presenta la capacidad de producir una sustancia derivada de purina tal como las indicadas anteriormente, de manera que se reduzca la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa. El orden de modificación no se encuentra limitado, y tras modificar una bacteria de manera que se reduzca la actividad enzimática de fructosa bisfosfatasa de la misma, puede proporcionarse a la bacteria capacidad productora de nucleótidos de purina.

La fructosa bisfosfatasa es un enzima que cataliza una reacción que genera fructosa-6-fosfato a partir de fructosa-1,6-bisfosfato, y esta reacción es una de las reacciones de la ruta de la gluconeogénesis. La "ruta de la gluconeogénesis" se refiere a una ruta en la que el ácido oxalacético intracelular es convertido en ácido fosfoenolpirúvico mediante descarboxilación catalizada por la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (EC: 4.1.1.49) y fosforilación; el ácido fosfoenolpirúvico es convertido en fructosa-1,6-bisfosfato mediante las reacciones inversas de los enzimas glucolíticos; la fructosa-1,6-bisfosfato es convertida además en fructosa-6-fosfato por la fructosa bisfosfatasa (EC: 3.1.3.11) y la glucosa es biosintetizada a partir de la fructosa-6-fosfato por la glucosa-6-fosfato isomerasa y la glucosa-6-fosfatasa (EC: 3.1.3.9).

La actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa puede medirse mediante el procedimiento siguiente. Por ejemplo puede medirse mediante la conversión en NADPH de la fructosa-6-fosfato generada, con la fosfoglucoisomerasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y después midiendo el NADPH.

5 Dicha modificación en la que se reduce la actividad enzimática de fructosa bisfosfatasa puede conseguirse, por ejemplo, tal como se ha explicado anteriormente para la interrupción del gen *purR*, sustituyendo un gen correspondiente que no funciona normalmente (por ejemplo un gen de tipo interrumpido obtenido mediante la inserción de un gen marcador tal como un gen de resistencia a fármaco en el gen de la fructosa bisfosfatasa) por el gen de la fructosa bisfosfatasa en el cromosoma, mediante recombinación homóloga. Además, tal como se ha descrito para el gen *purR*, puede introducirse una mutación para reducir la actividad enzimática intracelular de la fructosa bisfosfatasa en el gen de la fructosa bisfosfatasa en el cromosoma mediante procedimientos convencionales de mutagénesis.

15 Un ejemplo de fructosa bisfosfatasa de *Bacillus subtilis* incluye una proteína que consiste de 671 aminoácidos mostrada como SEC ID nº 2, y puede utilizarse un gen codificante de la proteína, preferentemente un gen que presenta la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1 (gen *fbp*, números de nucleótido 4127053 a 4129065 del GenBank nº de acceso NC_000964). El gen *fbp* se localiza aproximadamente en 323º en el cromosoma de *Bacillus subtilis*.

20 Entre los ejemplos de ADN codificante de una proteína sustancialmente idéntica a la fructosa bisfosfatasa se incluyen, específicamente, un ADN codificante de una proteína que muestra una homología de 50% o superior, preferentemente de 70% o superior, más preferentemente de 80% o superior, particularmente preferentemente de 90% o superior, todavía más preferentemente de 95% o superior, respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2, y que presenta la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa.

25 El gen codificante de la fructosa bisfosfatasa también puede ser una variante conservadora del gen *fbp*, tal como los genes anteriormente indicados. Específicamente, los ejemplos incluyen un ADN codificante de una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 2, incluyendo sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones o inversiones de uno a 10 residuos aminoácidos y que presenta actividad de fructosa bisfosfatasa. En la presente memoria se da a conocer un ADN codificante de una proteína que muestra una homología de 50% o superior, preferentemente de 70% o superior, más preferentemente de 80% o superior, particularmente preferentemente de 90% o superior, todavía más preferentemente de 95% o superior, respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 2, y que presenta la actividad enzimática de fructosa bisfosfatasa. Más específicamente, entre los ejemplos se incluyen un ADN que es capaz de hibridarse con un ADN que presenta la secuencia de nucleótidos SEC ID nº 1 bajo condiciones restrictivas. Entre las condiciones restrictivas se incluyen condiciones de lavado a 60°C y concentraciones salinas de 1xSSC, SDS al 0,1%; preferentemente 60°C, 0,1xSSC, SDS al 0,1%, una o más veces, preferentemente dos o tres veces.

40 Dicho ADN codificante de una proteína sustancialmente idéntica a la fructosa bisfosfatasa tal como se ha indicado anteriormente puede obtenerse mediante, por ejemplo, la modificación de una secuencia de nucleótidos codificante de dicho enzima, de manera que el residuo aminoácido de una parte específica es sustituido, delecionado, insertado, añadido o invertido mediante mutagénesis específica de sitio. Dicho ADN modificado tal como se ha indicado anteriormente también puede obtenerse mediante un tratamiento de mutagénesis conocido convencionalmente. Entre los ejemplos del tratamiento de mutagénesis se incluyen un tratamiento *in vitro* del ADN antes del tratamiento de mutagénesis con hidroxilamina, y un tratamiento de un microorganismo tal como la bacteria *Escherichia* que contiene ADN, previamente al tratamiento de mutagénesis por irradiación con luz ultravioleta o utilizando un mutágeno para el tratamiento convencional de mutagénesis, tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosguanidina (NTG) o ácido nitroso.

50 El gen diana puede obtenerse mediante, por ejemplo, el procedimiento de PCR (reacción en cadena de la polimerasa, White T.J. *et al.*, Trends Genet. 5:185-189, 1989) utilizando un ADN cromosómico de una bacteria *Bacillus* como molde y oligonucleótidos preparados basándose en la secuencia de nucleótidos del gen diana a modo de cebadores. El ADN cromosómico puede prepararse a partir de una bacteria que sirva como donante de ADN mediante, por ejemplo, el procedimiento de Saito y Miura (H. Saito y K. Miura, Biochem. Biophys. Acta. 72:619-629, 1963; Text for Bioengineering Experiments, editado por la Society for Bioscience and Bioengineering, Japón, páginas 97 y 98, Baifukan, 1992) o similar. Los cebadores de PCR pueden prepararse basándose en la secuencia génica conocida de una bacteria *Bacillus*, o basándose en la información de una región conservada entre genes de otras bacterias de las que se conocen las secuencias.

60 Entre los ejemplos del vector para incorporar un gen diana en un ADN cromosómico de una bacteria *Bacillus* se incluyen un vector que presenta un origen de replicación sensible a la temperatura, tal como pHV1248 (Prtit M.-A. *et al.*, J. Bacteriol. 172:6736-6740, 1990), vectores para *E. coli* tales como pHSG398 (Takara Shuzo) y pBluescript SK- (Stratagene), y similares.

65 Con el fin de ligar un gen objetivo y un vector que porta un marcador que funciona en bacterias *Bacillus* para preparar un ADN recombinante, el vector se digiere con n enzima de restricción correspondiente al extremo del gen

objetivo. La ligación habitualmente se lleva a cabo mediante la utilización de una ligasa tal como la ADN ligasa de T4.

Para introducir un ADN recombinante preparado tal como se ha indicado anteriormente en una bacteria *Bacillus*, puede utilizarse cualquiera de los procedimientos de transformación conocidos que se han publicado hasta el momento. Entre los ejemplos se incluye, por ejemplo, un procedimiento para preparar células competentes a partir de células que se encuentran en la fase de crecimiento, seguido de la introducción del ADN en las mismas (Dubunau D. y Davidoff-Abelson R., J. Mol. Biol. 56:209-221, 1971) y un procedimiento de conversión de las células huésped en protoplastos o esferoplastos, los cuales pueden incorporar fácilmente ADN recombinante, seguido de la introducción del ADN recombinante en las células receptoras de ADN (Chang S. y Choen S.N., Molec. Gen. Genet. 168:111-115, 1979).

<2> Procedimiento para producir una sustancia derivada de purina

La bacteria *Bacillus* utilizada para el presente procedimiento produce eficientemente una sustancia derivada de purina. Por lo tanto, mediante el cultivo de dicha bacteria *Bacillus* en un medio apropiado, puede producirse una sustancia derivada de purina, tal como nucleósido de purina y nucleótido de purina y acumularse en células de la bacteria o en el medio.

Respecto al medio utilizado para el presente procedimiento, puede llevarse a cabo el cultivo de una manera convencional utilizando un medio convencional que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales, así como nutrientes traza orgánicos tales como aminoácidos y vitaminas, según resulte necesario. Puede utilizarse un medio sintético o un medio natural. Puede utilizarse cualquier tipo de fuente de carbono y de fuente de nitrógeno con la condición de que puedan ser utilizados por la cepa que debe cultivarse.

A modo de fuente de carbono también pueden utilizarse azúcares tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, galactosa, arabinosa, xilosa, trehalosa, ribosa, hidrolizados de almidón y melazas, y alcoholes tales como glicerol y manitol, y ácidos orgánicos tales como ácido glucónico, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, ácido fumárico y ácido succínico, independientemente o en combinación con otras fuentes de carbono.

A modo de fuente de nitrógeno, se utiliza amonio, sales amónicas tales como sulfato amónico, carbonato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico y acetato amónico, sales de ácido nítrico, nitrógeno orgánico tal como hidrolizado de soja, y otros.

A modo de nutrientes orgánicos traza, se utilizan aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aquellos que contienen dichas sustancias, tales como peptona, casaminoácidos, extracto de levadura y productos de descomposición de las proteínas de la soja y otros. Al utilizar una cepa mutante auxotrófica que requiera un aminoácido o similar para el crecimiento, resulta necesario suplementar el nutriente requerido.

A modo de sales minerales se utilizan sales de ácido fosfórico, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro, sales de manganeso y otros.

Aunque las condiciones de cultivo pueden variar dependiendo del tipo de bacteria *Bacillus* que debe utilizarse, *Bacillus subtilis* se cultiva, por ejemplo, como cultivo bajo aireación, mientras que la temperatura de fermentación se mantiene entre 20°C y 50°C, y el pH a un valor entre 4 y 9. Al caer el pH durante el cultivo, el medio se neutraliza con un álcali tal como gas amonio. Se acumula un nucleósido de purina en el medio tras un periodo de entre aproximadamente 40 horas y 3 días de cultivo de la manera descrita anteriormente.

Tras completar el cultivo, la inosina acumulada en el medio puede recogerse de una manera convencional. Por ejemplo, puede aislarse mediante precipitación, cromatografía de intercambio iónico y otros.

Además, en el caso de que el microorganismo utilizado para el presente procedimiento no presente un gen codificante de una nucleosidasa o nucleotidasa, el nucleósido o nucleótido correspondiente puede acumularse. Además, en el caso de que se proporcione auxotrofia para la inosina, puede acumularse un precursor o sustancias relevantes implicadas en la ruta de biosíntesis de la misma.

Además, mediante la reacción de inosina o guanosina preparada mediante el procedimiento de la presente invención con purina nucleósido fosforilasa o fosforibosiltransferasa, puede obtenerse ácido 5'-inosínico o ácido 5'-guanílico.

Además, también resulta posible fosforilar el nucleósido de purina producido utilizando el microorganismo de la presente invención haciendo que una fosfotransferasa reaccione con el nucleósido de purina, produciendo un nucleótido de purina (éster de ácido 5'-fosfórico del nucleósido) (patente japonesa abierta al público nº 2000-295996). Por ejemplo, pueden utilizarse un procedimiento para producir un nucleótido de purina utilizando una bacteria *Escherichia* en la que se ha introducido un gen codificante de inosina-guanosina quinasa de *Escherichia coli* (documento WO 91/08286), y un procedimiento para producir un nucleótido de purina utilizando *Corynebacterium*

ammoniogenes en el que se ha introducido un gen codificante de la inosina-guanosina quinasa de *Exiguobacterium acetylicum* (documento WO 96/30501).

Además, también resulta posible producir un nucleótido de purina (éster de ácido 5'-fosfórico del nucleósido) haciendo reaccionar el nucleósido de purina producido mediante la utilización del microorganismo indicado en la presente memoria con un donante de fosfatos seleccionado de entre el grupo que consiste de ácido polifosfórico, fosfato de fenilo y fosfato de carbamilo, y un microorganismo que presenta una capacidad de producir un éster de ácido 5'-fosfórico de nucleósido o fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2). Aunque el microorganismo que presenta una capacidad de producir un éster de ácido 5'-fosfórico de nucleósido no se encuentra particularmente limitado con la condición de que se seleccione un microorganismo que presente la capacidad de convertir un nucleósido de purina en un nucleótido de purina, entre los ejemplos se incluye, por ejemplo, el microorganismo dado a conocer en la publicación de patente internacional WO 96/37603.

Además, también puede utilizar *Escherichia blattae* JCM 1650, *Serratia ficaria* ATCC 33105, *Klebsiella planticola* IFO 14939 (ATCC nº 33531), *Klebsiella pneumoniae* IFO 3318 (ATCC nº 8724), *Klebsiella terrigena* IFO 14941 (ATCC nº 33257), *Morganella morganii* IFO 3168, *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, *Enterobacter aerogenes* IFO 13534 (ATCC nº 13048), *Chromobacterium fluviatile* IAM 13652, *Chromobacterium violaceum* IFO 12614, *Cedecea lapagei* JCM 1684, *Cedecea davisiae* JCM 1685, *Cedecea neteri* JCM 5909 y otros, dados a conocer en la patente japonesa abierta al público nº 07-231793.

A modo de la fosfatasa ácida, puede utilizarse, por ejemplo, la fosfatasa ácida dada a conocer en la patente japonesa abierta al público nº 2002-000289, y puede utilizarse más preferentemente una fosfatasa ácida la afinidad de la cual para un nucleósido se ha incrementado (patente japonesa abierta al público nº 10-201481), una fosfatasa ácida mutante con una actividad nucleotidasa reducida (documento WO 96/37603), una fosfatasa ácida mutante con una actividad de hidrólisis de éster de ácido fosfórico reducida (patente japonesa abierta al público nº 2001-245676) y otros.

También resulta posible obtener un nucleótido de purina mediante fosforilación química de un nucleósido de purina producido utilizando el microorganismo indicado en la presente memoria (Bulletin of the Chemical Society of Japan 42:3505). Además, también puede utilizarse un procedimiento de obtención de GMP mediante acoplamiento de un microorganismo que presenta la capacidad de producir XMP indicada en la presente memoria y actividad de XMP aminasa, y un procedimiento de obtención de IMP mediante acoplamiento de inosina quinasa (Biosci. Biotech. Biochem. 51:840, 1997; patente japonesa abierta al público nº 63-230094).

La inosina, la guanosina o el nucleósido de purina preparados mediante el procedimiento de la presente invención y utilizados para la preparación anteriormente indicada de nucleótido de purina pueden ser un producto purificado, o un caldo de fermentación de nucleósido de purina, o un producto crudo que contiene un nucleósido de purina.

Ejemplos

A continuación se explica con mayor detalle la presente invención haciendo referencia a ejemplos.

Ejemplo 1

<Construcción de una cepa bacteriana deficiente en los genes *pupG* y *deoD* codificantes de purina nucleósido fosforilasas>

Se construyó una cepa deficiente en el gen de la purina nucleósido fosforilasa (*deoD*) a partir de la cepa recombinante KMBS310 tal como se describe posteriormente. La cepa KMBS310 (solicitud de patente japonesa nº 2005-280186), la cual se deriva de *Bacillus subtilis* (cepa *B. subtilis* 168 Marburg, ATCC nº 6051), es deficiente en el gen del represor del operón purina (*purR*), en el gen succinil-AMP sintasa (*purA*) y en el gen de la purina nucleósido fosforilasa (*pupG*) y presenta un gen atenuado de IMP deshidrogenasa (*guaB*), en la que se ha modificado la región promotora del operón purina y las secuencias SD del gen de la PRPP sintetasa (*prs*). Se incrementó la expresión del operón de purina y del gen de la PRPP sintetasa mediante modificaciones de la región de promotor y de la secuencia SD, respectivamente.

Se utilizó un ADN genómico preparado a partir de la cepa KMBS16 (*purR::spc purA::erm deoD::kan*, patente japonesa abierta al público nº 2004-242610) mediante el procedimiento de Fouet y Sonenshein (J. Bacteriol. 172:835-844, 1990) para transformar células competentes de la cepa *B. subtilis* 168 Marburg preparada mediante el procedimiento de Dubnau y Davidoff-Abelson (J. Mol. Biol. 56:209-221, 1971) y se obtuvieron colonias cultivadas en una placa de agar LB que contenía 5 µg/ml de canamicina. Se seleccionaron las colonias que no resultaron resistentes a la espectinomicina ni resistentes a la eritromicina, y una cepa de entre las mismas se designó como KMBS5 (*deoD::kan*).

Se utilizó un ADN genómico preparado a partir de KMBS5 mediante el procedimiento de Fouet y Sonenshein (J. Bacteriol. 172, 835-844, 1990) para transformar células competentes de la cepa KMBS310 Marburg preparada mediante el procedimiento de Dubnau y Davidoff-Abelson (J. Mol. Biol. 56, 209-221, 1971) y se obtuvieron colonias

cultivadas en una placa de agar LB que contenía 5 µg/ml de canamicina y 20 µg/ml de guanina. Se seleccionaron varias colonias de entre las colonias obtenidas tal como se ha indicado anteriormente y uno de los transformantes, para el que pudo confirmarse que *deoD::kan* sustituía el gen *deoD* de tipo salvaje y que todas las mutaciones derivadas de KMBS310 no habían sido sustituidas por secuencias de tipo salvaje, se denominó KMBS321.

Ejemplo 2

<Construcción de cepa bacteriana deficiente en el gen *fbp* codificante de fructosa bisfosfatasa, cultivo y evaluación de la misma>

(1) Preparación de cepa deficiente en el gen *fbp*

Se construyó una cepa deficiente en el gen de la fructosa bisfosfatasa (*fbp*) a partir de la cepa recombinante KMBS321 anteriormente indicada, tal como se describe posteriormente. La cepa KMBS321, que se deriva de *Bacillus subtilis* (cepa *B. subtilis* 168 Marburg, ATCC nº 6051), es deficiente en el gen del represor del operón purina (*purR*), en el gen de la succinil-AMP sintasa (*purA*) y en el gen de la purina nucleósido fosforilasa (*pupG*) y presenta un gen atenuado de la IMP deshidrogenasa (*guaB*), en la que se habían modificado la región de promotor del operón purina y la secuencia SD del gen de la PRPP sintetasa (*prs*).

(i) Amplificación de la región cadena arriba de *fbp* mediante PCR

Se prepararon cebadores 28-mero y 50-mero que presentaban las secuencias de nucleótidos siguientes basándose en la información de un banco de datos génicos (GenBank nº de acceso NC_000964 y V01277).

TTCCCTTAGGGTTATTTTCGTTTCAAAA (SEC ID nº 17)

cgtttggtgaactaatgggtgctTTTATGAGCATGTGCATGATAAGGTGA (SEC ID nº 18, los nucleótidos indicados en letra minúscula corresponden a la región cadena arriba de promotor del gen de la resistencia al cloranfenicol (*cat*) clonado en pC194)

Se llevó a cabo una PCR (98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1,5 minutos, 30 ciclos, sistema PCR de amplificación génica modelo 9600, Perkin-Elmer) utilizando el ADN cromosómico de la cepa *B. subtilis* 168 Marburg como molde y los cebadores anteriormente indicados para obtener un fragmento de amplificación que contiene una región 5'-terminal del gen *fbp* y 1.350 pb de región cadena arriba.

(ii) Amplificación de la región cadena abajo de *fbp* mediante PCR

Se prepararon cebadores de PCR 50-meros y 27-meros que presentaban las secuencias de nucleótidos siguientes basándose en la información de un banco de datos génicos (GenBank nº de acceso NC_000964 y V01277).

acagctccagatccatctctctTTTTAGAGAGTTTGC GGAGATATCG (SEC ID nº 19, los nucleótidos indicados en letra minúscula corresponden a una región cadena abajo del gen estructural del gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) clonado en pC194)

TAAAGGTTTTTCGGGATAAGATTGAAA (SEC ID nº 20)

Se llevó a cabo una PCR (98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1,5 minutos, 30 ciclos, sistema PCR de amplificación génica modelo 9600, Perkin-Elmer) utilizando el ADN cromosómico de la cepa *B. subtilis* 168 Marburg como molde y los cebadores anteriormente indicados con el fin de obtener un fragmento de amplificación que contiene una región 3'-terminal del gen *fbp* y aproximadamente 1.770 pb de región cadena abajo.

(iii) Amplificación del gen *cat* mediante PCR

Se prepararon cebadores de PCR 50-meros que presentan las secuencias de nucleótidos siguientes basándose en la información de un banco de datos génicos (GenBank nº de acceso V01277 y NC_000964).

tcaccttatcatgcacatgctcataaaAGCACCCATTAGTTCAACAAACG (SEC ID nº 21, los nucleótidos indicados con letras minúsculas corresponden a la secuencia de la región 5'-terminal del gen *fbp*, y se diseñaron de manera que fuesen complementarios a la región 3'-terminal de SEC ID nº 18)

cgatactcccgcaaaactctcttaaaaAAGAAGGATATGGATCTGGAGCTGT (SEC ID nº 22, los nucleótidos indicados en letra minúscula corresponden a la secuencia de la región 3'-terminal del gen *fbp*, y se diseñaron de manera que fuesen complementarios a la región 3'-terminal de SEC ID nº 19)

Se llevó a cabo una PCR (98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1,5 minutos, 30 ciclos, sistema PCR de amplificación génica modelo 9600, Perkin-Elmer) utilizando plásmido pC194 portador del gen de resistencia al cloranfenicol (*cat*) como molde y los cebadores anteriormente indicados, con el fin de obtener un fragmento de amplificación de aproximadamente 980 pb que contiene el gen *cat*.

(iv) Amplificación mediante PCR recombinante de fragmento que comprende la región *fbp* con inserción del gen *cat*

Se purificaron los fragmentos de ADN amplificados en (i) a (iii) indicados anteriormente utilizando una columna MicroSpin S-400 (Amersham Pharmacia Biotech) y después se utilizó una mezcla de los mismos en cantidades apropiadas a modo de moldes, conjuntamente con las secuencias SEC ID nº 17 y nº 20, con el fin de llevar a cabo una PCR (98°C durante 10 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 4,5 minutos, 30 ciclos, sistema PCR de amplificación génica modelo 9600, Perkin-Elmer) y obtener de esta manera un fragmento que comprenda la región *fbp* con inserción del gen *cat*.

(v) Preparación de cepa productora de inosina con *fbp* interrumpido

El fragmento de ADN que comprendía la región *fbp* en la que se había insertado el gen *cat* (*fbp::cat*) obtenido en (iv), se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se extrajo el fragmento diana del gel. El fragmento de ADN purificado tal como se ha indicado anteriormente se utilizó para transformar células competentes de la cepa *B. subtilis* KMBS321 preparadas mediante el procedimiento de Dubnau y Davidoff-Abelson (J. Mol. Biol. 56:209-221, 1971) y se obtuvieron colonias cultivadas en una placa de agar LB que contenía 2,5 µg/ml de cloranfenicol y 20 µg/ml de guanina. Se prepararon los ADN cromosómicos a partir de dichas colonias y se identificaron mediante el procedimiento de PCR descrito en (iv) las cepas en las que la región *fbp* en un cromosoma había sido sustituida por una región *fbp* con una secuencia interna que había sido sustituida por el gen de resistencia al cloranfenicol (*fbp::cat*) mediante doble recombinación y una de dichas cepas se denominó TABS133.

(2) Producción de nucleósido de purina por una cepa productora de inosina deficiente en el gen *fbp*

La cepa deficiente en el gen *fbp* TABS133 y una cepa de control KMBS321 se aplicaron, cada una de ellas, uniformemente sobre una placa con medio LB que contenía 20 mg/ml de guanina y se cultivaron durante la noche a 34°C. Las células correspondientes a 1/8 de la placa se inocularon en 20 ml de un medio de fermentación contenido en un matraz de Sakaguchi de 500 ml de volumen y después se añadieron 50 g/l de carbonato de calcio al medio y las células se cultivaron a 34°C bajo agitación. Setenta y dos horas después de iniciar el cultivo, se muestreó el medio y se midieron mediante procedimientos conocidos las cantidades de inosina e hipoxantina contenidas en el medio. La cantidad acumulada de inosina observada con la cepa deficiente en gen *fbp* TABS133 era más alta que la observada con la cepa KMBS321 como cepa de control.

[Composición del medio de fermentación]

Glucosa	30 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
NH ₄ Cl	32 g/l
Mameno (T-N)*	1,35 g/l
DL-Metionina	0,4 g/l
L-Triptófano	0,02 g/l
Adenina	0,1 g/l
Guanosina	0,075 g/l
MgSO ₄	0,4 g/l
FeSO ₄	0,01 g/l
MnSO ₄	0,01 g/l
Adecanol (antiespumante)	0,5 ml/l
(ajustado a un pH de 7,0 con KOH)	
Carbonato de calcio	50 g/l

* : Hidrolizado de proteínas de soja

Tabla 1

Cepas de <i>B. subtilis</i>	inosina (g/l)
KMBS321	5,3
TABS133	5,8

[Explicación del listado de secuencias]

- SEC ID nº 1: secuencia de nucleótidos del gen *fbp*
- SEC ID nº 2: secuencia de aminoácidos de la fructosa bisfosfatasa
- SEC ID nº 3: secuencia de nucleótidos del gen *prs*
- SEC ID nº 4: secuencia de aminoácidos de la fosforibosil pirofosfato sintetasa
- SEC ID nº 5: secuencia de nucleótidos del gen *purR*
- SEC ID nº 6: secuencia de aminoácidos del represor de purina
- SEC ID nº 7: secuencia de nucleótidos del gen *deoD*
- SEC ID nº 8: secuencia de aminoácidos del producto del gen *deoD* (purina nucleósido fosforilasa)
- SEC ID nº 9: secuencia de nucleótidos del gen *pupG*
- SEC ID nº 10: secuencia de aminoácidos del producto del gen *pupG* (purina nucleósido fosforilasa)

SEC ID nº 11: secuencia de nucleótidos del gen *purA*
 SEC ID nº 12: secuencia de aminoácidos de la succinil-AMP sintasa
 SEC ID nº 13: secuencia de nucleótidos del gen *guaB*
 SEC ID nº 14: secuencia de aminoácidos de la IMP deshidrogenasa
 5 SEC ID nº 15: cebador para la amplificación del gen *purR*
 SEC ID nº 16: cebador para la amplificación del gen *purR*
 SEC ID nº 17: cebador para la amplificación de la región cadena arriba del gen *fbp*
 SEC ID nº 18: cebador para la amplificación de la región cadena arriba del gen *fbp*
 SEC ID nº 19: cebador para la amplificación de la región cadena abajo del gen *fbp*
 10 SEC ID nº 20: cebador para la amplificación de la región cadena abajo del gen *fbp*
 SEC ID nº 21: cebador para la amplificación del gen *cat*
 SEC ID nº 22: cebador para la amplificación del gen *cat*

Aplicabilidad industrial

15 Mediante la utilización del procedimiento de la presente invención, puede mejorarse la eficiencia de la producción de un nucleósido de purina y/o de un nucleótido de purina.

Listado de secuencias

20 <110> AjinomotoCo., Inc.

<120> Bacteria que puede producir sustancia de purina y procedimiento de producción de sustancia de purina

25 <130> EPA-64628

<150> JP2006-119315

<151> 2006-04-24

30 <160> 22

<170> Patente en versión 3.3

<210> 1

35 <211> 2013

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

<220>

40 <221> CDS

<222> (1)..(2013)

<400> 1

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

45

ES 2 401 607 T3

ctg tta tac aaa aca gaa caa gct ggc aac aag gag caa tat tac tcc 576
 Leu Leu Tyr Lys Thr Glu Gln Ala Gly Asn Lys Glu Gln Tyr Tyr Ser
 180 185 190
 gaa atc att gat cag atc att gaa ctt ggc caa gcc gat aag ctg atc 624
 Glu Ile Ile Asp Gln Ile Ile Glu Leu Gly Gln Ala Asp Lys Leu Ile
 195 200 205
 acc ggc ctt gct tac agc gtt cag cga ttg gtg gtc gac cat ctg cat 672
 Thr Gly Leu Ala Tyr Ser Val Gln Arg Leu Val Val Asp His Leu His
 210 215 220
 gtg gtc ggc gat att tat gac cgc ggc ccg cag ccg gat aga att atg 720
 Val Val Gly Asp Ile Tyr Asp Arg Gly Pro Gln Pro Asp Arg Ile Met
 225 230 235 240
 gaa gaa ctg atc aac tat cat tct gtc gat att cag tgg gga aat cac 768
 Glu Glu Leu Ile Asn Tyr His Ser Val Asp Ile Gln Trp Gly Asn His
 245 250 255
 gat gtc ctt tgg atc ggc gcc tat tcc ggt tcc aaa gtg tgc ctg gcc 816
 Asp Val Leu Trp Ile Gly Ala Tyr Ser Gly Ser Lys Val Cys Leu Ala
 260 265 270
 aat att atc cgc atc tgt gcc cgc tac gac aac ctg gat att att gag 864
 Asn Ile Ile Arg Ile Cys Ala Arg Tyr Asp Asn Leu Asp Ile Ile Glu
 275 280 285
 gac gtg tac ggc atc aac ctg aga ccg ctg ctg aac ctg gcc gaa aaa 912
 Asp Val Tyr Gly Ile Asn Leu Arg Pro Leu Leu Asn Leu Ala Glu Lys
 290 295 300
 tat tat gat gat aat cca gcg ttc cgt cca aaa gca gac gaa aac agg 960
 Tyr Tyr Asp Asp Asn Pro Ala Phe Arg Pro Lys Ala Asp Glu Asn Arg
 305 310 315 320
 cca gag gat gag att aag caa atc aca aaa atc cat caa gcg att gcc 1008
 Pro Glu Asp Glu Ile Lys Gln Ile Thr Lys Ile His Gln Ala Ile Ala
 325 330 335
 atg atc caa ttc aag ctt gag agc ccg att atc aag aga cgg ccg aac 1056
 Met Ile Gln Phe Lys Leu Glu Ser Pro Ile Ile Lys Arg Arg Pro Asn
 340 345 350
 ttt aat atg gaa gag cgg ctg tta tta gag aaa ata gac tat gac aaa 1104
 Phe Asn Met Glu Glu Arg Leu Leu Leu Glu Lys Ile Asp Tyr Asp Lys
 355 360 365
 aat gaa atc acg ctg aac gga aaa aca tat caa ctg gaa aac acc tgc 1152
 Asn Glu Ile Thr Leu Asn Gly Lys Thr Tyr Gln Leu Glu Asn Thr Cys
 370 375 380
 ttt gcg acg att aat ccg gag cag cca gat cag cta tta gaa gaa gaa 1200
 Phe Ala Thr Ile Asn Pro Glu Gln Pro Asp Gln Leu Leu Glu Glu Glu
 385 390 395 400
 gca gaa gtc ata gac aag ctg cta ttc tct gtc cag cat tcc gaa aag 1248
 Ala Glu Val Ile Asp Lys Leu Leu Phe Ser Val Gln His Ser Glu Lys
 405 410 415
 ctg ggc cgc cat atg aat ttt atg atg aaa aaa ggc agc ctt tat tta 1296
 Leu Gly Arg His Met Asn Phe Met Met Lys Lys Gly Ser Leu Tyr Leu
 420 425 430
 aaa tat aac ggc aac ctg ttg att cac ggc tgt att cca gtt gat gaa 1344
 Lys Tyr Asn Gly Asn Leu Leu Ile His Gly Cys Ile Pro Val Asp Glu
 435 440 445
 aac ggc aat atg gaa acg atg atg att gag gat aaa ccg tat gcg ggc 1392
 Asn Gly Asn Met Glu Thr Met Met Ile Glu Asp Lys Pro Tyr Ala Gly
 450 455 460
 cgt gag ctg ctc gat gta ttt gaa cga ttc ttg cgg gaa gcc ttt gcc 1440
 Arg Glu Leu Leu Asp Val Phe Glu Arg Phe Leu Arg Glu Ala Phe Ala
 465 470 475 480
 cac ccg gaa gaa acc gat gac ctg gcg aca gat atg gct tgg tat tta 1488
 His Pro Glu Glu Thr Asp Asp Leu Ala Thr Asp Met Ala Trp Tyr Leu

ES 2 401 607 T3

```

                485                490                495
tgg aca ggc gaa tac tcc tcc ctc ttc gga aaa cgc gcc atg acg aca      1536
Trp Thr Gly Glu Tyr Ser Ser Leu Phe Gly Lys Arg Ala Met Thr Thr
                500                505                510
ttt gag cgc tat ttc atc aaa gag aag gaa acg cat aaa gag aag aaa      1584
Phe Glu Arg Tyr Phe Ile Lys Glu Lys Glu Thr His Lys Glu Lys Lys
                515                520                525
aac ccg tat tat tat tta cga gaa gac gag gca acc tgc cga aac atc      1632
Asn Pro Tyr Tyr Tyr Leu Arg Glu Asp Glu Ala Thr Cys Arg Asn Ile
                530                535                540
ctg gca gaa ttc ggc ctc aat cca gat cac ggc cat atc atc aac ggc      1680
Leu Ala Glu Phe Gly Leu Asn Pro Asp His Gly His Ile Ile Asn Gly
                545                550                555                560
cat aca cct gta aaa gaa atc gaa gga gaa gac cca atc aaa gca aac      1728
His Thr Pro Val Lys Glu Ile Glu Gly Glu Asp Pro Ile Lys Ala Asn
                565                570                575
gga aaa atg atc gtc atc gac ggc ggc ttc tcc aaa gcc tac caa tcc      1776
Gly Lys Met Ile Val Ile Asp Gly Gly Phe Ser Lys Ala Tyr Gln Ser
                580                585                590
aca aca ggc atc gcc ggc tac acg ctg cta tac aac tcc tac ggc atg      1824
Thr Thr Gly Ile Ala Gly Tyr Thr Leu Leu Tyr Asn Ser Tyr Gly Met
                595                600                605
cag ctc gtc gcc cat aaa cac ttc aat tcc aag gca gaa gtc cta agc      1872
Gln Leu Val Ala His Lys His Phe Asn Ser Lys Ala Glu Val Leu Ser
                610                615                620
acc gga acc gac gtc tta acg gtc aaa cga tta gtg gac aaa gag ctt      1920
Thr Gly Thr Asp Val Leu Thr Val Lys Arg Leu Val Asp Lys Glu Leu
                625                630                635                640
gag cgg aag aaa gtg aag gaa acg aat gtg ggt gag gaa ttg ttg cag      1968
Glu Arg Lys Lys Val Lys Glu Thr Asn Val Gly Glu Glu Leu Leu Gln
                645                650                655
gaa gtt gcg att tta gag agt ttg cgg gag tat cgg tat atg aag      2013
Glu Val Ala Ile Leu Glu Ser Leu Arg Glu Tyr Arg Tyr Met Lys
                660                665                670

```

<210> 2

<211> 671

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 2

```

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

```

10

ES 2 401 607 T3

Arg Met Ile Lys Leu Val Ser Tyr Cys Ser Ser Lys Tyr Thr Arg Ser
 145 150 155 160
 Lys Leu Arg Lys Ala Leu Pro Ala Gln Phe Ala Tyr Ile Thr Glu Glu
 165 170 175
 Leu Leu Tyr Lys Thr Glu Gln Ala Gly Asn Lys Glu Gln Tyr Tyr Ser
 180 185 190
 Glu Ile Ile Asp Gln Ile Ile Glu Leu Gly Gln Ala Asp Lys Leu Ile
 195 200 205
 Thr Gly Leu Ala Tyr Ser Val Gln Arg Leu Val Val Asp His Leu His
 210 215 220
 Val Val Gly Asp Ile Tyr Asp Arg Gly Pro Gln Pro Asp Arg Ile Met
 225 230 235 240
 Glu Glu Leu Ile Asn Tyr His Ser Val Asp Ile Gln Trp Gly Asn His
 245 250 255
 Asp Val Leu Trp Ile Gly Ala Tyr Ser Gly Ser Lys Val Cys Leu Ala
 260 265 270
 Asn Ile Ile Arg Ile Cys Ala Arg Tyr Asp Asn Leu Asp Ile Ile Glu
 275 280 285
 Asp Val Tyr Gly Ile Asn Leu Arg Pro Leu Leu Asn Leu Ala Glu Lys
 290 295 300
 Tyr Tyr Asp Asp Asn Pro Ala Phe Arg Pro Lys Ala Asp Glu Asn Arg
 305 310 315 320
 Pro Glu Asp Glu Ile Lys Gln Ile Thr Lys Ile His Gln Ala Ile Ala
 325 330 335
 Met Ile Gln Phe Lys Leu Glu Ser Pro Ile Ile Lys Arg Arg Pro Asn
 340 345 350
 Phe Asn Met Glu Glu Arg Leu Leu Leu Glu Lys Ile Asp Tyr Asp Lys
 355 360 365
 Asn Glu Ile Thr Leu Asn Gly Lys Thr Tyr Gln Leu Glu Asn Thr Cys
 370 375 380
 Phe Ala Thr Ile Asn Pro Glu Gln Pro Asp Gln Leu Leu Glu Glu Glu
 385 390 395 400
 Ala Glu Val Ile Asp Lys Leu Leu Phe Ser Val Gln His Ser Glu Lys
 405 410 415
 Leu Gly Arg His Met Asn Phe Met Met Lys Lys Gly Ser Leu Tyr Leu
 420 425 430
 Lys Tyr Asn Gly Asn Leu Leu Ile His Gly Cys Ile Pro Val Asp Glu
 435 440 445
 Asn Gly Asn Met Glu Thr Met Met Ile Glu Asp Lys Pro Tyr Ala Gly
 450 455 460
 Arg Glu Leu Leu Asp Val Phe Glu Arg Phe Leu Arg Glu Ala Phe Ala
 465 470 475 480
 His Pro Glu Glu Thr Asp Asp Leu Ala Thr Asp Met Ala Trp Tyr Leu
 485 490 495
 Trp Thr Gly Glu Tyr Ser Ser Leu Phe Gly Lys Arg Ala Met Thr Thr
 500 505 510
 Phe Glu Arg Tyr Phe Ile Lys Glu Lys Glu Thr His Lys Glu Lys Lys
 515 520 525
 Asn Pro Tyr Tyr Tyr Leu Arg Glu Asp Glu Ala Thr Cys Arg Asn Ile
 530 535 540
 Leu Ala Glu Phe Gly Leu Asn Pro Asp His Gly His Ile Ile Asn Gly
 545 550 555 560
 His Thr Pro Val Lys Glu Ile Glu Gly Glu Asp Pro Ile Lys Ala Asn
 565 570 575
 Gly Lys Met Ile Val Ile Asp Gly Gly Phe Ser Lys Ala Tyr Gln Ser
 580 585 590
 Thr Thr Gly Ile Ala Gly Tyr Thr Leu Leu Tyr Asn Ser Tyr Gly Met
 595 600 605
 Gln Leu Val Ala His Lys His Phe Asn Ser Lys Ala Glu Val Leu Ser
 610 615 620
 Thr Gly Thr Asp Val Leu Thr Val Lys Arg Leu Val Asp Lys Glu Leu
 625 630 635 640
 Glu Arg Lys Lys Val Lys Glu Thr Asn Val Gly Glu Glu Leu Leu Gln
 645 650 655
 Glu Val Ala Ile Leu Glu Ser Leu Arg Glu Tyr Arg Tyr Met Lys
 660 665 670

<210> 3
 <211> 954
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

5

ES 2 401 607 T3

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

5

<400> 3

```

atg tct aat caa tac gga gat aag aat tta aag att ttt tct ttg aat      48
Met Ser Asn Gln Tyr Gly Asp Lys Asn Leu Lys Ile Phe Ser Leu Asn
1      5      10      15
tcg aat cca gag ctt gca aaa gaa atc gca gat ata gtt gga gtt caa      96
Ser Asn Pro Glu Leu Ala Lys Glu Ile Ala Asp Ile Val Gly Val Gln
20      25      30
tta ggg aaa tgt tct gtc aca aga ttt agt gac ggg gaa gtc caa att      144
Leu Gly Lys Cys Ser Val Thr Arg Phe Ser Asp Gly Glu Val Gln Ile
35      40      45
aat atc gaa gaa agt att cgc gga tgt gat tgt tac atc atc cag tct      192
Asn Ile Glu Glu Ser Ile Arg Gly Cys Asp Cys Tyr Ile Ile Gln Ser
50      55      60
aca agt gac ccc gtt aac gag cat att atg gaa ctg ctg att atg gta      240
Thr Ser Asp Pro Val Asn Glu His Ile Met Glu Leu Leu Ile Met Val
65      70      75      80
gat gcg tta aaa cgc gct tct gca aaa acg att aac att gtt att cct      288
Asp Ala Leu Lys Arg Ala Ser Ala Lys Thr Ile Asn Ile Val Ile Pro
85      90      95
tat tac ggt tat gcg cgt caa gac aga aaa gca aga tcc cgt gag cca      336
Tyr Tyr Gly Tyr Ala Arg Gln Asp Arg Lys Ala Arg Ser Arg Glu Pro
100      105      110
atc aca gct aaa ctt ttc gct aac ctg ctt gaa aca gcc ggt gcg act      384
Ile Thr Ala Lys Leu Phe Ala Asn Leu Leu Glu Thr Ala Gly Ala Thr
115      120      125
cgt gtg att gca ctt gac ctg cat gcg ccg caa att caa gga ttc ttt      432
Arg Val Ile Ala Leu Asp Leu His Ala Pro Gln Ile Gln Gly Phe Phe
130      135      140
gat ata ccg att gac cac tta atg ggt gtt ccg att tta gga gaa tat      480
Asp Ile Pro Ile Asp His Leu Met Gly Val Pro Ile Leu Gly Glu Tyr
145      150      155      160
ttt gaa ggc aaa aat ctt gaa gat atc gtc att gtt tca cca gac cat      528
Phe Glu Gly Lys Asn Leu Glu Asp Ile Val Ile Val Ser Pro Asp His
165      170      175
ggc ggt gtg aca cgt gcc cgc aaa ctg gct gac cga cta aaa gcg cca      576
Gly Gly Val Thr Arg Ala Arg Lys Leu Ala Asp Arg Leu Lys Ala Pro
180      185      190
att gcg att atc gat aaa cgc cgt ccg cgt cca aac gtg gcg gaa gtc      624
Ile Ala Ile Ile Asp Lys Arg Arg Pro Arg Pro Asn Val Ala Glu Val
195      200      205
atg aat att gta ggt aac atc gaa ggg aag act gct atc ctc atc gat      672
Met Asn Ile Val Gly Asn Ile Glu Gly Lys Thr Ala Ile Leu Ile Asp

      210      215      220
gac att att gat act gca ggt acg att aca ctt gct gct aat gcg ctc      720
Asp Ile Ile Asp Thr Ala Gly Thr Ile Thr Leu Ala Ala Asn Ala Leu
225      230      235      240
gtt gaa aac gga gcg aaa gaa gta tat gca tgc tgt aca cac cct gta      768
Val Glu Asn Gly Ala Lys Glu Val Tyr Ala Cys Cys Thr His Pro Val
245      250      255
cta tca ggc cct gcg gtt gaa cgg att aat aat tca aca att aaa gag      816
Leu Ser Gly Pro Ala Val Glu Arg Ile Asn Asn Ser Thr Ile Lys Glu
260      265      270
ctt gtt gtg aca aac agc atc aag ctt cct gaa gaa aag aaa att gaa      864
Leu Val Val Thr Asn Ser Ile Lys Leu Pro Glu Glu Lys Lys Ile Glu
275      280      285
cgc ttt aag cag ctt tca gtc gga ccg ctt ctg gcc gaa gcg att att      912
Arg Phe Lys Gln Leu Ser Val Gly Pro Leu Leu Ala Glu Ala Ile Ile
290      295      300
cgc gtt cat gag cag caa tca gtc agc tat ctg ttc agc taa      954
Arg Val His Glu Gln Gln Ser Val Ser Tyr Leu Phe Ser
305      310      315

```

10

ES 2 401 607 T3

<210> 4
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 4

```

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

10

<210> 5
 <211> 858
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(858)

20

<400> 5

ES 2 401 607 T3

atg aag ttt cgt cgc agc ggc aga ttg gtg gac tta aca aat tat ttg	48
Met Lys Phe Arg Arg Ser Gly Arg Leu Val Asp Leu Thr Asn Tyr Leu	
1 5 10 15	
tta acc cat ccg cac gag tta ata ccg cta acc ttt ttc tct gag cgg	96
Leu Thr His Pro His Glu Leu Ile Pro Leu Thr Phe Phe Ser Glu Arg	
20 25 30	
tat gaa tct gca aaa tca tcg atc agt gaa gat tta aca att att aaa	144
Tyr Glu Ser Ala Lys Ser Ser Ile Ser Glu Asp Leu Thr Ile Ile Lys	
35 40 45	
caa acc ttt gaa cag cag ggg att ggt act ttg ctt act gtt ccc gga	192
Gln Thr Phe Glu Gln Gln Gly Ile Gly Thr Leu Leu Thr Val Pro Gly	
50 55 60	
gct gcc gga ggc gtt aaa tat att ccg aaa atg aag cag gct gaa gct	240
Ala Ala Gly Gly Val Lys Tyr Ile Pro Lys Met Lys Gln Ala Glu Ala	
65 70 75 80	
gaa gag ttt gtg cag aca ctt gga cag tcg ctg gca aat cct gag cgt	288
Glu Glu Phe Val Gln Thr Leu Gly Gln Ser Leu Ala Asn Pro Glu Arg	
85 90 95	
atc ctt ccg ggc ggt tat gta tat tta acg gat atc tta gga aag cca	336
Ile Leu Pro Gly Gly Tyr Val Tyr Leu Thr Asp Ile Leu Gly Lys Pro	
100 105 110	
tct gta ctc tcc aag gta ggg aag ctg ttt gct tcc gtg ttt gca gag	384
Ser Val Leu Ser Lys Val Gly Lys Leu Phe Ala Ser Val Phe Ala Glu	
115 120 125	
cgc gaa att gat gtt gtc atg acc gtt gcc acg aaa ggc atc cct ctt	432
Arg Glu Ile Asp Val Val Met Thr Val Ala Thr Lys Gly Ile Pro Leu	
130 135 140	
gcg tac gca gct gca agc tat ttg aat gtg cct gtt gtg atc gtt cgt	480
Ala Tyr Ala Ala Ala Ser Tyr Leu Asn Val Pro Val Val Ile Val Arg	
145 150 155 160	
aaa gac aat aag gta aca gag ggc tcc aca gtc agc att aat tac gtt	528
Lys Asp Asn Lys Val Thr Glu Gly Ser Thr Val Ser Ile Asn Tyr Val	
165 170 175	
tca ggc tcc tca aac cgc att caa aca atg tca ctt gcg aaa aga agc	576
Ser Gly Ser Ser Asn Arg Ile Gln Thr Met Ser Leu Ala Lys Arg Ser	
180 185 190	
atg aaa acg ggt tca aac gta ctc att gat gac ttt atg aaa gca	624
Met Lys Thr Gly Ser Asn Val Leu Ile Ile Asp Asp Phe Met Lys Ala	
195 200 205	
ggc ggc acc att aat ggt atg att aac ctg ttg gat gag ttt aac gca	672
Gly Gly Thr Ile Asn Gly Met Ile Asn Leu Leu Asp Glu Phe Asn Ala	
210 215 220	
aat gtg gcg gga atc ggc gtc tta gtt gaa gcc gaa gga gta gat gaa	720
Asn Val Ala Gly Ile Gly Val Leu Val Glu Ala Glu Gly Val Asp Glu	
225 230 235 240	
cgt ctt gtt gac gaa tat atg tca ctt ctt act ctt tca acc atc aac	768
Arg Leu Val Asp Glu Tyr Met Ser Leu Leu Thr Leu Ser Thr Ile Asn	
245 250 255	
atg aaa gag aag tcc att gaa att cag aat ggc aat ttt ctg cgt ttt	816
Met Lys Glu Lys Ser Ile Glu Ile Gln Asn Gly Asn Phe Leu Arg Phe	
260 265 270	
ttt aaa gac aat ctt tta aag aat gga gag aca gaa tca tga	858
Phe Lys Asp Asn Leu Leu Lys Asn Gly Glu Thr Glu Ser	
275 280 285	

5

<210> 6
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

10

<400> 6

ES 2 401 607 T3

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

5 <210> 7
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(702)

<400> 7

atg agt gta cat ata ggt gct gaa aaa gga caa att gcg gat act gtg 48
 Met Ser Val His Ile Gly Ala Glu Lys Gly Gln Ile Ala Asp Thr Val
 1 5 10 15
 ctt ttg ccg gga gat cct ctc aga gca aaa ttt att gca gaa acg tat 96
 Leu Leu Pro Gly Asp Pro Leu Arg Ala Lys Phe Ile Ala Glu Thr Tyr
 20 25 30
 ctt gaa aat gta gaa tgc tac aat gaa gtc aga ggc atg tat gga ttt 144
 Leu Glu Asn Val Glu Cys Tyr Asn Glu Val Arg Gly Met Tyr Gly Phe

ES 2 401 607 T3

```

          35          40          45
acg ggt aca tat aaa ggt aaa aaa atc tca gta caa ggc acg gga atg      192
Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Lys Lys Ile Ser Val Gln Gly Thr Gly Met
      50          55          60
gga gtt ccg tct att tca att tat gtg aat gaa tta att caa agc tac      240
Gly Val Pro Ser Ile Ser Ile Tyr Val Asn Glu Leu Ile Gln Ser Tyr
      65          70          75          80
gat gtg caa aat cta ata aga gtc ggt tcc tgc ggc gct att cgt aaa      288
Asp Val Gln Asn Leu Ile Arg Val Gly Ser Cys Gly Ala Ile Arg Lys
      85          90          95
gat gtc aaa gtg cga gac gtc att ttg gcg atg acc tcc tca act gat      336
Asp Val Lys Val Arg Asp Val Ile Leu Ala Met Thr Ser Ser Thr Asp
      100          105          110
tca caa atg aac aga gtt gct ttc gga agc gtt gat ttt gcg cct tgc      384
Ser Gln Met Asn Arg Val Ala Phe Gly Ser Val Asp Phe Ala Pro Cys
      115          120          125
gca gat ttc gag ctt tta aaa aat gcc tat gat gcc gca aag gat aaa      432
Ala Asp Phe Glu Leu Leu Lys Asn Ala Tyr Asp Ala Ala Lys Asp Lys
      130          135          140
ggt gtg ccg gtg act gta gga agc gta ttt aca gct gac cag ttc tac      480
Gly Val Pro Val Thr Val Gly Ser Val Phe Thr Ala Asp Gln Phe Tyr
      145          150          155          160
aat gac gat tcg caa att gaa aaa ctt gca aaa tac ggt gtg ctt ggc      528
Asn Asp Asp Ser Gln Ile Glu Lys Leu Ala Lys Tyr Gly Val Leu Gly
      165          170          175
gtt gaa atg gaa aca act gca ttg tat aca tta gca gcg aag cac gga      576
Val Glu Met Glu Thr Thr Ala Leu Tyr Thr Leu Ala Ala Lys His Gly
      180          185          190
aga aaa gcc ctg tca att ctc acc gtg agt gat cac gta tta aca gga      624
Arg Lys Ala Leu Ser Ile Leu Thr Val Ser Asp His Val Leu Thr Gly
      195          200          205
gaa gaa acg aca gcg gaa gag cgt caa acg aca ttt cat gat atg ata      672
Glu Glu Thr Thr Ala Glu Glu Arg Gln Thr Thr Phe His Asp Met Ile
      210          215          220
gaa gtg gct tta cat tcc gta tca caa taa      702
Glu Val Ala Leu His Ser Val Ser Gln
      225          230

```

<210> 8

5 <211> 233

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 8

10

```

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

```


ES 2 401 607 T3

<210> 9
 <211> 816
 <212> ADN
 5 <213> Bacillus subtilis

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(816)
 10 <400> 9

```

ttg aag gac aga att gaa cgc gca gcc gct ttt att aaa caa aac ctg      48
Leu Lys Asp Arg Ile Glu Arg Ala Ala Phe Ile Lys Gln Asn Leu
1          5          10          15
ccg gaa tct cca aag atc ggc ctt att tta ggc tca ggt ctt ggc att      96
Pro Glu Ser Pro Lys Ile Gly Leu Ile Leu Gly Ser Gly Leu Gly Ile
          20          25          30
ttg gcg gac gaa atc gaa aat ccg gtc aag ctg aaa tat gaa gat ata      144
Leu Ala Asp Glu Ile Glu Asn Pro Val Lys Leu Lys Tyr Glu Asp Ile
          35          40          45
cct gaa ttc ccg gta tct act gtt gaa ggg cat gcc gga cag ctt gtg      192
Pro Glu Phe Pro Val Ser Thr Val Glu Gly His Ala Gly Gln Leu Val
          50          55          60
ctt ggc act ctt gaa gga gtt tcc gtc att gca atg cag ggc cgc ttt      240
Leu Gly Thr Leu Glu Gly Val Ser Val Ile Ala Met Gln Gly Arg Phe
          65          70          75          80
cat ttt tat gaa ggc tac tca atg gag aaa gtc aca ttc cct gta cgc      288
His Phe Tyr Glu Gly Tyr Ser Met Glu Lys Val Thr Phe Pro Val Arg
          85          90          95
gtg atg aaa gcg ctc ggt gtg gaa gcg ttg atc gtg aca aat gcc gca      336
Val Met Lys Ala Leu Gly Val Glu Ala Leu Ile Val Thr Asn Ala Ala
          100          105          110
ggc ggt gtc aac act gaa ttc cgt gcg gga gat tta atg att att acc      384
Gly Gly Val Asn Thr Glu Phe Arg Ala Gly Asp Leu Met Ile Ile Thr
          115          120          125
gat cat atc aac ttt atg gga aca aac ccg tta atc ggg cca aac gaa      432
Asp His Ile Asn Phe Met Gly Thr Asn Pro Leu Ile Gly Pro Asn Glu
          130          135          140
gca gat ttc ggc gcc aga ttt cca gat atg tct tca gcc tat gac aaa      480
Ala Asp Phe Gly Ala Arg Phe Pro Asp Met Ser Ser Ala Tyr Asp Lys
          145          150          155          160
gat ctg tcc agc ctg gct gaa aag att gcg aaa gac ctt aat atc cca      528
Asp Leu Ser Ser Leu Ala Glu Lys Ile Ala Lys Asp Leu Asn Ile Pro
          165          170          175          180
att caa aaa ggc gtg tac act gct gtg aca gga cct tct tac gaa aca      576
Ile Gln Lys Gly Val Tyr Thr Ala Val Thr Gly Pro Ser Tyr Glu Thr
          180          185          190
ccg gca gaa gtc cgt ttc tta aga acg atg ggc tct gat gca gtc ggc      624
Pro Ala Glu Val Arg Phe Leu Arg Thr Met Gly Ser Asp Ala Val Gly
          195          200          205
atg tct act gtt ccg gaa gtc att gta gcg aat cat gcg gga atg cgg      672
Met Ser Thr Val Pro Glu Val Ile Val Ala Asn His Ala Gly Met Arg
          210          215          220
gtt ctt ggc att tcc tgc atc tct aac gcg gca gcc gga att ctg gat      720
Val Leu Gly Ile Ser Cys Ile Ser Asn Ala Ala Ala Gly Ile Leu Asp
          225          230          235          240
cag cct tta agt cac gat gaa gtt atg gaa gtg acc gaa aaa gta aaa      768
Gln Pro Leu Ser His Asp Glu Val Met Glu Val Thr Glu Lys Val Lys
          245          250          255
gct gga ttc tta aag ctt gtt aaa gcg atc gtc gct cag tac gaa taa      816
Ala Gly Phe Leu Lys Leu Val Lys Ala Ile Val Ala Gln Tyr Glu
          260          265          270

```

15 <210> 10
 <211> 271
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis
 20 <400> 10

ES 2 401 607 T3

```

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

Ala Asp Phe Gly Ala Arg Phe Pro Asp Met Ser Ser Ala Tyr Asp Lys
145     150     155     160
Asp Leu Ser Ser Leu Ala Glu Lys Ile Ala Lys Asp Leu Asn Ile Pro
165     170     175
Ile Gln Lys Gly Val Tyr Thr Ala Val Thr Gly Pro Ser Tyr Glu Thr
180     185     190
Pro Ala Glu Val Arg Phe Leu Arg Thr Met Gly Ser Asp Ala Val Gly
195     200     205
Met Ser Thr Val Pro Glu Val Ile Val Ala Asn His Ala Gly Met Arg
210     215     220
Val Leu Gly Ile Ser Cys Ile Ser Asn Ala Ala Gly Ile Leu Asp
225     230     235     240
Gln Pro Leu Ser His Asp Glu Val Met Glu Val Thr Glu Lys Val Lys
245     250     255
Ala Gly Phe Leu Lys Leu Val Lys Ala Ile Val Ala Gln Tyr Glu
260     265     270

```

5 <210> 11
 <211> 1293
 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1293)

15 <400> 11

```

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

```

ES 2 401 607 T3

```

          165              170              175
aca gaa ggg ttt aaa ctt gag gat atc tta gac gaa tat tat gag tac      576
Thr Glu Gly Phe Lys Leu Glu Asp Ile Leu Asp Glu Tyr Tyr Glu Tyr
          180              185              190
gga cag cag att aaa aag tat gtt tgc gat aca tct gtt gtc tta aac      624
Gly Gln Gln Ile Lys Lys Tyr Val Cys Asp Thr Ser Val Val Leu Asn
          195              200              205
gat gct ctt gat gaa ggg cgc cgt gta tta ttt gaa ggc gca caa ggg      672
Asp Ala Leu Asp Glu Gly Arg Arg Val Leu Phe Glu Gly Ala Gln Gly
          210              215              220
gtt atg ctc gat atc gac caa gga aca tac ccg ttt gtt acg tca tct      720
Val Met Leu Asp Ile Asp Gln Gly Thr Tyr Pro Phe Val Thr Ser Ser
          225              230              235              240
aac ccg gtt gcc ggc ggt gtc acg atc ggt tct ggt gtc ggc ccg acc      768
Asn Pro Val Ala Gly Gly Val Thr Ile Gly Ser Gly Val Gly Pro Thr
          245              250              255
aaa atc aag cac gtt gtc ggt gta tca aaa gca tat acg act cgt gtc      816
Lys Ile Lys His Val Val Gly Val Ser Lys Ala Tyr Thr Thr Arg Val
          260              265              270
ggc gac ggt cct ttt ccg act gag ctg aaa gat gaa atc ggc gat caa      864
Gly Asp Gly Pro Phe Pro Thr Glu Leu Lys Asp Glu Ile Gly Asp Gln
          275              280              285
atc cgt gaa gtc gga cgc gaa tat gga aca aca aca ggc cgc ccg cgc      912
Ile Arg Glu Val Gly Arg Glu Tyr Gly Thr Thr Thr Gly Arg Pro Arg
          290              295              300
cgt gtc ggc tgg ttt gac agc gtt gtt gtc cgc cac gcc cgc cgt gtg      960
Arg Val Gly Trp Phe Asp Ser Val Val Val Arg His Ala Arg Arg Val
          305              310              315              320
agc gga att aca gat ctt tct ctg aac tca att gac gtc cta gca gga      1008
Ser Gly Ile Thr Asp Leu Ser Leu Asn Ser Ile Asp Val Leu Ala Gly
          325              330              335
att gaa acg ttg aaa atc tgt gtg gcg tac cgc tac aaa ggc gaa atc      1056
Ile Glu Thr Leu Lys Ile Cys Val Ala Tyr Arg Tyr Lys Gly Glu Ile
          340              345              350
att gaa gaa ttc cca gca agt ctt aag gca ctt gct gaa tgt gag ccg      1104
Ile Glu Glu Phe Pro Ala Ser Leu Lys Ala Leu Ala Glu Cys Glu Pro
          355              360              365
gta tat gaa gaa atg ccg ggc tgg act gag gat att aca ggt gcg aag      1152
Val Tyr Glu Glu Met Pro Gly Trp Thr Glu Asp Ile Thr Gly Ala Lys
          370              375              380
agc ttg agc gag ctt ccg gaa aat gcg cgc cat tat ctt gag cgt gtg      1200
Ser Leu Ser Glu Leu Pro Glu Asn Ala Arg His Tyr Leu Glu Arg Val
          385              390              395              400
tct cag ctg aca ggc att ccg ctt tct att ttc tct gtc ggt cca gac      1248
Ser Gln Leu Thr Gly Ile Pro Leu Ser Ile Phe Ser Val Gly Pro Asp
          405              410              415
cgc tca caa aca aat gtc ctt cgc agt gtg tac cgt gcg aac taa      1293
Arg Ser Gln Thr Asn Val Leu Arg Ser Val Tyr Arg Ala Asn
          420              425              430

```

5 <210> 12
 <211> 430
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

10 <400> 12

```

Met Ser Ser Val Val Val Val Gly Thr Gln Trp Gly Asp Glu Gly Lys
1          5          10          15
Gly Lys Ile Thr Asp Phe Leu Ser Glu Asn Ala Glu Val Ile Ala Arg
          20          25          30

```

ES 2 401 607 T3

Tyr Gln Gly Gly Asn Asn Ala Gly His Thr Ile Lys Phe Asp Gly Ile
 35 40 45
 Thr Tyr Lys Leu His Leu Ile Pro Ser Gly Ile Phe Tyr Lys Asp Lys
 50 55 60
 Thr Cys Val Ile Gly Asn Gly Met Val Val Asp Pro Lys Ala Leu Val
 65 70 75 80
 Thr Glu Leu Ala Tyr Leu His Glu Arg Asn Val Ser Thr Asp Asn Leu
 85 90 95
 Arg Ile Ser Asn Arg Ala His Val Ile Leu Pro Tyr His Leu Lys Leu
 100 105 110
 Asp Glu Val Glu Glu Glu Arg Lys Gly Ala Asn Lys Ile Gly Thr Thr
 115 120 125
 Lys Lys Gly Ile Gly Pro Ala Tyr Met Asp Lys Ala Ala Arg Ile Gly
 130 135 140
 Ile Arg Ile Ala Asp Leu Leu Asp Arg Asp Ala Phe Ala Glu Lys Leu
 145 150 155 160
 Glu Arg Asn Leu Glu Glu Lys Asn Arg Leu Leu Glu Lys Met Tyr Glu
 165 170 175
 Thr Glu Gly Phe Lys Leu Glu Asp Ile Leu Asp Glu Tyr Tyr Glu Tyr
 180 185 190
 Gly Gln Gln Ile Lys Lys Tyr Val Cys Asp Thr Ser Val Val Leu Asn
 195 200 205
 Asp Ala Leu Asp Glu Gly Arg Val Leu Phe Glu Gly Ala Gln Gly
 210 215 220
 Val Met Leu Asp Ile Asp Gln Gly Thr Tyr Pro Phe Val Thr Ser Ser
 225 230 235 240
 Asn Pro Val Ala Gly Gly Val Thr Ile Gly Ser Gly Val Gly Pro Thr
 245 250 255
 Lys Ile Lys His Val Val Gly Val Ser Lys Ala Tyr Thr Thr Arg Val
 260 265 270
 Gly Asp Gly Pro Phe Pro Thr Glu Leu Lys Asp Glu Ile Gly Asp Gln
 275 280 285
 Ile Arg Glu Val Gly Arg Glu Tyr Gly Thr Thr Thr Gly Arg Pro Arg
 290 295 300
 Arg Val Gly Trp Phe Asp Ser Val Val Val Arg His Ala Arg Arg Val
 305 310 315 320
 Ser Gly Ile Thr Asp Leu Ser Leu Asn Ser Ile Asp Val Leu Ala Gly
 325 330 335
 Ile Glu Thr Leu Lys Ile Cys Val Ala Tyr Arg Tyr Lys Gly Glu Ile
 340 345 350
 Ile Glu Glu Phe Pro Ala Ser Leu Lys Ala Leu Ala Glu Cys Glu Pro
 355 360 365
 Val Tyr Glu Glu Met Pro Gly Trp Thr Glu Asp Ile Thr Gly Ala Lys
 370 375 380
 Ser Leu Ser Glu Leu Pro Glu Asn Ala Arg His Tyr Leu Glu Arg Val
 385 390 395 400
 Ser Gln Leu Thr Gly Ile Pro Leu Ser Ile Phe Ser Val Gly Pro Asp
 405 410 415
 Arg Ser Gln Thr Asn Val Leu Arg Ser Val Tyr Arg Ala Asn
 420 425 430

<210> 13
 <211> 1542
 5 <212> ADN
 <213> Bacillus subtilis

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(1542)

<400> 13

ES 2 401 607 T3

atg tgg gaa agt aaa ttt tca aaa gaa ggc tta acg ttc gac gat gtg	48
Met Trp Glu Ser Lys Phe Ser Lys Glu Gly Leu Thr Phe Asp Asp Val	
1 5 10 15	
ctg ctt gtg cca gca aag tct gag gta ctt ccg cat gat gtg gat tta	96
Leu Leu Val Pro Ala Lys Ser Glu Val Leu Pro His Asp Val Asp Leu	
20 25 30	
tct gta gaa ctt aca aaa acg tta aag cta aat att cct gtc atc agc	144
Ser Val Glu Leu Thr Lys Thr Leu Lys Leu Asn Ile Pro Val Ile Ser	
35 40 45	
gca ggt atg gac act gta aca gaa tca gca atg gca att gca atg gca	192
Ala Gly Met Asp Thr Val Thr Glu Ser Ala Met Ala Ile Ala Met Ala	
50 55 60	
aga cag ggc ggc ttg ggc atc att cac aaa aat atg tcc att gaa cag	240
Arg Gln Gly Gly Leu Gly Ile Ile His Lys Asn Met Ser Ile Glu Gln	
65 70 75 80	
cag gct gaa caa gtt gat aaa gta aag cgt tct gag cgc ggc gtt atc	288
Gln Ala Glu Gln Val Asp Lys Val Lys Arg Ser Glu Arg Gly Val Ile	
85 90 95	
aca aat ccc ttc ttt tta act cct gat cac caa gta ttt gat gcg gag	336
Thr Asn Pro Phe Phe Leu Thr Pro Asp His Gln Val Phe Asp Ala Glu	
100 105 110	
cat ttg atg ggg aaa tac aga att tcc ggt gtt ccg att gta aat aac	384
His Leu Met Gly Lys Tyr Arg Ile Ser Gly Val Pro Ile Val Asn Asn	
115 120 125	
gaa gaa gac cag aag ctt gtt gga att att aca aac cgt gac ctt cgt	432
Glu Glu Asp Gln Lys Leu Val Gly Ile Ile Thr Asn Arg Asp Leu Arg	
130 135 140	
ttt att tct gac tac tca atg aaa atc agc gac gtc atg acg aaa gaa	480
Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Met Lys Ile Ser Asp Val Met Thr Lys Glu	
145 150 155 160	
gag cta gtt act gca tct gta gga act act ctg gat gaa gct gaa aag	528
Glu Leu Val Thr Ala Ser Val Gly Thr Thr Leu Asp Glu Ala Glu Lys	
165 170 175	
att ttg caa aaa cat aaa att gaa aag ctt cct ctc gta gat gac cag	576
Ile Leu Gln Lys His Lys Ile Glu Lys Leu Pro Leu Val Asp Asp Gln	
180 185 190	
aat aaa tta aaa ggt ctt atc aca att aaa gac att gaa aaa gtc att	624
Asn Lys Leu Lys Gly Leu Ile Thr Ile Lys Asp Ile Glu Lys Val Ile	
195 200 205	
gag ttc ccg aac tca tct aaa gac att cac ggc cgc ctg atc gtt ggc	672
Glu Phe Pro Asn Ser Ser Lys Asp Ile His Gly Arg Leu Ile Val Gly	
210 215 220	
gcg gca gtt ggt gta act ggc gat aca atg act cgc gtc aaa aag ctt	720
Ala Ala Val Gly Val Thr Gly Asp Thr Met Thr Arg Val Lys Lys Leu	
225 230 235 240	
gtt gaa gcc aat gtt gat gtg att gtt atc gat aca gct cac gga cac	768
Val Glu Ala Asn Val Asp Val Ile Val Ile Asp Thr Ala His Gly His	
245 250 255	
tct caa ggc gtt tta aac aca gtt aca aaa atc cgt gaa acg tat ccc	816
Ser Gln Gly Val Leu Asn Thr Val Thr Lys Ile Arg Glu Thr Tyr Pro	
260 265 270	
gaa tta aac att att gct gga aac gtg gca aca gct gaa gcg aca aga	864
Glu Leu Asn Ile Ile Ala Gly Asn Val Ala Thr Ala Glu Ala Thr Arg	
275 280 285	
gcg ctt atc gaa gct gga gca gac gtt gtc aaa gtt gga ata ggg cct	912
Ala Leu Ile Glu Ala Gly Ala Asp Val Val Lys Val Gly Ile Gly Pro	
290 295 300	
ggt tca att tgt act aca cgt gtt gta gcc ggg gtg ggt gtt ccg caa	960

ES 2 401 607 T3

Gly Ser Ile Cys Thr Thr Arg Val Val Ala Gly Val Gly Val Pro Gln
 305 310 315 320
 att aca gca att tat gat tgt gcg act gaa gca aga aaa cac ggc aaa 1008
 Ile Thr Ala Ile Tyr Asp Cys Ala Thr Glu Ala Arg Lys His Gly Lys
 325 330 335
 aca atc atc gcc gac ggt ggg att aaa ttc tct ggc gat atc act aaa 1056
 Thr Ile Ile Ala Asp Gly Gly Ile Lys Phe Ser Gly Asp Ile Thr Lys
 340 345 350
 gca ttg gca gcc ggc gga cat gct gtt atg ctc gga agc ttg ctt gca 1104
 Ala Leu Ala Ala Gly Gly His Ala Val Met Leu Gly Ser Leu Leu Ala
 355 360 365
 ggc aca tca gaa agc cct ggt gaa act gaa atc tac caa ggc aga aga 1152
 Gly Thr Ser Glu Ser Pro Gly Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Gly Arg Arg
 370 375 380
 ttt aag gta tac cgc ggc atg gga tca gtt gct gca atg gaa aaa gga 1200
 Phe Lys Val Tyr Arg Gly Met Gly Ser Val Ala Ala Met Glu Lys Gly
 385 390 395 400
 agt aaa gac cgt tac ttc caa gaa gaa aac aaa aaa ttt gtt cct gaa 1248
 Ser Lys Asp Arg Tyr Phe Gln Glu Glu Asn Lys Lys Phe Val Pro Glu
 405 410 415
 gga att gaa gga cgc aca cct tac aaa ggg cca gtt gaa gaa acc gtt 1296
 Gly Ile Glu Gly Arg Thr Pro Tyr Lys Gly Pro Val Glu Glu Thr Val
 420 425 430
 tat cag cta gtc gga ggc ctt cgt tct ggt atg ggg tat tgc ggg tcc 1344
 Tyr Gln Leu Val Gly Gly Leu Arg Ser Gly Met Gly Tyr Cys Gly Ser
 435 440 445
 aaa gat ctg cgt gcg cta aga gaa gaa gct cag ttc att cgc atg act 1392
 Lys Asp Leu Arg Ala Leu Arg Glu Glu Ala Gln Phe Ile Arg Met Thr
 450 455 460
 ggc gca gga ctt cgc gaa agc cat ccg cat gac gta cag att aca gtg 1440
 Gly Ala Gly Leu Arg Glu Ser His Pro His Asp Val Gln Ile Thr Val
 465 470 475 480
 cat cgt aat aag gcg ctt cct ggt cta ttt ggt tct cat cag aaa aaa 1488
 His Arg Asn Lys Ala Leu Pro Gly Leu Phe Gly Ser His Gln Lys Lys
 485 490 495
 aca gga ttt gtg tat gat gaa tgt tgt caa tcc ggc ttt ttt tca tcg 1536
 Thr Gly Phe Val Tyr Asp Glu Cys Cys Gln Ser Gly Phe Phe Ser Ser
 500 505 510
 gat tga 1542
 Asp

5 <210> 14
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

10 <400> 14

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

ES 2 401 607 T3

Thr Asn Pro Phe Phe Leu Thr Pro Asp His Gln Val Phe Asp Ala Glu
 100 105 110
 His Leu Met Gly Lys Tyr Arg Ile Ser Gly Val Pro Ile Val Asn Asn
 115 120 125
 Glu Glu Asp Gln Lys Leu Val Gly Ile Ile Thr Asn Arg Asp Leu Arg
 130 135 140
 Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Met Lys Ile Ser Asp Val Met Thr Lys Glu
 145 150 155 160
 Glu Leu Val Thr Ala Ser Val Gly Thr Thr Leu Asp Glu Ala Glu Lys
 165 170 175
 Ile Leu Gln Lys His Lys Ile Glu Lys Leu Pro Leu Val Asp Asp Gln
 180 185 190
 Asn Lys Leu Lys Gly Leu Ile Thr Ile Lys Asp Ile Glu Lys Val Ile
 195 200 205
 Glu Phe Pro Asn Ser Ser Lys Asp Ile His Gly Arg Leu Ile Val Gly
 210 215 220
 Ala Ala Val Gly Val Thr Gly Asp Thr Met Thr Arg Val Lys Lys Leu
 225 230 235 240
 Val Glu Ala Asn Val Asp Val Ile Val Ile Asp Thr Ala His Gly His
 245 250 255
 Ser Gln Gly Val Leu Asn Thr Val Thr Lys Ile Arg Glu Thr Tyr Pro
 260 265 270
 Glu Leu Asn Ile Ile Ala Gly Asn Val Ala Thr Ala Glu Ala Thr Arg
 275 280 285
 Ala Leu Ile Glu Ala Gly Ala Asp Val Val Lys Val Gly Ile Gly Pro
 290 295 300
 Gly Ser Ile Cys Thr Thr Arg Val Val Ala Gly Val Gly Val Pro Gln
 305 310 315 320
 Ile Thr Ala Ile Tyr Asp Cys Ala Thr Glu Ala Arg Lys His Gly Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ile Ala Asp Gly Gly Ile Lys Phe Ser Gly Asp Ile Thr Lys
 340 345 350
 Ala Leu Ala Ala Gly Gly His Ala Val Met Leu Gly Ser Leu Leu Ala
 355 360 365
 Gly Thr Ser Glu Ser Pro Gly Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Gly Arg Arg
 370 375 380
 Phe Lys Val Tyr Arg Gly Met Gly Ser Val Ala Met Glu Lys Gly
 385 390 395 400
 Ser Lys Asp Arg Tyr Phe Gln Glu Glu Asn Lys Lys Phe Val Pro Glu
 405 410 415
 Gly Ile Glu Gly Arg Thr Pro Tyr Lys Gly Pro Val Glu Glu Thr Val
 420 425 430
 Tyr Gln Leu Val Gly Gly Leu Arg Ser Gly Met Gly Tyr Cys Gly Ser
 435 440 445
 Lys Asp Leu Arg Ala Leu Arg Glu Glu Ala Gln Phe Ile Arg Met Thr
 450 455 460
 Gly Ala Gly Leu Arg Glu Ser His Pro His Asp Val Gln Ile Thr Val
 465 470 475 480
 His Arg Asn Lys Ala Leu Pro Gly Leu Phe Gly Ser His Gln Lys Lys
 485 490 495
 Thr Gly Phe Val Tyr Asp Glu Cys Cys Gln Ser Gly Phe Phe Ser Ser
 500 505 510
 Asp

5 <210> 15
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 15
 gaagttgatg atcaaaa

17

15 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 401 607 T3

	<220> <223> cebador	
5	<400> 16 acattattgtt gacgataat	19
10	<210> 17 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 17 ttcccttagg gttattttcg ttcaaaa	28
20	<210> 18 <211> 50 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> cebador	
	<400> 18 cgtttggga actaatgggt gcttttatga gcatgtgcat gataaggtga	50
30	<210> 19 <211> 50 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador	
40	<400> 19 acagctccag atccatatcc ttcttttta gagagtttgc gggagtatcg	50
45	<210> 20 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador	
	<400> 20 taaaggtttt tcgggataag attgaaa	27
55	<210> 21 <211> 50 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> cebador	
	<400> 21 tcacctatc atgcacatgc tcataaaagc acccattagt tcaacaaacg	50
65	<210> 22 <211> 50 <212> ADN <213> Artificial	

ES 2 401 607 T3

<220>

<223> cebador

5

<400> 22

cgatactccc gcaaactctc taaaaaagaa ggatatggat ctggagctgt

50

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una sustancia derivada de purina, que comprende:

5 cultivar una bacteria perteneciente al género *Bacillus* que presenta una capacidad de producir una sustancia derivada de purina en un medio para provocar la acumulación de la sustancia derivada de purina en células de la bacteria o el medio, y recoger la sustancia derivada de purina a partir de las células o del medio,

10 en el que la bacteria ha sido modificada de manera que la actividad enzimática de la fructosa bisfosfatasa se reduce en comparación con una cepa no modificada mediante la alteración de un gen codificante de fructosa bisfosfatasa, o reduciendo la cantidad de expresión del gen codificante de fructosa bisfosfatasa,

15 en el que el gen codificante de fructosa bisfosfatasa es un gen codificante de una proteína de (A) o (B) siguientes:

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2,

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 que incluye sustituciones, 20 deleciones, inserciones, adiciones o inversiones de 1 a 10 residuos aminoácidos y presenta actividad de fructosa bisfosfatasa, y

25 en el que la sustancia derivada de purina es un nucleósido de purina seleccionado de entre el grupo que consiste en inosina, xantosina, guanosina y adenosina o un nucleótido de purina seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido inosínico, ácido xantílico, ácido guanílico y ácido adenílico.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la bacteria ha sido modificada adicionalmente de manera que se incrementa la actividad de fosforibosil pirofosfato sintetasa en comparación con una cepa no modificada mediante el incremento de la expresión de un gen codificante de la fosforibosil pirofosfato sintetasa en la bacteria mediante la utilización de un plásmido que contiene el gen o integrando el gen en el cromosoma de la bacteria, y en el que el gen codificante de fosforibosil pirofosfato sintetasa es un gen codificante de una proteína de (A) o (B) siguientes:

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4,

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4 que incluye sustituciones, 35 deleciones, inserciones, adiciones o inversiones de 1 a 10 residuos aminoácidos y presenta actividad de fosforibosil pirofosfato sintetasa.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que la bacteria ha sido modificada adicionalmente de manera que se incrementa la cantidad de expresión del operón purina en comparación con una cepa no modificada mediante el incremento de la expresión de genes del operón purina en la bacteria mediante un procedimiento de utilización de un plásmido que contiene los genes o integración de los genes en el cromosoma de la bacteria, mediante la sustitución del promotor nativo del operón purina por un promotor más fuerte, mediante la sustitución de la región -35 o -10 del promotor nativo del operón purina por una secuencia de consenso, mediante la interrupción de un gen codificante de un represor de purina, mediante la reducción de la cantidad de expresión del gen codificante del represor de purina, o mediante la deleción de la secuencia atenuadora del operón purina, y

en el que el gen codificante del represor de purina es un gen codificante de una proteína de las (A) o (B) siguientes:

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6,

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 6 que incluye sustituciones, 50 deleciones, inserciones, adiciones o inversiones de 1 a 10 residuos aminoácidos y que presenta actividad de represor de purina.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la bacteria ha sido modificada adicionalmente de manera que se reduzca la actividad de purina nucleósido fosforilasa en comparación con una cepa no modificada mediante la interrupción de un gen codificante de purina nucleósido fosforilasa o mediante la reducción de la cantidad de expresión del gen codificante de purina nucleósido fosforilasa, y en el que el gen codificante de purina nucleósido fosforilasa es un gen codificante de una proteína de las (A) o (B) siguientes:

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 o nº 10,

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 8 o nº 10 que incluye sustituciones, 60 deleciones, inserciones, adiciones o inserciones de 1 a 10 residuos aminoácidos y que presenta actividad de purina nucleósido fosforilasa.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la bacteria ha sido modificada adicionalmente de manera que se reduzca la actividad de IMP deshidrogenasa en comparación con una cepa no modificada mediante la reducción de la cantidad de expresión del gen codificante de la IMP deshidrogenasa, y en el que el gen codificante de la IMP deshidrogenasa es un gen codificante de una proteína de las (A) o (B) siguientes:

5 (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14,

10 (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 14 que incluye sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones o inversiones de 1 a 10 residuos aminoácidos y que presenta actividad de IMP deshidrogenasa.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la bacteria es *Bacillus subtilis*.

7. Procedimiento para producir un nucleótido de purina, que comprende:

15 producir un nucleósido de purina mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,

20 hacer reaccionar el nucleósido de purina con un donante de fosfatos seleccionado de entre el grupo que consiste en ácido polifosfórico, fosfato de fenilo y fosfato de carbamilo, y un microorganismo que presenta una capacidad de producir un éster de ácido nucleósido-5'-fosfórico o fosfatasa ácida con el fin de producir un nucleótido de purina, y

recoger el nucleótido de purina.