

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 946**

51 Int. Cl.:

C12N 15/77 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2004** **E 07123785 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013** **EP 1908842**

54 Título: **Unidades de expresión de PEF-TU**

30 Prioridad:

18.12.2003 DE 10359594

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2014

73 Titular/es:

BASF SE (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:

KRÖGER, BURKHARD;
ZELDER, OSKAR;
KLOPPROGGE, CORINNA;
SCHRÖDER, HARTWIG y
HAEFNER, STEFAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 439 946 T3

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

DESCRIPCIÓN

Unidades de expresión de PEF-TU

La presente invención se refiere a un método para incrementar la tasa de transcripción y/o tasa de expresión de genes así como a microorganismos genéticamente modificados del género *Corynebacterium* con tasa de transcripción y/o tasa de expresión elevadas así como a un método para producir productos biosintéticos mediante el cultivo de microorganismos genéticamente modificados del género *Corynebacterium*, tal como se define en las reivindicaciones.

Los diversos productos biosintéticos como, por ejemplo, productos químicos finos, tales como, entre otros, aminoácidos, vitaminas pero también proteínas, se producen en las células mediante procesos metabólicos naturales y se usan muchos ramos de la industria, incluida la industria alimenticia, de comida para animales, de cosméticos, y la industria farmacéutica estas sustancias que se denominan conjuntamente productos químicos finos/proteínas comprenden, entre otros, ácidos orgánicos, aminoácidos, tanto proteinogénicos como también no proteinogénicos, nucleótidos y nucleósidos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores así como proteínas y enzimas. Su producción se efectúa de la manera más conveniente a gran escala por medio de cultivo de bacterias que han sido desarrolladas con el fin de producir y excretar grandes cantidades de la sustancia respectivamente deseada. Para este propósito, los organismos particularmente adecuados son bacterias corineiformes, bacterias no patogénicas gram-positivas.

Es conocido que los aminoácidos se producen mediante fermentación de cepas de bacterias corineiformes, principalmente *Corynebacterium glutamicum*. Debido a su gran importancia permanentemente se trabaja en el mejoramiento de los métodos de producción. Los mejoramientos del proceso pueden referirse a medidas industriales de fermentación como, por ejemplo, agitación y suministro de oxígeno, o la composición de los nutrientes como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación, o el procesamiento hasta un producto, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico pero también mediante secamiento por aspersión, o las propiedades de desempeño intrínsecas del microorganismo mismo.

Desde hace algunos años se usan igualmente métodos de la técnica de ADN recombinante para mejorar las cepas de *Corynebacterium* que producen químicos finos/proteínas, amplificando genes individuales e investigando el efecto sobre la producción de productos químicos finos/proteínas.

Otras formas para desarrollar un procedimiento para la preparación de productos químicos finos, aminoácidos o proteínas, o para aumentar y/o mejorar la productividad de un procedimiento ya existente para la preparación de productos químicos puros, aminoácidos o proteínas, son aumentar y/o modificar la expresión de uno o más genes, y/o influir sobre la traducción de un ARNm mediante secuencias de polinucleótidos adecuadas. La influencia puede comprender en este contexto el aumento, la disminución, o también otros parámetros de la expresión de genes, como modelos de expresión temporales

El experto conoce diferentes componentes de las secuencias de regulación bacterianas. Se diferencian los sitios de unión de los reguladores, también denominados operadores, los sitios de unión de las holoenzimas ARN-polimerasas, también denominadas regiones -35 y -10, y el sitio de unión del 16S-ARN ribosómico, también denominado sitio de unión ribosómico o también secuencia de Shine-Dalgarno.

Como secuencia de un sitio de unión ribosómico, también denominado secuencia de Shine-Dalgarno, en el sentido de esta invención, se entienden secuencias de polinucleótidos que se encuentran hasta 20 bases corriente arriba del codón de iniciación de la traducción.

En la bibliografía (*E. coli* y *S. typhimurium*, Neidhardt F.C., 1995, ASM Press) se describe que tanto la composición de la secuencia de polinucleótidos de la secuencia de Shine-Dalgarno, el orden de la secuencia de las bases, pero también la distancia de una secuencia de polinucleótidos contenida en la secuencia de Shine-Dalgarno tiene una influencia sustancial sobre el grado de iniciación de la traducción

Las secuencias de ácidos nucleicos con actividad promotora pueden influir sobre la formación del ARNm de diferente manera. Los promotores, cuya actividad es independiente de la fase de crecimiento fisiológica del organismo, son denominados constitutivos. Por otro lado, otros promotores reaccionan tanto frente a estímulos químicos externos, como físicos, como oxígeno, metabolitos, calor, pH, etc. Otros muestran en diferentes fases de crecimiento una fuerte dependencia de su actividad. Por ejemplo, en la bibliografía se describen promotores que muestran durante la fase de crecimiento exponencial de microorganismos una actividad especialmente marcada, o también exactamente en la fase estacionaria del crecimiento microbiano. Ambas características de los promotores pueden tener una influencia favorable sobre la productividad para una producción de productos químicos finos y proteínas según la vía de metabolismo.

Por ejemplo, los promotores que durante el crecimiento desconectan la expresión de un gen, pero que después de un crecimiento óptimo la conectan, pueden usarse para regular un gen que controla la producción de un metabolito. La cepa modificada presenta entonces los mismos parámetros de crecimiento que la cepa de partida, pero produce más producto por célula. Este tipo de modificación puede aumentar tanto el título (g de producto/litro) como también el rendimiento de C (g de producto/g de fuente C).

En la especie de *Corynebacterium* pudieron aislarse ya tales secuencias de nucleótidos, las que pueden ser utilizadas para aumentar y/o debilitar la expresión génica. Estos promotores regulados pueden aumentar o disminuir el grado con el cual se transcribe un gen, dependiendo de las condiciones internas y/o externas de la célula. La presencia de un factor determinado, conocido como inductor, puede estimular en parte el grado de la transcripción del promotor. Los inductores pueden influir directa o indirectamente sobre la transcripción del promotor. Otra clase de factores, conocidos como supresores, puede reducir o inhibir la transcripción del promotor. Como los inductores, los supresores también pueden actuar en forma directa o indirecta. Se conocen sin embargo también promotores que pueden ser regulados a través de la temperatura. Así el nivel de la transcripción de tales promotores puede ser aumentado o disminuido, por ejemplo, mediante un aumento de la temperatura de crecimiento por encima de la temperatura de crecimiento normal de la célula.

Hasta ahora se ha descrito una cantidad reducida de promotores de *C. glutamicum*. El promotor del gen de Malatosintasa de *C. glutamicum* se describió en la DE 4440118. Este promotor se colocó delante de un gen estructural que codifica para una proteína. Después de la transformación de un constructo como éste en una bacteria corineiforme se regula la expresión del gen estructural colocado detrás del promotor. La expresión del gen estructural se induce tan pronto como se agrega al medio un inductor correspondiente.

Reinscheid et al., Microbiology 145:503 (1999) describieron una fusión transcripcional entre el promotor pta-ack de *C. glutamicum* y un gen indicador (cloranfenicol acetiltransferasa). Las células de *C. glutamicum*, que contienen una fusión transcripcional como ésta, presentaban una expresión aumentada del gen indicador al crecer en un medio que contenía acetato. En comparación, las células transformadas, que crecían sobre glucosa, no mostraron una expresión aumentada de este gen indicador.

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

Otras secuencias de ADNA de *C. glutamicum*, que pueden usarse para la regulación de la expresión génica, se describieron en la patente WO 02/40679. Estos polinucleótidos aislados representan unidades de expresión de *Corynebacterium glutamicum*, las que pueden ser usadas para el aumento o para la disminución de una expresión génica. Además, se describen en esta patente plásmidos recombinantes, sobre los cuales se asocian las unidades de expresión de *Corynebacterium glutamicum* con genes heterólogos. El método aquí descrito, la fusión de un promotor de *Corynebacterium glutamicum* con un gen heterólogo, puede ser usado, entre otros, para la regulación del gen de la biosíntesis de aminoácidos.

La invención tenía como objeto proporcionar otros promotores y/o unidades de expresión con propiedades ventajosas.

Por consiguiente se halló que pueden usarse para la transcripción de genes, ácidos nucleicos con actividad promotora, que contienen:

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

B) una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de nucleótidos, la que presenta una identidad de por lo menos 90% a nivel de ácidos nucleicos con la secuencia SEQ. ID. NO. 1.

Por "transcripción" se entiende de acuerdo con la invención el procedimiento por medio del cual partiendo de una matriz de ADN se prepara una molécula de ARN complementaria. En este procedimiento participan proteínas como la ARN-polimerasa, los así llamados factores sigma y proteínas reguladoras transcripcionales. El ARN sintetizado sirve entonces como matriz en el procedimiento de la traducción, el cual conduce luego a la proteína biosintéticamente activa.

El grado de formación, con el cual se prepara una proteína biosintéticamente activa, es un producto del grado de transcripción y de traducción. Ambos grados pueden ser influenciados de acuerdo con la invención y de este modo se puede influir sobre el grado de la formación de productos en un microorganismo.

Por un "promotor" o un "ácido nucleico con actividad promotora" se entiende de acuerdo con la invención un ácido nucleico, el cual, en unión funcional con un ácido nucleico a transcribir regula la transcripción de este ácido nucleico.

- Por una "unión funcional" se entiende en este contexto, por ejemplo, el ordenamiento secuencial de uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención con actividad promotora y de una secuencia de ácidos nucleicos a transcribir y eventualmente otros elementos reguladores, como por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que garantizan la transcripción de ácidos nucleicos, así como también, por ejemplo, un terminador de tal modo que cada uno de los elementos reguladores puede cumplir su función en la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos. Para ello no es absolutamente necesaria una unión directa en el sentido químico. Las secuencias de control genéticas, como por ejemplo, las secuencias de intensificadores, pueden cumplir su función sobre la secuencia objetivo también desde posiciones más alejadas o inclusive desde otras moléculas de ADN. Se prefieren los ordenamientos en los cuales se posiciona la secuencia de ácidos nucleicos a transcribir detrás (es decir en el extremo 3') de la secuencia promotora de acuerdo con la invención, de tal modo que ambas secuencias están ligadas entre sí de manera covalente. Preferentemente, la distancia entre la secuencia promotora y la secuencia de ácidos nucleicos a expresar en forma transgénica es menor a 200 pares de bases, particularmente preferible menor a 100 pares de bases, muy particularmente preferible menor a 50 pares de bases.
- Por "actividad promotora" se entiende de acuerdo con la invención la cantidad de ARN formada por el promotor en un tiempo determinado, es decir, el grado de transcripción.
- Por "actividad promotora específica" se entiende de acuerdo con la invención la cantidad de ARN formada por el promotor en un tiempo determinado por promotor.
- Por el término "tipo silvestre" se entiende, de acuerdo con la invención, el correspondiente microorganismo de partida.
- Según el contexto, por el término "microorganismo" puede entenderse el microorganismo de partida (tipo silvestre) o un microorganismo modificado genéticamente, de acuerdo con la invención, o ambos.
- Preferentemente y especialmente en casos en los cuales el microorganismo o el tipo silvestre no pueden ser asignados de modo unívoco, se entiende por "tipo silvestre" en cada caso un organismo de referencia para la modificación o inducción de la actividad promotora o del grado de transcripción, para la modificación o inducción de la actividad de expresión o el grado de expresión y para el aumento del contenido de productos biosintéticos.
- En una forma de realización preferida, este organismo de referencia es *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.
- En una forma de realización preferida, se utilizan microorganismos de partida que ya están en capacidad de preparar los productos químicos finos deseados. Para ello se prefieren especialmente, entre los microorganismos especialmente preferidos de las bacterias del género *Corynebacterium* y los productos químicos puros especialmente preferidos L-lisina, L-metionina y L-treonina, aquellos microorganismos de partida que pueden preparar L-lisina, L-metionina y/o L-treonina. Estos son corinebacterias especialmente preferidas, en las cuales el gen que codifica para una aspartatoquinasa (gen ask) está desregulado, o la inhibición de la retroalimentación ("feed-back") está suspendida o reducida. Por ejemplo, tales bacterias presentan en el gen ask una mutación que lleva a una reducción o suspensión de la inhibición de la retroalimentación, como, por ejemplo, la mutación T311I.
- En una "actividad promotora inducida" o grado de transcripción con relación a un gen en comparación con el tipo silvestre, se induce por lo tanto en comparación con el tipo silvestre la formación de un ARN, que no está presente de este modo en el tipo silvestre.
- En una actividad promotora modificada o un grado de transcripción con relación a un gen en comparación con el tipo silvestre, la cantidad de ARN formada se modifica así en comparación con el tipo silvestre en un tiempo determinado.
- Por "modificada" se entiende en este contexto preferentemente aumentada o reducida.
- La actividad promotora o grado de transcripción puede lograrse, por ejemplo, regulando la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad promotora, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad promotora.
- Preferentemente, la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo se logra mediante ácidos nucleicos con actividad promotora o mediante ácidos nucleicos con actividad promotora específica aumentada:
- introduciendo uno o más ácidos nucleicos con actividad promotora, eventualmente con actividad promotora específica modificada, en el genoma del microorganismo, de modo que se efectúa la transcripción de uno o más genes endógenos bajo el control del ácido nucleico introducido con actividad promotora, eventualmente con actividad promotora específica modificada, o

introduciendo uno o más genes en el genoma del microorganismo, de modo que se realiza la transcripción de uno o más de los genes introducidos bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad promotora, eventualmente con actividad promotora específica modificada, o

- 5 introduciendo en el microorganismo uno o más constructos de ácidos nucleicos, que contienen un ácido nucleico con actividad promotora, eventualmente con actividad promotora específica modificada, y se unen funcionalmente uno o más ácidos nucleicos a transcribir.

Los ácidos nucleicos con actividad promotora contienen:

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

- 10 B) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de por lo menos 90% a nivel de ácidos nucleicos con la secuencia SEQ. ID. NO. 1.

La secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 1 representa la secuencia del promotor del factor de alargamiento de traducción de la proteína-TU (P EF-TU) de *Corynebacterium glutamicum*. La SEQ. ID. NO. 1 corresponde a la secuencia de promotores del tipo silvestre.

- 15 Otros ácidos nucleicos con actividad promotora contienen una secuencia derivada de esta secuencia por sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de por lo menos 90% a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO: 1.

Otros ejemplos naturales de ácidos nucleicos con actividad promotora pueden encontrarse fácilmente, por ejemplo, de diversos organismos, cuya secuencia genómica es conocida, por comparaciones de identidad de las secuencias de ácidos nucleicos de bancos de datos con las secuencias SEQ. ID NO: 1 descritas previamente.

- 20 Secuencias de promotores artificiales con actividad promotora pueden determinarse fácilmente partiendo de la secuencia SEQ. ID. NO: 1 por variación y mutación artificial, por ejemplo, por sustitución, inserción o delección de nucleótidos.

- 25 Por el término "sustitución" se entiende en la descripción el intercambio de uno o más nucleótidos por uno o varios nucleótidos. "Delección" es el reemplazo de un nucleótido por un enlace directo. Inserciones son introducciones de nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico, en cuyo caso se reemplaza formalmente un enlace directo por uno o más nucleótidos.

- 30 Por identidad entre dos ácidos nucleicos se entiende la identidad de los nucleótidos a través de toda la longitud de ácidos nucleicos, especialmente la identidad que se calcula por comparación con ayuda del software Vector NTI Suite 7.1 de la empresa Informax (EE.UU.) utilizando el método Clustal (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr; 5 (2) : 151- 1) ajustando los siguientes parámetros:

Parámetros de alineamientos múltiples:

Penalización por abertura de un gap 10

Penalización por extensión de un gap 10

- 35 Rango de penalización por separación de un gap 8

Penalización por separación de un gap off

% de identidad por retardo de alineamiento 40

Gaps específicos de los residuos off

Gap de residuo hidrófilo off

- 40 Pesaje de transición 0

Parámetros de alineamiento de a pares:

Algoritmo FAST on

Tamaño K-tuple 1

Penalización de un gap 3

Tamaño de ventana 5

5 Número de mejores diagonales 5

Por una secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de por lo menos 90% con la secuencia SEQ. ID. NO: 1, se entiende correspondientemente una secuencia de ácidos nucleicos, que al comparar su secuencia con la secuencia SEQ. ID. NO: 1, especialmente según el logaritmo del programa arriba mencionado con el conjunto de parámetros arriba mencionados, presenta una identidad de por lo menos 90%.

10 Promotores especialmente preferidos presentan con la secuencia de ácidos nucleicos SEQ. ID. NO: 1 una identidad de 91%, más preferentemente 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente aún 99%.

La SEQ. ID. NO. 1 ha sido descrita en la inscripción al Genbank AP005283.

Ácidos nucleicos con actividad promotora contienen

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

15 B) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de al menos 90% con la secuencia SEQ. ID. NO. 1 a nivel de ácido nucleico con la condición de que se excluye el ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO. 1.

20 Todos los ácidos nucleicos con actividad promotora arriba mencionados pueden prepararse además de manera conocida por síntesis química a partir de los componentes nucleótidos como, por ejemplo, por condensación de fragmentos de componentes de ácidos nucleicos individuales superpuestos, complementarios de la doble hélice. La síntesis química de oligonucleótidos puede realizarse, por ejemplo, de manera conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2da. edición, Wiley Press, Nueva York, págs. 896-897). La deposición de oligonucleótidos sintéticos y el llenado de espacios con ayuda del fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligadura así como también procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook y col. (1989), "Molecular cloning: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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

30 Por una "unión funcional" se entiende en este contexto, por ejemplo, el ordenamiento secuencial de una unidad de expresión y de una secuencia de ácidos nucleicos a expresar transgénicamente y eventualmente de otros elementos reguladores, como por ejemplo, un terminador de tal modo que cada uno de los elementos reguladores puede cumplir su función en la expresión transgénica de la secuencia de ácido nucleico. Para ello no es absolutamente necesaria una unión directa en el sentido químico. Las secuencias de control genéticas, como por ejemplo, las secuencias intensificadoras pueden ejercer su función también desde otras posiciones más lejanas o inclusive desde otras moléculas de ADN, sobre la secuencia diana. Se prefieren los ordenamientos en los cuales se posiciona la secuencia de ácidos nucleicos a expresar transgénicamente detrás (es decir en el extremo 3') de la secuencia de la unidad de expresión, de tal modo que ambas secuencias están ligadas entre sí de manera covalente. Preferentemente, la distancia entre la secuencia de unidades de expresión y la secuencia de ácidos nucleicos a expresar en forma transgénica es menor a 200 pares de bases, más preferentemente, menor a 100 pares de bases, más preferentemente aún menor a 50 pares de bases.

35 Por "actividad de expresión" se entiende la cantidad de proteína formada por la unidad de expresión en un tiempo determinado, es decir el grado de expresión.

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

40 En una "actividad de expresión inducida" o grado de expresión con respecto a un gen, en comparación con el tipo silvestre, se induce de esta manera la formación de una proteína en comparación el tipo silvestre la cual no estaba presente en el tipo silvestre.

En una "actividad de expresión modificada" o grado de expresión con respecto a un gen, en comparación con el tipo silvestre, la cantidad formada de la proteína se modifica de este modo, en comparación con el tipo silvestre, en un tiempo determinado.

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

- 5 Esto puede realizarse, por ejemplo, aumentando o reduciendo la actividad específica de unidad de expresión endógena, por ejemplo, por mutación de la unidad de expresión o por estimulación o inhibición de la unidad de expresión.

Además, la actividad de expresión o grado de expresión aumentado puede lograrse, por ejemplo por regulación de la expresión de genes en el microorganismo por las unidades de expresión o por unidades de expresión con actividad de expresión específica aumentada, en cuyo caso los genes son heterólogos con respecto a las unidades de expresión.

Preferentemente la regulación de la expresión de genes en el microorganismo se logra mediante unidades de expresión, introduciendo unidades de expresión en el genoma del microorganismo de tal modo que la expresión de uno o de varios genes endógenos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión introducidas o introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de modo que la expresión de uno o de varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión endógenas o introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácido nucleico que contienen una unidad de expresión según la invención, opcionalmente con actividad de expresión específica modificada, y se unen funcionalmente uno o más ácidos a expresar.

20 Las unidades de expresión contienen un ácido nucleico con actividad promotora descrito previamente, y unida funcionalmente además una secuencia de ácidos nucleicos que garantiza la traducción de ácidos ribonucleicos.

Esta secuencia de ácidos nucleicos que garantiza la traducción de ácidos ribonucleicos contiene preferentemente la secuencia de ácidos nucleicos SEQ. ID. NO: 42 como sitio de unión ribosómico.

La unidad de expresión contiene:

25 E) la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 o

F) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de por lo menos 90% a nivel de ácidos nucleicos con la secuencia SEQ. ID. NO. 2.

La secuencia de ácidos nucleicos SEQ. ID. NO. 2 representa la secuencia de ácidos nucleicos de la unidad de expresión del factor de alargamiento de traducción de proteína TU (p EF-TU) de *Corynebacterium glutamicum*. La SEQ. ID. NO: 2 corresponde a la secuencia de la unidad de expresión del tipo silvestre.

30 Las unidades de expresión pueden contener una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, la cual presenta una identidad de por lo menos 90% a nivel de ácidos nucleicos con la secuencia SEQ. ID. NO: 2.

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

Secuencias artificiales de las unidades de expresión descritas previamente pueden hallarse fácilmente partiendo de la SEQ. ID. NO: 2 por variación y mutación artificiales, por ejemplo por sustitución, inserción o delección de nucleótidos.

40 Por una secuencia de ácidos nucleicos, que presenta una identidad de por lo menos 90% con la secuencia SEQ. ID. NO: 2, se entiende correspondientemente una secuencia de ácidos nucleicos que, al comparar su secuencia con la secuencia SEQ. ID. NO: 2, especialmente según el logaritmo del programa arriba mencionado, con el conjunto de parámetros de arriba, presenta una identidad de por lo menos 90%.

45 Unidades de expresión especialmente preferidas presentan una identidad de 91%, más preferentemente 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, más preferentemente aún 99%, con la secuencia de ácidos nucleicos SEQ. ID. NO. 2.

También están comprendidas las secuencias de ácidos nucleicos que comprenden las así llamadas mutaciones mudas o que están modificadas de acuerdo con el aprovechamiento del codón de un organismo de origen u

hospedero especial, en comparación con una secuencia denominada concretamente, así como también variantes de los mismos que existen naturalmente como, por ejemplo, variantes de corte y empalme o variantes de alelos.

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

- 5 La SEQ. ID. NO. 2 ha sido descrita en la entrada de Genbank AP005283 sin asignación de función.

Una unidad de expresión contiene un ácido nucleico mencionado previamente con actividad promotora, adicionalmente unido de modo funcional con una secuencia de ácidos nucleicos que garantiza la traducción de ácidos ribonucleicos.

Una unidad de expresión contiene preferiblemente

- 10 E) la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 o

F) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, la cual presenta una identidad de por lo menos 90% a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO: 2, con la condición de que se excluye el ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO. 2.

- 15 Las unidades de expresión previamente mencionadas comprenden uno o varios de los siguientes elementos genéticos:

una secuencia menos 10 ("10"), una secuencia menos 35 ("35"); una iniciación de transcripción, una región intensificadora; y una región operadora. Preferentemente estos elementos genéticos son específicos para la especie de Corinebacterias, especialmente para *Corynebacterium glutamicum*.

- 20 Todas las unidades de expresión mencionadas más arriba pueden prepararse además de manera conocida por síntesis química a partir de los componentes nucleótidos como, por ejemplo, por condensación de fragmentos de componentes de ácidos nucleicos individuales superpuestos, complementarios de la doble hélice. La síntesis química de oligonucleótidos puede realizarse, por ejemplo, de manera conocida, según el método de fosfoamidita (Voet, Voet, 2da. edición, Wiley Press, Nueva York, págs. 896-897). La deposición de oligonucleótidos sintéticos y el llenado de espacios con ayuda del fragmento de Klenow de la ADN-polimerasa y las reacciones de ligadura así
25 como también procedimientos generales de clonación se describen en Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Para las invenciones en esta patente se usaron métodos y técnicas que son conocidas por el experto en las técnicas de ADN recombinante y microbiológicas. Los métodos y las técnicas para el crecimiento de células bacterianas, la introducción de moléculas de ADN aisladas en la célula hospedera, y el aislamiento, la clonación y la secuenciación
30 de moléculas de ácidos nucleicos aisladas, etc., son ejemplos de tales técnicas y métodos. Estos métodos se describen en muchos sitios de la bibliografía estándar: Davis et al., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986); J. H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1972); J.H. Miller, *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1992); M. Singer and P. Berg, *Genes & Genomes*, University Science Books, Mill Valley, California (1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); P.B. Kaufmann et al., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); y P.F. Smith-Keary, *Molecular Genetics of Escherichia coli*, The Guilford Press, Nueva York, NY (1989).
35

- 40 Todas las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención se encuentran preferentemente en forma de una molécula de ácido nucleico aislada. Una molécula de ácido nucleico "aislada" se separa de otras moléculas de ácido nucleico, las que están presentes en la fuente natural del ácido nucleico y que puede además estar sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo, cuando es preparada por medio de técnicas recombinantes, o puede estar libre de precursores químicos u otros productos químicos, cuando es sintetizada químicamente.

- 45 Además de las secuencias de nucleótido descritas concretamente, están comprendidas moléculas de ácido nucleico complementarias o una sección de las mismas.

Los promotores y/o unidades de expresión previamente mencionados pueden usarse, por ejemplo, más ventajosamente en procedimientos mejorados para la preparación fermentativa de productos biosintéticos como se describen más adelante.

Los promotores y/o unidades de expresión presentan especialmente la ventaja de que son promotores y unidades de expresión constitutivos, fuertes.

Los ácidos nucleicos con actividad promotora previamente mencionados pueden ser usados para aumentar el grado de transcripción de genes en microorganismos del género *Corynebacterium* en comparación con el tipo silvestre.

- 5 Las unidades de expresión previamente mencionadas pueden ser usadas para el aumento del grado de expresión de genes en microorganismos del género *Corynebacterium* en comparación con el tipo silvestre.

- 10 Los ácidos nucleicos con actividad promotora mencionados previamente y las unidades de expresión mencionadas previamente pueden servir además para la regulación y el refuerzo de la formación de diversos productos biosintéticos, como por ejemplo, productos químicos finos, proteínas, principalmente aminoácidos, en microorganismos del género *Corynebacterium*.

Por lo tanto, la invención se refiere a procedimiento para aumentar grado de transcripción de genes en microorganismos del género *Corynebacterium* en comparación con el tipo silvestre.

Regulando la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad promotora que contienen

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

B) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, la cual presenta una identidad de al menos 90% con la secuencia SEQ. ID. NO. 1 a nivel de ácido nucleico, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad promotora.

- 20 La secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 42 representa preferentemente el sitio de enlace ribosómico de las unidades de expresión previamente mencionadas, las secuencias SEQ. ID. NOs. 39, 40 o 41, la región -10 de las unidades de expresión previamente mencionadas. Modificaciones de la secuencia de ácidos nucleicos en estas regiones conducen a una modificación de la actividad de expresión específica.

La secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 42 puede usarse como sitio de unión ribosómico en unidades de expresión que posibilitan la expresión de genes en bacterias del género *Corynebacterium* o *Brevibacterium*.

- 25 Las secuencias de ácido nucleico SEQ. ID. NOs. 39, 40 o 41 pueden usarse como región -10 en unidades de expresión que posibilitan la expresión de genes en bacterias del género *Corynebacterium* o *Brevibacterium*.

Puede usarse una unidad de expresión que posibilita la expresión de genes en bacterias del género *Corynebacterium* o *Brevibacterium*, que contienen la secuencia de ácidos nucleicos SEQ. ID. NO: 42. Preferentemente se usa para ello la secuencia de ácidos nucleicos SEQ. ID. NO: 42 como sitio de unión ribosómico.

- 30 Puede usarse una unidad de expresión que posibilita la expresión de genes en bacterias del género *Corynebacterium* o *Brevibacterium*, que contienen por lo menos una de las secuencias de ácidos nucleicos SEQ. ID. NOs: 39, 40 o 41. Preferentemente se usa para ello una de las secuencias de ácidos nucleicos SEQ. ID. NOs: 39, 40 o 41 como región -10.

- 35 Según la invención, el aumento del grado de transcripción de genes en microorganismos del género *Corynebacterium*, en comparación con el tipo silvestre, se efectúa regulando la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad promotora, que contienen

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

- 40 B) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de al menos 90% con la secuencia SEQ. ID. NO. 1 a nivel de ácido nucleico, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad promotora.

Esto se logra preferiblemente

b1) introduciendo uno o varios ácidos nucleicos previamente mencionados con actividad promotora al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o más genes endógenos se efectúa bajo el control del ácido nucleico con actividad promotora introducido,

- 45 o

b2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de modo que la transcripción de uno o varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos, con actividad promotora, previamente mencionados, o

5 b3) introduciendo al microorganismo uno o más constructos de ácidos nucleicos, que contienen un ácido nucleico con actividad promotora y se unen funcionalmente uno o más ácidos nucleicos a transcribir.

Por lo tanto es posible aumentar el grado de transcripción de un gen endógeno del tipo silvestre:

según la modalidad b1) introduciendo uno o varios de los ácidos nucleicos mencionados previamente, con actividad promotora al genoma del microorganismo de modo que la transcripción de uno o de varios genes endógenos se efectúe bajo el control del ácido nucleico con actividad promotora introducido, o

10 según la modalidad b2) introduciendo uno o varios de los genes endógenos al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o varios de los genes endógenos introducidos se efectúe bajo el control de los ácidos nucleicos con actividad promotora endógenos previamente mencionados, o

15 Según la modalidad b3) introduciendo uno o varios uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico con actividad promotora, previamente mencionado, y se une funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos endógenos a transcribir.

De esta manera también es posible aumentar el grado de transcripción de un gen exógeno en comparación con el tipo silvestre

20 según la modalidad b2), introduciendo uno o varios genes exógenos al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o de varios de los genes exógenos introducidos se efectúe bajo el control de los ácidos nucleicos con actividad promotora, endógenos, previamente mencionados previamente mencionados, o

Según la modalidad b3), introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico con actividad promotora, previamente mencionado y se une funcionalmente a uno o varios ácidos nucleicos exógenos que van a transcribirse.

25 La inserción de genes según la modalidad b2) puede realizarse de tal modo que el gen es integrado en las zonas codificadoras o en las zonas no codificadoras. Preferentemente la inserción se realiza en zonas no codificadoras.

30 La inserción de constructos de ácidos nucleicos según la modalidad b3) puede efectuarse en forma cromosómica o extracromosómica. La inserción de los constructos de ácidos nucleicos se realiza preferentemente en forma cromosómica. Una integración "cromosómica" es la inserción de un fragmento de ADN exógeno en el cromosoma de una célula hospedera. Este concepto se usa también para la recombinación homóloga entre un fragmento de ADN exógeno y la región correspondiente sobre el cromosoma de la célula hospedera.

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

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

35 Por el término "genes" con respecto a la regulación de la transcripción por los ácidos nucleicos con actividad promotora previamente mencionados, se entienden preferentemente ácidos nucleicos que contienen una zona a transcribir, es decir, por ejemplo, una zona que regula la traducción, una zona codificadora, así como también eventualmente otros elementos de regulación como, por ejemplo, un terminador.

40 Por el término "genes" con respecto a la regulación de la expresión descrita a continuación por parte de las unidades de expresión de acuerdo con la invención se entienden preferentemente ácidos nucleicos que contienen una zona codificadora, así como también eventualmente otros elementos de regulación, como por ejemplo, un terminador.

Por una "zona codificadora" se entiende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína.

45 Por "heterólogo" con respecto a ácidos nucleicos con actividad promotora y genes se entiende que los genes utilizados no están transcritos en el tipo silvestre bajo la regulación de los ácidos nucleicos con actividad promotora previamente mencionados, sino que se forma una nueva unión funcional que no existe en el tipo silvestre y no existe la combinación funcional de ácido nucleico con actividad promotora previamente mencionado ni el gen específico en el tipo silvestre.

Por "heterólogo" con respecto a unidades de expresión y genes se entiende que los genes utilizados no están transcritos en el tipo silvestre bajo regulación de las unidades de expresión de acuerdo con la invención, sino que se forma una nueva unión funcional que no existe en el tipo silvestre y no existe en el tipo silvestre la combinación funcional de unidad de expresión previamente mencionada y gen específico.

- 5 Además se describe un proceso para aumentar el grado de expresión de un gen en microorganismos del género *Corynebacterium* en comparación con el tipo silvestre

regulando la expresión de genes en el microorganismo mediante unidades de expresión que contienen

E) la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 o

- 10 F) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de al menos 90% a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO. 2, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión.

15 El aumento del grado de expresión de genes en microorganismos del género *Corynebacterium* en comparación con el tipo silvestre puede efectuarse regulando la expresión de genes en el microorganismo mediante las unidades de expresión mencionadas previamente, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión.

Esto se logra preferiblemente

d1) introduciendo una o varias de las unidades de expresión previamente mencionadas al genoma del microorganismo, de modo que la expresión de uno o de varios genes endógenos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión introducidas, o

- 20 d2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo de modo que la expresión de uno o de varios de los genes introducidos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión endógenas previamente mencionadas o

d3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen una unidad de expresión previamente mencionado y une funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos que van expresarse.

- 25 De esta manera es posible aumentar el grado de expresión de un gen endógeno del tipo silvestre

según la modalidad d1), introduciendo al genoma del microorganismo una o varias unidades de expresión previamente mencionadas, de modo que la expresión de uno o de varios genes endógenos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión introducidas, o

- 30 según la modalidad d2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo, de modo que la expresión de uno o de varios de los genes introducidos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión endógenas previamente mencionadas, o

según la modalidad d3) introduciendo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen una unidad de expresión previamente mencionada y enlaza funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos que van a expresarse.

- 35 De esta manera, también es posible aumentar el grado de expresión de un gen endógeno en comparación con el tipo silvestre

según la modalidad d2), introduciendo uno o varios genes exógenos al genoma del microorganismo, de modo que la expresión de uno o de varios de los genes introducidos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión endógenas previamente mencionadas, o

- 40 según la modalidad d3), introduciendo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen una unidad de expresión y une funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos exógenos que van expresarse.

La inserción de genes según la modalidad d2) puede efectuarse de tal manera que en se integre a regiones codificante es o a regiones no codificantes. Preferentemente, la inserción se efectúa a regiones no codificantes.

- 45 La inserción de constructos de ácido nucleico según la modalidad d3) puede efectuarse en tal caso de manera cromosómica o extra cromosómica. La inserción de los constructos de ácido nucleico se efectúa preferentemente de manera cromosómica.

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

En una modalidad preferida del proceso previamente descrito para aumentar el grado de transcripción/o grado de expresión de genes en microorganismos del género *Corynebacterium*, los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de productos químicos finos, en cuyo caso los genes pueden contener opcionalmente otros elementos de regulación.

En una modalidad particularmente preferida del proceso descrito previamente para aumentar el grado de transcripción y/o el grado de expresión de genes en microorganismos del género *Corynebacterium*, los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dioles, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas, en cuyo caso los genes pueden contener opcionalmente otros elementos de regulación.

En una modalidad particularmente preferida, las proteínas de la vía de biosíntesis de aminoácidos se seleccionan del grupo de aspartato cinasas, aspartato- semialdehído-deshidrogenasa, diaminopimelato- deshidrogenasa, diaminopimelato- descarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato-reductasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, 3-fosfoglicerato-cinasa, piruvato-carboxilasa, triosefosfato-Isomerasa, regulador transcripcional LuxR, regulador transcripcional LysR1, regulador transcripcional LysR2, malato- quinona-oxidoreductasa, glucosa- 6- fosfato- deshidrogenasa, 6-fosfogluconato- deshidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahionina- gamma-sintasa, cistahionin-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina- sulfidrilasa, metilen-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-cinasa, treonina-sintasa, treonina- Exportador-portador, treonina- deshidratasa, piruvato- oxidasa, lisina-exportador, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, actividad de metionina-sintasa dependiente de coenzima B12, actividad de metionina-sintasa independiente de coenzima B12, sulfato-adeniltransferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina- sulfito-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3- fosfoglicerato deshidrogenasa, regulador RXA00655, regulador RXN2910, arginil-t-ARN-sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína de treonina-eflujo, serinahidroximetiltransferasa, fructosa - 1, 6- bisfosfatasa, proteína de la reducción de sulfato RXA077, proteína de la reducción de sulfato RXA248, proteína de la reducción de sulfato RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructocinasa y 6- fosfofructocinasa.

Proteínas preferidas y ácidos nucleicos que codifican estas proteínas de las proteínas descritas previamente de la vía de biosíntesis de aminoácidos son secuencias de proteína o secuencias de ácidos nucleicos de origen microbiano, preferentemente de bacterias del género *Corynebacterium* o *Brevibacterium*, preferiblemente de bacterias corineiformes, particularmente preferible de *Corynebacterium glutamicum*.

Ejemplos de secuencias particularmente preferidas de proteína y la secuencia de ácido nucleico correspondientes que codifican estas proteínas de la vía de biosíntesis de aminoácidos, su documento de referencia, así como su denominación en el documento de referencia, se encuentran listados en la tabla 1:

Tabla 1

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. En el documento de referencia
Aspartatoquinasa	ask o lysC	EP1108790	ADN: 281 Proteína: 3781
Aspartato-semialdehído-deshidrogenasa	asd	EP1108790	ADN: 331 Proteína: 3831
Dihidrodipicolinato-Sintetasa	dapA	WO 0100843	ADN: 55 Proteína: 56
Dihidrodipicolinato-reductasa	dapB	WO 0100843	ADN: 35 Proteína: 36
Meso-diaminopimelato-D-deshidrogenasa	ddh	EP1108790	ADN : 3494 Proteína : 6944
Diaminopicolinato-descarboxilasa	lysA	EP1108790	ADN: 3451 Prot.:6951
Lisina-Exportador	lysE	EP1108790	ADN: 3455 Parat.: 6955

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. En el documento de referencia
Arginil-t-ARN sintetasa	argS	EP1108790	ADN: 3450 Prot.: 6950
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	zwf	WO 0100844	ADN: 243 Prot.: 244
Glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa	gap	WO 0100844	ADN: 187 Prot.: 188
3-Fosfogliceratquinasa	pgk	WO 0100844	ADN: 69 Prot.: 70
Piruvato-carboxilasa	pycA	EP1108790	ADN: 765 Prot.: 4265
Triosefosfato-isomerasa	tpi	WO 0100844	ADN: 61 Prot.: 62
Biotina-ligasa	birA	EP1108790	ADN: 786 Prot.: 4286
PEP-Carboxilasa	pck	EP1108790	ADN: 3470 Prot.: 6970
Homoserina quinasa	thrB	WO 0100843	ADN: 173 Prot.: 174
Treonina Sintasa	thrC	WO 0100843	ADN: 175 Prot.: 176
Treonina Export Portador	thrE	WO 0251231	ADN: 41 Prot.: 42
Proteína de eflujo de treonina	RXA2390	WO 0100843	ADN: 7 Prot.: 8
Treonina Deshidratasa	ilvA	EP 1108790	ADN: 2328 Prot.: 5828
Homoserina-O-Acetiltransferasa	metA	EP 1108790	ADN:727 Prot.: 4227
Cistationina-gamma-sintasa	metB	EP 1108790	ADN:3491 Prot.: 6991
Cistationina-beta-Liasa	metC	EP 1108790	ADN:2535 Prot.: 6035
Metionin-Sintasa dependiente de coenzima B12	metH	EP 1108790	ADN:1663 Prot.: 5163
O-Acetilhomoserina-sulfhidrilasa	metY	EP 1108790	ADN:726 Prot.: 4226
Metilentetrahidrofolato-reductasa	metF	EP 1108790	ADN:2379 Prot.: 5879
D-3-Fosfoglicerato-Deshidrogenasa	serA	EP 1108790	ADN:1415 Prot.: 4915
Fosfoferina-Fosfatoasa 1	serB	WO 0100843	ADN: 153 Prot.:154
Fosfoferina-Fosfatoasa 2	serB	EP 1108790	ADN: 467 Prot.: 3967
Fosfoferina-Fosfatoasa 3	serB	EP 1108790	ADN: 334 Prot.: 3834
Fosfoferina-aminotransferasa	serC	WO 0100843	ADN: 151 Prot.: 152
Serina Acetil-Transferasa	cysE	WO 0100843	ADN: 243 Prot.: 244
Cisteína-Sintasa I	cisK	EP 1108790	ADN: 2817 Prot.: 6317
Cisteín Sintasa II	CisM	EP 1108790	ADN: 2338 Prot.: 5838
Homoserina-Deshidrogenasa	hom	EP 1108790	ADN: 3452 Prot.: 6952
Metionin-Sintasa independiente de coenzima B12	metE	WO 0100843	ADN:755 Prot.: 756
Serina-Hidroximetiltransferasa	gliA	WO 0100843	ADN: 143 Prot.: 144
Proteína en reducción de sulfato	RXA247	EP 1108790	ADN: 3089 Prot.: 6589
Proteína en reducción de sulfato	RXA248	EP 1108790	ADN: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadeniltransferasa Subunidad 1	CisN	EP 1108790	ADN: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadeniltransferasa Subunidad 2	CisD	EP 1108790	ADN: 3093 Prot.: 6593
Fosfoadenosina fosfosulfato reductasa	CisH	WO 02729029	ADN: 7 Prot.: 8
Ferredoxina-sulfito-reductasa	RXA073	WO 0100842	ADN: 329 Prot.: 330
Ferredoxina- NADP Reductasa	RXA076	WO 0100843	ADN: 79 Prot.: 80
Regulador transcripcional LuxR	luxR	WO 0100842	ADN: 297 Proteína: 298
Regulador transcripcionalLysR1	lysR1	EP 1108790	ADN: 676 Proteína: 4176
Regulador transcripcionalLysR2	lysR2	EP 1108790	ADN: 3228 Proteína: 6728
Regulador transcripcionalLysR3	lysR3	EP 1108790	ADN: 2200 Proteína: 5700
Malato-Quinona-Oxodoreductasa	mgo	WO 0100844	ADN: 569 Proteína: 570
Transcetolasa	RXA2739	EP 1108790	ADN: 1740 Prot.: 5240

Proteína	Ácido nucleico que codifica proteína	Documento de referencia	SEQ. ID. NO. En el documento de referencia
Transaldolasa	RXA2738	WO 0100844	ADN: 245 Prot: 246
OPCA	opcA	WO 0100804	ADN: 79 Prot: 80
1-Fosfofructoquinasa 1	pfk1	WO0100844	ADN: 55 Proteína: 56
1-Fosfofructoquinasa 2	pfk2	WO0100844	ADN: 57 Proteína: 58
6-Fosfofructoquinasa 1	6-pfk1	EP 1108790	ADN: 1383 Proteína: 4883
6-Fosfofructoquinasa 2	6-pfk2	DE 10112992	ADN: 1 Proteína: 2
Fructosa-1,6-bisfosfatoase 1	fbr1	EP1108790	ADN: 1136 Proteína: 4636
Piruvato Oxidasa	poxB	WO 0100844	ADN : 85 Proteína: 86
RXA00655-Regulador	RXA655	US2003162267 .2	ADN: 1 Prot.: 2
RXN02910-Regulador	RXN2910	US2003162267 .2	ADN: 5 Prot.: 6
6-fosfogluconolactonasa	RXA2735	WO 0100844	ADN: 1 Prot.: 2

Otro ejemplo de una secuencia de proteína especialmente preferida y la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente que codifica a esta proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos, es la secuencia de la fructosa-1,6-bisfosfatasa 2, o llamada también fbr2, (SEQ. ID. NO: 38) y la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente que codifica una fructosa-1,6-bisfosfatasa 2 (SEQ. ID. NO: 37).

Otro ejemplo de una secuencia de proteína especialmente preferida y la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente que codifica a esta proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos, es la secuencia de la proteína en sulfato-reducción, o llamada también RXA077, (SEQ. ID. NO: 4) y la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente que codifica a una proteína en sulfato-reducción (SEQ. ID. NO: 3).

Otras secuencias de proteínas especialmente preferidas de la vía de biosíntesis de los aminoácidos presentan la secuencia de aminoácidos indicada para esta proteína en la Tabla 1, en donde la proteína respectiva presenta en cada caso en por lo menos una de las posiciones de aminoácidos indicadas en la Tabla 2/columna 2 para esta secuencia de aminoácidos, otro aminoácido proteinogénico diferente al aminoácido respectivo indicado en la Tabla 2/columna 3 en el mismo renglón. En otra forma de realización preferida, las proteínas presentan en por lo menos una de las posiciones de aminoácidos indicadas para la secuencia de aminoácidos en la Tabla 2/ columna 2, el aminoácido indicado en el mismo renglón en la Tabla 2/columna 4. Las proteínas indicadas en la Tabla 2 son proteínas mutadas de la vía de biosíntesis de los aminoácidos, las que presentan propiedades especialmente ventajosas y que por ese motivo son especialmente adecuadas para la expresión de los ácidos nucleicos correspondientes por el promotor de acuerdo con la invención y para la preparación de aminoácidos. Por ejemplo, la mutación T3111 lleva a una interrupción de la inhibición de la retroalimentación de ask.

Los ácidos nucleicos correspondientes, que codifican una proteína mutada de la Tabla 2 descrita previamente, pueden prepararse mediante procedimientos usuales.

Como punto de partida para la preparación de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína mutada es adecuado, por ejemplo, el genoma de una cepa de *Corynebacterium glutamicum*, el cual puede obtenerse de la "American Type Culture Collection" bajo la denominación ATCC 13032, o las secuencias de ácidos nucleicos indicadas en la Tabla 1. Para la retrotraducción de la secuencia de aminoácidos de las proteínas mutadas en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican a estas proteínas es ventajoso usar el codón usage del organismo al cual tiene que introducirse la secuencia de ácidos nucleicos o en el cual se encuentra la secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, es ventajoso para el *Corynebacterium glutamicum* usar el codón usage de *Corynebacterium glutamicum*. El codón usage de cada organismo puede determinarse de manera conocida del banco de datos o de solicitudes de patentes que describen por lo menos una proteína y un gen que codifica a esta proteína, del organismo deseado.

Los datos en la Tabla 2 deben entenderse de la siguiente manera:

En la columna 1 "identificación" se indica una denominación clara para cada secuencia con respecto a la Tabla 1.

En la columna 2 "AS-POS", el respectivo número se refiere a la posición del aminoácido de la secuencia de polipéptidos correspondiente de la Tabla 1. Un "26" en la columna "ASpas" significa por lo tanto la posición de aminoácido 26 de la secuencia de polipéptidos indicada correspondientemente. El conteo de la posición comienza N-terminal en +1.

En la columna 3, "AS-tipo silvestre", cada letra significa el aminoácido - representado con el código de una letra - en la posición indicada en la columna 2 en la cepa de tipo silvestre correspondiente de la secuencia de la Tabla 1.

En la columna 4, "AS-mutante", cada letra significa los aminoácidos - representados con el código de una letra en la posición indicada en la columna 2 en la cepa mutante correspondiente.

- 5 En la columna 5, "Función", se lista la función fisiológica de la secuencia de polipéptidos correspondiente.

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

Código de una sola letra de los aminoácidos proteinogénicos:

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

Tabla 2

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
Identificación	Posición AS	AS tipo silvestre	AS Mutante	Función
ask	317	S	A	Aspartato-quinasa
	311	T	I	
	279	A	T	
asd	66	D	G	Aspartato-semialdehído-Deshidrogenasa
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihidrodipicolinato sintetasa
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihidrodipicolinato-Reductasa
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-diaminopimelato-D-Deshidrogenasa
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinato-descarboxilasa
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginil-t-ARN-Sintetasa
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucosa-6-Fosfato-Deshidrogenasa
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
pycA	7	S	L	Piruvato-carboxilasa
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	
	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-carboxilasa
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserina quinasa
	190	T	A	
	133	A	V	
thrC	138	P	S	
	69	G	R	Treonina sintasa
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Proteína de eflujo de treonina
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserina-deshidrogenasa
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5
Identificación	Posición AS	AS tipo silvestre	AS Mutante	Función
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	regulador transcripcionalLysR1
lysR3	142	R	W	regulador transcripcionalLysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transcetolasa
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolasa
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartato-1-sescarboxilasa
	33	G	S	6-Fosfogluconolactonasa

- En los procedimientos previamente descritos para aumentar el grado de transcripción y/o el grado de expresión de genes en microorganismos del género *Corynebacterium* así como también los procedimientos descritos a continuación para la preparación de microorganismos modificados genéticamente del género *Corynebacterium*, los microorganismos modificados genéticamente descritos a continuación y los procedimientos descritos a continuación para la preparación de productos biosintéticos, se realiza la introducción de los ácidos nucleicos con actividad promotora previamente mencionados, las unidades de expresión previamente mencionadas, los genes descritos previamente y los constructos de ácidos nucleicos descritos previamente o los casetes de expresión en los microorganismos del género *Corynebacterium* preferentemente mediante el método SacB.
- 5 El método SacB es conocido por el experto y se describió, por ejemplo, en Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*, *Gene*. 1994 Jul 22; 145 (1) : 69- 73 y Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; *Mol Microbiol*. 1991 Jun; 5 (6) : 1447- 57.
- 10 En una forma de realización preferida del procedimiento descrito previamente, el aumento del grado de transcripción y/o el grado de expresión de genes en microorganismos del género *Corynebacterium* se realiza introduciendo en el microorganismo los ácidos nucleicos con actividad promotora previamente mencionados y/o unidades de expresión previamente mencionadas.
- 15 En otra forma de realización preferida de los procedimientos descritos previamente, el aumento del grado de transcripción y/o el grado de expresión de genes se realiza en microorganismos del género *Corynebacterium* introduciendo en el microorganismo los constructos de ácidos nucleicos o los casetes de expresión descritos previamente.
- 20 Un casete de expresión comprende:
- por lo menos una unidad de expresión de previamente mencionada,
- 25 por lo menos otra secuencia de ácidos nucleicos a expresar, es decir, un gen a expresar, y
- eventualmente otros elementos de control genéticos, como por ejemplo, un terminador, en donde por lo menos una unidad de expresión y otra secuencia de ácidos nucleicos a expresar, están unidas funcionalmente entre sí y la otra secuencia de ácidos nucleicos, a expresar, es heteróloga con respecto a la unidad de expresión.
- 30 Preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos a expresar es por lo menos un ácido nucleico que codifica una proteína de la vía de biosíntesis de productos químicos finos.
- Más preferentemente la secuencia de ácidos nucleicos a expresar es seleccionada entre el grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos,

ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dioles, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas.

Proteínas preferidas de la vía de biosíntesis de aminoácidos se describieron más arriba y sus ejemplos se describieron en las Tablas 1 y 2.

En los casetes de expresión la posición física de la unidad de expresión con respecto al gen a expresar es seleccionada de tal modo que la unidad de expresión regula la transcripción y preferentemente también la traducción del gen a expresar y de este modo posibilita la formación de una o más proteínas. "Posibilita la formación" comprende el aumento constitutivo de la formación, el debilitamiento y/o bloqueo de la formación bajo condiciones específicas y/o el aumento de la formación bajo condiciones específicas. Las "condiciones" comprenden: (1) adición de un componente al medio de cultivo, (2) remoción de un componente del medio de cultivo, (3) intercambio de un componente en el medio de cultivo por un segundo componente, (4) aumento de la temperatura del medio de cultivo, (5) disminución de la temperatura del medio de cultivo y (6) regulación de las condiciones atmosféricas como, por ejemplo, la concentración de oxígeno o nitrógeno, en las cuales se mantiene el medio de cultivo.

Además, un vector de expresión contiene un casete de expresión previamente descrito.

Los vectores son conocidos por el experto y pueden ser deducidos, por ejemplo, de "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., editores, Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985). Por vectores se entienden aparte de los plásmidos también todos los otros vectores conocidos por el experto, como por ejemplo, fagos, transposones, elementos IS, fasmidos, cósmidos y ADN lineal o circular. Estos vectores pueden ser replicados en el organismo hospedero en forma autónoma o replicados cromosómicamente.

Como plásmidos son adecuados especialmente aquellos que se replican en bacterias corineiformes. Numerosos vectores plásmidos conocidos, como por ejemplo, pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) o pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Otros vectores de plásmidos, como por ejemplo, pCLIK5MCS, o aquellos que se basan en pCG4 (US-A 4.489.160) o pNG2 (Serwold-Davis y col., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) o pAG1 (US-A 5.158.891), pueden ser usados de igual manera.

También son adecuados aquellos vectores de plásmidos con ayuda de los cuales se puede aplicar el procedimiento de la amplificación de genes por integración en el cromosoma, como se describió, por ejemplo, por Remscheid y col. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) para la duplicación y/o la amplificación del hom-thrB-operón. En este método se realiza la clonación del gen completo en un vector de plásmido, el cual puede replicar en un hospedero (típicamente E. coli), pero no en C. glutamicum. Como vectores entran en consideración por ejemplo, pSUP301 (Simon y col., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob o pK19mob (Schäfer y col., Gene 145, 69-73 (1994)), Bernard y col., Journal of Molecular Biology 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf y col., 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) o pBGS8 (Spratt y col., 1986, Gene 41: 337-342). El vector de plásmido, que contiene el gen a amplificar, se pasa a continuación por transformación a la cepa de C. glutamicum deseada. Los métodos para la transformación se describen, por ejemplo, en Thierbach y col. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican y Shivan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) y Tauch y col. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)).

La invención se refiere además a un microorganismo modificado genéticamente del género Corynebacterium, en donde la modificación genética lleva a un aumento del grado de transcripción de por lo menos un gen en comparación con el tipo silvestre y es condicionada por:

Regulación de la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad promotora que contienen

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

B) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de al menos 90% con la secuencia SEQ. ID. NO. 1 a nivel de ácido nucleico, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad promotora.

Tal como se describió previamente en los procesos, la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo se logra mediante ácidos nucleicos con actividad promotora previamente mencionados

- b1) introduciendo uno o varios de los ácidos nucleicos mencionados previamente con actividad promotora al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o de varios genes endógenos se efectúe bajo el control de los ácidos nucleicos con actividad promotora introducidos, o
- 5 b2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o varios de los genes introducidos se efectúe bajo el control de los previamente mencionados ácidos nucleicos endógenos con actividad promotora, o
- b3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico con actividad promotora previamente mencionado y una funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribirse.
- 10 La invención se refiere también a un microorganismo genéticamente modificado del género *Corynebacterium*, en cuyo caso la modificación genética conduce a un aumento del grado de expresión de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre y está condicionada por
- Regulación de la expresión de genes en el microorganismo mediante unidades de expresión que contienen
- E) la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 o
- 15 F) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de al menos 90% a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO. 2), en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión.
- Tal como se ha descrito previamente en el caso de los procedimientos, la regulación de la expresión de genes en el microorganismo se logra mediante unidades de expresión previamente mencionadas
- 20 d1) introduciendo al genoma del microorganismo una o varias unidades de expresión previamente mencionadas de modo que la expresión de uno o de varios genes endógenos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión introducidas, o
- d2) introduciendo al genoma del microorganismo uno o varios genes, de modo que la expresión de uno o de varios genes introducidos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión endógenas previamente mencionadas t o
- 25 d3) introduciendo al microorganismo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen una unidad de expresión previamente mencionada, y una funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a expresar.
- También está descrito un microorganismo genéticamente modificado del género *Corynebacterium* que contiene una unidad de expresión previamente mencionada y una funcionalmente un gen a expresarse, lo caso el gen heterólogo con respecto a la unidad de expresión.
- 30 Este microorganismo genéticamente modificado del género *Corynebacterium* contiene de manera particularmente una unidad de expresión previamente mencionada.
- También está descrito un microorganismo genéticamente modificado del género *Corynebacterium* que contiene un vector, principalmente un vector transportador un vector plasmídico, el cual lleva por lo menos un constructo de ácidos nucleicos recombinante previamente mencionado.
- 35 En una modalidad preferida de los microorganismos genéticamente modificados del género *Corynebacterium*, los genes descritos previamente son por lo menos un ácido nucleico que codifica una proteína de la vía de biosíntesis de productos químicos finos.
- En una modalidad particularmente preferida de los microorganismos genéticamente modificados del género *Corynebacterium*, los genes descritos previamente son seleccionados entre el grupo de ácidos nucleicos que
- 40 codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dioles, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que
- 45 codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas, en cuyo caso los genes pueden contener eventualmente otros elementos de regulación.

Proteínas preferidas de la vía de biosíntesis de aminoácidos son seleccionadas entre el grupo de aspartatoquinasa, aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, diaminopimelato-deshidrogenasa, diaminopimelatodescarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato-reductasa, glicerinaldehído-3-fosfatodeshidrogenasa, 3-fosfoglicerato-quinasa, piruvato-carboxilasa, triosafosfato-isomerasa, regulador transcripcional LuxR, regulador transcripcional LysR1, regulador transcripcional LysR2, malato-quinonaoxidoreductasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahionina-gamma-sintasa, cistahionina-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metileno-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserinadeshidrogenasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-quinasa, treonina-sintasa, treonina-exportador-transportador, treonina-deshidratasa, piruvatooxidasa, lisina-exportador, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, actividad de metionina-sintasa dependiente de la coenzima B12, de metionina-sintasa independiente de la coenzima B12, subunidad 1 y 2 sulfatoadeniltransferasa, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina-sulfito-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, regulador RXA00655, regulador RXN2910, arginil-t-ARN-sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína de eflujo de treonina, serinahidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, proteína de la sulfato-reducción RXA077, proteína de la sulfato-reducción RXA248, proteína de la sulfato-reducción RXA247, proteína OpcA, 1- fosfofructoquinasa y 6-fosfofructoquinasa.

Ejemplos especialmente preferidos de las proteínas y genes de la vía de biosíntesis de los aminoácidos se describieron previamente en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Bacterias del género *Corynebacterium* son principalmente las especies *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* y *Corynebacterium efficiens*.

Bacterias particularmente preferidas del género *Corynebacterium* se seleccionan del grupo de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium efficiens* DSM 44548. *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 y *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Con la abreviatura KFCC se entiende la Korean Federation of Culture Collection, con la abreviatura ATCC la American Type Strain Culture Collection, con la abreviatura DSM la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Otras bacterias especialmente preferidas de los géneros *Corynebacterium* y *Brevibacterium* se listan en la Tabla 3:

Tabla 3

Bacteria		Número de depósito							
Género	Especie	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoacidophilum</i>	21476							
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoacidophilum</i>	13870							
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>		B1147	B11473					
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>			B11475					
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>	15806							
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>	21491							
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>	31270							
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetophilum</i>			B3671					
<i>Corynebacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	6872						2399	
<i>Corynebacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	15511							
<i>Corynebacterium</i>	<i>fujiokense</i>	21496							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	14067							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	39137							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21254							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21255							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	31830							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13032							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	14305							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	15455							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13058							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13059							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	13060							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21492							
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	21513							

ES 2 439 946 T3

Bacteria		Número de depósito							
Género	Especie	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							
Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	lilium		P973						
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594			

Bacteria		Número de depósito							
Género	Especie	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

Las abreviaturas tienen el siguiente significado:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, Estados Unidos

FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japón

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

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España

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

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baam, Holanda

NCTC: National Collection of Type Cultures, Londres, Reino Unido

10 DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Brunswick, Alemania

Por medio de los ácidos nucleicos con actividad promotora previamente mencionados y las unidades de expresión previamente mencionadas es posible, con ayuda de los procedimientos de acuerdo con la invención descritos previamente, regular las vías de metabolismo en los microorganismos genéticamente modificados de acuerdo con la invención, descritos más arriba, para obtener productos biosintéticos específicos.

15 Para ello se refuerzan, por ejemplo, las vías de metabolismo que llevan a un producto biosintético específico por medio del aumento del grado de transcripción y/o del grado de expresión de genes de esta vía de biosíntesis por lo que la cantidad de proteína aumentada conduce a una actividad total elevada de esta proteína de la vía de síntesis deseada y de este modo a un mayor flujo del metabolismo, hasta el producto biosintético deseado.

20 Además, las vías del metabolismo que se apartan de un producto biosintético específico pueden ser disminuidas por reducción del grado de transcripción y/o del grado de expresión de genes de esta vía de biosíntesis que se aparta, por cuanto la cantidad de proteína reducida lleva a una actividad total reducida de esta proteína de la vía de biosíntesis no deseada y de este modo adicionalmente a un flujo de metabolismo aumentado hasta el producto de biosíntesis deseado.

25 Los microorganismos genéticamente modificados de acuerdo con la invención pueden preparar productos de biosíntesis, por ejemplo, a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón, celulosa o de glicerina y etanol.

Por lo tanto, se describe un procedimiento para la preparación de productos de biosíntesis por cultivo de microorganismos genéticamente modificados, de acuerdo con la invención.

30 Según el producto de biosíntesis deseado, tiene que aumentarse o reducirse el grado de transcripción o el grado de expresión de diversos genes. En general es ventajoso modificar el grado de transcripción o el grado de expresión de varios genes, es decir aumentar el grado de transcripción y/o el grado expresión de una combinación de genes y/o reducir el grado de transcripción o el grado de expresión de una combinación de genes.

En los microorganismos modificados genéticamente de acuerdo con la invención, por lo menos un grado de transcripción y/o un grado de expresión modificados de un gen, es decir aumentado o reducido, se debe a un ácido nucleico con actividad promotora previamente mencionado y/o una unidad de expresión previamente mencionada.

- 5 Otros grados de transcripción y/o grados de expresión modificados adicionalmente, es decir aumentados adicionalmente o reducidos adicionalmente, de otros genes en el microorganismo genéticamente modificados pueden, pero no tienen que, remontarse a los ácidos nucleicos con actividad promotora previamente mencionados y/o a las unidades de expresión previamente mencionados.

Además, se describe un procedimiento para la preparación de productos de biosíntesis mediante cultivo de microorganismos genéticamente modificados del género *Corynebacterium*, de acuerdo con la invención.

- 10 Productos de biosíntesis preferidos son los productos químicos finos.

El término "productos químicos puros" es conocido en el campo especializado y comprende compuestos que son producidos por un organismo y que se pueden utilizar en diversas ramas de la industria como, por ejemplo, pero no limitado a, la industria farmacéutica, la agricultura, la industria cosmética, la industria de los alimentos y los forrajes. Estos compuestos comprenden ácidos orgánicos como, por ejemplo, ácido tartárico, ácido itacónico y ácido diaminopimélico, aminoácidos tanto proteinogénicos como también no proteinogénicos, bases de purina y pirimidina, nucleósidos y nucleótidos (como se describen, por ejemplo, en Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, páginas 561-612, en Biotechnology vol. 6, Rehm et al., editores VCH: Weinheim y las citas allí contenidas), lípidos, ácidos grasos saturados e insaturados (por ejemplo, ácido araquidónico), dioles (por ejemplo, propandiol y butandiol), carbohidratos (por ejemplo, ácido hialurónico y trehalosa), compuestos aromáticos (por ejemplo, aminas aromáticas, anilina e índigo), vitaminas y cofactores (tal como se describe en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, volumen A27, "Vitaminas", páginas 443-613 (1996) VCH: Weinheim y las citas allí contenidas; y Ong, A.S., Niki, E. y Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/ Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asia, realizada el 1-3 de septiembre de 1994 en Penang, Malasia, AOCS Press (1995)), enzimas y otros productos químicos descritos por Gutcho (1983) en Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 y las citas bibliográficas allí indicadas. El metabolismo y los usos de determinados productos químicos finos se ilustran a continuación con más detalle.

I. Metabolismo y usos de aminoácidos

- 30 Los aminoácidos comprenden las unidades estructurales básicas de todas las proteínas y son por lo tanto esenciales para las funciones celulares normales. El término "aminoácido" es conocido en el campo especializado. Los aminoácidos proteinogénicos, de los cuales existen 20 tipos, sirven como unidades estructurales para las proteínas, en las cuales se encuentran unidos entre sí por medio de uniones peptídicas; en cambio los aminoácidos no proteinogénicos (de los cuales se conocen cientos) generalmente no se encuentran en las proteínas (ver Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A2, páginas 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Los aminoácidos pueden estar presentes en la configuración D o L, aunque los aminoácidos L son generalmente el único tipo que se encuentra en proteínas que existen naturalmente. Las vías de biosíntesis y degradación de cada uno de los 20 aminoácidos proteinogénicos están bien caracterizadas tanto en las células procariotas como también eucariotas (ver, por ejemplo, Stryer, L., Biochemistry, 3ra. edición, págs. 578-590 (1988)). Los aminoácidos "esenciales" (histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina), así denominados porque debido a la complejidad de su biosíntesis deben ser tomados con los alimentos, son transformados por vías de biosíntesis sencillas en los 11 aminoácidos "no esenciales" restantes (alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina). Los animales superiores poseen la capacidad de sintetizar algunos de estos aminoácidos, sin embargo, los aminoácidos esenciales tienen que ser incorporados con los alimentos, para que tenga lugar una síntesis de proteínas normal.
- 45 Aparte de su función en la biosíntesis de proteína, estos aminoácidos son productos químicos interesantes en sí mismos, y se ha descubierto que se pueden usar muchos en diversas aplicaciones en la industria alimentaria, de forraje, química, cosmética, en la agricultura y en la industria farmacéutica. La lisina no sólo es un aminoácido importante para la alimentación del ser humano sino también para animales monogástricos, como las aves y los cerdos. El glutamato se usa principalmente como aditivo de sabor (glutamato monosódico, MSG) así como también ampliamente en la industria alimentaria, como también aspartato, fenilalanina, glicina y cisteína. Glicina, L-metionina y triptófano se usan todos en la industria farmacéutica. Glutamina, valina, leucina, isoleucina, histidina, arginina, prolina, serina y alanina se usan en la industria farmacéutica y en la industria de los cosméticos. Treonina, triptófano y D- /L-metionina son aditivos para alimentos para animales, muy usados (Leuchtenberger, W. (1996) "Amino acids - technical production and use", págs. 466-502 en Rehm y col., (ed.), Biotechnology, Vol. 6, capítulo 14a, VCH: Weinheim). Se ha descubierto que estos aminoácidos son adecuados además como precursores para la síntesis de aminoácidos y proteínas sintéticos, como N-acetilcisteína, S-carboximetil-L-cisteína, (S)-5-hidroxitriptófano y otras sustancias descritas en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, vol. A2, páginas 57- 97, VCH, Weinheim, 1985.

La biosíntesis de estos aminoácidos naturales en organismos, que los pueden producir, por ejemplo bacterias, ha sido bien caracterizada (para una sinopsis de la biosíntesis bacteriana de aminoácidos y su regulación, ver Umbarger, H. E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533-606). El glutamato es sintetizado por aminación reductora de cetoglutarato, un producto intermedio en el ciclo del ácido cítrico. Glutamina, prolina y arginina son producidos consecutivamente de glutamato. La biosíntesis de serina se realiza en un procedimiento de tres pasos y comienza con 3-fosfoglicerato (un producto intermedio en la glicólisis) y da por resultado estos aminoácidos después de los pasos de oxidación, transaminación e hidrólisis. Cisteína y glicina son producidos a partir de serina, las primeras por condensación de homocisteína con serina, y la última por transferencia del átomo de carbono β de cadena lateral al tetrahidrofolato, en una reacción catalizada por serinatránshidroximetilasa. Fenilalanina y tirosina son sintetizadas a partir de los precursores de la vía de glicólisis y pentosafosfato, eritrosa-4-fosfato y fosfoenolpiruvato en una vía de biosíntesis de 9 pasos, la que sólo se diferencia de la síntesis de pterinato en los dos últimos pasos. El triptófano se produce igualmente a partir de estas dos moléculas de partida, sin embargo, su síntesis se realiza en una vía de 11 pasos. La tirosina se puede preparar en una reacción catalizada por fenilalaninahidroxilasa también a partir de fenilalanina. Alanina, valina y leucina son productos de biosíntesis de piruvato, el producto final de la glicólisis. Aspartato se forma a partir de oxalacetato, un producto intermedio del ciclo del citrato. Asparagina, metionina, treonina y lisina son producidos por transformación de aspartato. Isoleucina se forma a partir de treonina. En una vía de 9 pasos compleja se realiza la formación de histidina a partir de 5-fosforibosil-1-pirofosfato, un azúcar activado.

Los aminoácidos cuya cantidad sobrepasa el requerimiento de biosíntesis de proteína de la célula no pueden ser almacenados y en cambio se degradan, de modo que se ponen a disposición productos intermedios para las vías de metabolismo principales de la célula (para una sinopsis véase Stryer, L., Biochemistry, 3. Edición, capítulo 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle"; páginas 495- 516 (1988)). Si bien la célula puede transformar aminoácidos no deseados en productos intermedios de metabolismo útiles, la producción de aminoácidos con respecto a la energía, las moléculas de los precursores y las enzimas necesarias para su síntesis requiere mucho trabajo. No es sorprendente por lo tanto que la biosíntesis de los aminoácidos es regulada por inhibición de la retroalimentación, en cuyo caso la presencia de un aminoácido determinado hace más lenta o incluso finaliza su propia producción (para una sinopsis sobre el mecanismo de retroalimentación en vías de síntesis de aminoácidos ver Stryer, L. Biochemistry, 3ra. ed., cap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", págs. 575-600 (1988)). La producción de un determinado aminoácido está limitada por lo tanto por la cantidad de este aminoácido en la célula.

I Vitaminas, cofactores y metabolismo de nutraceuticos, así como usos

Las vitaminas, cofactores y nutraceuticos comprenden otro amplio grupo de moléculas. Los animales superiores han perdido la capacidad de sintetizarlos y por lo tanto los tienen que ingerir, aunque pueden ser sintetizados fácilmente por otros organismos, como bacterias. Estas moléculas son o bien moléculas biológicamente activas o precursores de sustancias biológicamente activas sirven como vehículos de electrones o productos intermedios en una serie de vías de metabolismo. Estos compuestos tienen, aparte de su valor nutritivo, también un valor industrial significativo como colorantes, antioxidantes y catalizadores u otras sustancias auxiliares para el procesamiento. (Para una sinopsis sobre la estructura, actividad y los usos industriales de estos compuestos véase, por ejemplo, "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", "Vitamins", vol. A27, págs. 443-613, VCR: Weinheim, 1996). El término "vitamina" es conocido en el campo específico y comprende nutrientes que necesita un organismo para su función normal, pero que no pueden ser sintetizados por ese organismo. El grupo de las vitaminas puede comprender cofactores y compuestos nutraceuticos. El término "cofactor" comprende compuestos del tipo no proteína, que son necesarios para producir una actividad enzimática normal. Estos compuestos pueden ser orgánicos o inorgánicos; las moléculas de cofactor de acuerdo con la invención son preferentemente orgánicas. El término "nutraceutico" comprende aditivos de los alimentos que son buenos para la salud, para plantas y animales, especialmente para el ser humano. Ejemplos de tales moléculas son las vitaminas, los antioxidantes e igualmente algunos lípidos (por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados)

La biosíntesis de estas moléculas en organismos, que están capacitados para su producción, como las bacterias, ha sido caracterizada ampliamente ("Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", "Vitamins", vol. A27, págs. 443-613, VCR: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) "Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology", John Wiley & Sons; Ong; A.S.; Niki, E. Y Packer, L. (1995), "Nutrition, Lipids, Health and Disease", Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asia, realizada del 1 a 3 de septiembre de 1994 en Penang, Malasia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 págs.)

La tiamina (vitamina B1) se forma por medio del acoplamiento químico de pirimidina y unidades tiazol. La riboflavina (vitamina B2) se sintetiza a partir de guanosin-5'-trifosfato (GTP) y ribosa-5'-fosfato. La riboflavina a su vez se usa para la síntesis de flavina- mononucleótido (FMN) y flavinadenin-dinucleótido (FAD). La familia de compuestos, que son denominados en conjunto como "vitamina B6" (por ejemplo, piridoxina, piridoxamina, piridoxal-5' -fosfato y el clorhidrato de piridoxina usado comercialmente), son todos derivados de la unidad estructural común 5-hidroxi-6-metilpiridina. El pantotenato (ácido pantoténico, R-(+)-N- (2,4-dihidroxi-3,3-dimetil-1-oxobutil)- β -alanina) puede prepararse o bien por síntesis química o por fermentación. Los últimos pasos en la biosíntesis de pantotenato consisten en la condensación impulsada por ATP de β -alanina y ácido pantoico. Las enzimas responsables de los

pasos de biosíntesis para la transformación en ácido pantoico, en β -alanina y para la condensación en ácido pantoténico, son conocidas. La forma metabólicamente activa de pantotenato es coenzima A, cuya biosíntesis se produce mediante 5 pasos enzimáticos. Pantotenato, piridoxal 5'-fosfato, cisteína y ATP son los precursores de la coenzima A. Estas enzimas catalizan no sólo la formación de pantotenato, sino también la producción de ácido (R)-pantoico, (R)-pantolactona, (R)-pantenol (provitamina B5), panteteína (y sus derivados) y coenzima A.

La biosíntesis de biotina a partir de la molécula de precursor pimeloil-CoA en microorganismos ha sido investigada exhaustivamente, y se han identificado varios de los genes que participan. Se ha demostrado que muchas de las proteínas correspondientes participan de la síntesis Fe-Cluster y pertenecen a la clase de las proteínas nifS. El ácido lipoico se deriva del ácido octanoico y sirve como coenzima en el metabolismo energético, en donde son componentes del complejo de la piruvato deshidrogenasa y del complejo de la α -cetoglutarato deshidrogenasa. Los folatos son un grupo de sustancias que se derivan del ácido fólico, el cual a su vez se deriva del ácido L-glutámico, el ácido p-aminobenzoico y 6-metilpterina. La biosíntesis del ácido fólico y sus derivados, a partir de los productos intermedios del metabolismo guanosin-5'-trifosfato (GTP), ácido L-glutámico y ácido p-aminobenzoico ha sido investigada intensamente en determinados organismos.

Los corrinoides (como la cobalamina y especialmente la vitamina B₁₂) y la porfirina pertenecen a un grupo de productos químicos que se caracterizan por un sistema de anillo tetrapirrol. La biosíntesis de la vitamina B₁₂ es bastante compleja, por lo que aún no ha sido caracterizada completamente, sin embargo se ha conocido mientras tanto una gran parte de las enzimas y sustratos que participan. El ácido nicotínico (nicotinato) y la nicotinamida son derivados de piridina, los que también son denominados "niacina". La niacina es el precursor de las importantes coenzimas NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) y NADP (nicotinamida adenina nucleótido fosfato) y sus formas reducidas.

La producción de estos compuestos en gran escala se basa en gran parte en las síntesis químicas sin células, si bien algunos de estos productos químicos también han sido producidos por un gran cultivo de microorganismos, como riboflavina, vitamina B₆, pantotenato y biotina. Sólo la vitamina B₁₂ es producida en base a la complejidad de su síntesis solamente por fermentación. Los procedimientos in vitro requieren muchos materiales y tiempo y frecuentemente tienen altos costos.

III. Metabolismo y usos de purina, pirimidina, nucleósidos y nucleótidos

Los genes para el metabolismo de purina y pirimidina y sus proteínas correspondientes son objetivos importantes para la terapia de enfermedades tumorales y enfermedades virales. El término "purina" o "pirimidina" comprende bases que contienen nitrógeno que son componentes de los ácidos nucleicos, coenzimas y nucleótidos. El término "nucleótido" comprende las unidades estructurales básicas de las moléculas de ácidos nucleicos que tienen una base que contiene nitrógeno, un azúcar pentosa (en el ARN el azúcar es ribosa, en el ADN el azúcar es D-desoxirribosa) y ácido fosfórico. El término "nucleósido" comprende moléculas que sirven como precursores de nucleótidos, las cuales a diferencia de los nucleótidos no presentan ninguna unidad de ácido fosfórico. Por inhibición de la biosíntesis de estas moléculas o su movilización para la formación de moléculas de ácidos nucleicos es posible inhibir la síntesis de ARN y ADN; si esta actividad se inhibe selectivamente en células cancerígenas, puede inhibirse la capacidad de división y replicación de las células tumorales.

Existen además nucleótidos que no forman moléculas de ácidos nucleicos, pero que sirven como almacenadores de energía (es decir, AMP) o como coenzimas (es decir, FAD y NAD).

Muchas publicaciones han descrito el uso de estos productos químicos para estas indicaciones medicinales, en donde se influye sobre el metabolismo de purina y/o pirimidina (por ejemplo Christopherson, R. I. y Lyons, S. D. (1990), "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", *Med. Res. Reviews* 10: 505-548). Las investigaciones sobre enzimas que participan en el metabolismo de purina y pirimidina se han concentrado en el desarrollo de nuevos medicamentos que pueden ser usados, por ejemplo, como elementos de inmunosupresión o antiproliferativos (Smith, J. L., "Enzymes in Nucleotide Synthesis", *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 (1995), 752-757, *Biochem. Soc. Transact.* 23 (1995) 877-902). Las bases purina y pirimidina, nucleósidos y nucleótidos tienen sin embargo, también otras posibilidades de uso: como productos intermedios en la biosíntesis de diversos productos químicos finos (por ejemplo, tiamina, S-adenosil-metionina, folatos o riboflavina), como vehículos de energía para la célula (por ej., ATP o GTP) y para los productos químicos propiamente dichos, se utilizan comúnmente como reforzadores del sabor (por ejemplo, IMP o GMP) o para muchas aplicaciones medicinales (véase, por ejemplo, Kuninaka, A., (1996), "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology", vol. 6, Rehm y col., eds. VCH: Weinheim, págs. 561-612). Las enzimas que participan en el metabolismo de purina, pirimidina, nucleósidos o nucleótidos, sirven también cada vez más como objetivos, contra los cuales se desarrollan productos químicos para la protección de plantas, incluidos fungicidas, herbicidas e insecticidas.

El metabolismo de estos compuestos en bacterias ha sido caracterizado (para sinopsis véase, por ejemplo, Zalkin, H. y Dixon, J. E. (1992), "De novo purin nucleotide biosynthesis", en "Progress in Nucleic Acids Research and

Molecular Biology, vol. 42, Academic Press, págs. 259-287; y Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; cap. 8 en: "Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, Nueva York). El metabolismo de purina, objeto de investigación intensa, es esencial para el funcionamiento normal de la célula. Un metabolismo de purina perturbado en animales superiores puede causar enfermedades serias, por ejemplo, gota. Los nucleótidos de purina son sintetizados a través de una serie de pasos a través del compuesto intermedio inosina-5'-fosfato (IMP) a partir de ribosa-5-fosfato, lo que lleva a la producción de guanosina-5'-monofosfato (GMP) o adenosina-5'-monofosfato (AMP), a partir de los cuales se pueden preparar fácilmente las formas trifosfato usadas como nucleótidos. Estos compuestos también se utilizan como almacenadores de energía, de modo que su degradación suministra energía para muchos procesos bioquímicos en la célula. La biosíntesis de pirimidina se realiza a través de la formación de uridin-5'-monofosfato (UMP) a partir de ribosa-5-fosfato. El UMP a su vez es transformado en citidina-5'-trifosfato (CTP). Las formas desoxi de todos los nucleótidos se preparan en una reacción de reducción de un solo paso a partir de la forma difosfato-ribosa del nucleótido a la forma difosfato- desoxi-ribosa del nucleótido. Después de la fosforilación estas moléculas pueden participar en la síntesis de ADN.

IV. Metabolismo y usos de trehalosa

La trehalosa está compuesta por dos moléculas de glucosa que están unidas entre sí por medio de un enlace α, α -1,1. Se usa comúnmente en la industria alimentaria como edulcorante, como aditivo para alimentos secos o congelados, así como también en bebidas. Sin embargo, también se usa en la industria farmacéutica, en la cosmética y en la biotecnología (ver por ejemplo, Nishimoto y col., (1998), patente US No. 5.759.610; Singer, M. A. y Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460- 467; Paiva, C.L.A. y Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293- 314; y Shiosaka, M. J. Japón 172 (1997) 97- 102). La trehalosa es producida por enzimas de muchos microorganismos y se libera de manera natural en el medio circundante, del cual se puede obtener mediante procedimientos conocidos en la técnica.

Productos de biosíntesis especialmente preferidos son seleccionados entre el grupo de ácidos orgánicos, proteínas, nucleótidos y nucleósidos, así como también aminoácidos proteinogénicos como también no proteinogénicos, lípidos y ácidos grasos, dioles, carbohidratos, compuestos aromáticos, vitaminas y cofactores, enzimas y proteínas. Ácidos orgánicos preferidos son ácido tartárico, ácido itacónico y ácido diaminopimélico.

Los nucleósidos y nucleótidos preferidos se describen, por ejemplo, en Kuninaka, A. (1996), Nucleotides and related compounds, págs. 561-612, en Biotechnology, vol. 6, Rehm y col., ed. VCH; Weinheim, y las citas bibliográficas allí contenidas.

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

Productos de biosíntesis especialmente preferidos son los aminoácidos, más preferentemente, los aminoácidos esenciales, especialmente L-glicina, L-alanina, L-leucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-triptófano, L-lisina, L-glutamina, ácido L-glutámico, L-serina, L-prolina, L-valina, L-isoleucina, L-cisteína, L-tirosina, L-histidina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspartico y L-treonina, L-homoserina, especialmente L-lisina, L-metionina y L-treonina. A continuación se entiende por un aminoácido como, por ejemplo, lisina, metionina y treonina, tanto la forma L como la forma D de los aminoácidos, preferentemente la forma L, es decir, por ejemplo, L-lisina, L-metionina y L-treonina.

Principalmente se describe un procedimiento para la preparación de lisina por medio del cultivo de microorganismos genéticamente modificados del género *Corynebacterium* con un grado de expresión aumentado de por lo menos un gen en comparación con el tipo silvestre, en donde:

la expresión de genes en el microorganismo se regula mediante unidades de expresión que contienen

E) la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 o

F) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO. 2, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión,

y en cuyo caso los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una aspartato-quinasa, ácidos nucleicos que codifican una aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una diaminopimelato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una diaminopimelato-descarboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una dihidrodipicolinato-sintetasa, ácidos nucleicos que codifican una dihidrodipicolinato-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una 3-fosfoglicerato-quinasa, ácidos nucleicos que codifican una piruvato-carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una triosafosfato-isomerasa, ácidos nucleicos que codifican un regulador transcripcional LuxR, ácidos nucleicos que codifican un regulador transcripcional LysR1, ácidos nucleicos que codifican un regulador transcripcional LysR2, ácidos nucleicos que codifican una malato-quinona-oxidorreductasa, ácidos nucleicos que codifican una glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una transcetolasa, ácidos nucleicos que codifican una transaldolasa, ácidos nucleicos que codifican un exportador de lisina, ácidos nucleicos que codifican una biotina- ligasa, ácidos nucleicos que codifican una arginil-t-ARNsintetasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoenolpiruvato-carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una fructosa-1,6-bisfosfatasa, ácidos nucleicos que codifican una proteína OPCA, ácidos nucleicos que codifican una 1-fosfofructoquinasa y ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfofructocinasa.

Como se describió más arriba en los procedimientos, la regulación de la expresión de estos genes en el microorganismo se logra por medio de unidades de expresión previamente descritas:

dh1) introduciendo en el genoma del microorganismo una o más unidades de expresión previamente mencionadas de modo que se realiza la expresión de uno o más de estos genes endógenos bajo el control de las unidades de expresión introducidas,

o

dh2) introduciendo en el genoma del microorganismo uno o más de estos genes, de modo que la expresión de uno o más de los genes introducidos se realiza bajo el control de las unidades de expresión endógenas, previamente mencionadas, o

dh3) introduciendo en el microorganismo uno o más constructos de ácidos nucleicos, que contienen una unidad de expresión previamente mencionada y une funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a expresar.

Otra forma de realización preferida del procedimiento arriba descrito para la preparación de lisina está caracterizado porque los microorganismos genéticamente modificados en comparación con el tipo silvestre, presentan además una actividad aumentada, por lo menos una de las actividades seleccionadas entre el grupo de actividad aspartato-quinasa, actividad aspartato-semialdehídodeshidrogenasa, actividad diaminopimelato-deshidrogenasa, actividad diaminopimelato-descarboxilasa, actividad dihidrodipicolinato-sintetasa, actividad dihidrodipicolinato-reductasa, actividad glicerinaldehído-3 fosfatodeshidrogenasa, actividad 3-fosfoglicerato-quinasa, actividad piruvato-carboxilasa, actividad triosafosfatoisomerasa, actividad del regulador transcripcional LuxR, actividad del regulador transcripcional LySR1, actividad del regulador transcripcional LySR2 , actividad de malato- quinona-oxidorreductasa, actividad de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, actividad de 6-fosfogluconatodeshidrogenasa, actividad de transcetolasa, actividad de transaldolasa, actividad de exportador de lisina, actividad de arginil-t-ARN-sintetasa, actividad de fosfoenolpiruvatocarboxilasa, actividad de fructosa-1,6-bisfosfatasa, actividad de proteína OPCA, actividad de 1-fosfofructoquinasa, actividad de 6-fosfofructoquinasa y actividad biotina-ligasa.

Otra forma de realización especialmente preferida del procedimiento arriba descrito para la preparación de lisina está caracterizada porque los microorganismos genéticamente modificados en comparación con el tipo silvestre presentan además una actividad reducida, por lo menos una de las actividades, seleccionadas entre el grupo de actividad treonina deshidratasa, actividad homoserina O- acetiltransferasa, actividad O-acetilhomoserinasulfhidrilasa, actividad fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, actividad piruvato-oxidasa, actividad homoserina-quinasa, actividad homoserina-deshidrogenasa, actividad de exportador de treonina, actividad de proteína de eflujo de treonina, actividad asparaginasa, actividad aspartato descarboxilasa y actividad treonina-sintasa.

Estas actividades adicionales, aumentadas o reducidas, de por lo menos una de las actividades antes descritas, sin embargo, pueden pero no tienen que ser causadas por un ácido nucleico con actividad promotora de acuerdo, previamente mencionado y/o una unidad de expresión previamente mencionada.

También se describe un procedimiento para la preparación de metionina por medio de cultivo de microorganismos del género *Corynebacterium* genéticamente modificados con grado de expresión aumentado de por lo menos un gen en comparación con el tipo silvestre, en donde:

la expresión de genes en el microorganismo se regula mediante unidades de expresión que contienen

E) la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 o

F) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO. 2, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión, y en cuyo caso los genes se seleccionan de grupo de ácidos nucleicos que codifican una aspartato-quinasa, ácidos nucleicos que codifican una aspartato-semialdehído- deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una homoserina-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una 3-fosfoglicerato-quinasa, ácidos nucleicos que codifican una piruvato-carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una triosafosfato-isomerasa, ácidos nucleicos que codifican una homoserina-O- acetiltransferasa, ácidos nucleicos que codifican una cistahioningamma-sintasa, ácidos nucleicos que codifican una cistahionina-beta-liasa, ácidos nucleicos que codifican una serina-hidroximetiltransferasa, ácidos nucleicos que codifican una O- acetilhomoserina-sulfhidrilasa, ácidos nucleicos que codifican una metileno-tetrahidrofolato- reductasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoserinaaminotransferasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoserina-fosfatasa, ácidos nucleicos que codifican una serina-acetil-transferasa, ácidos nucleicos que codifican una cisteína-sintasa I, ácidos nucleicos que codifican una cisteína-sintasa II, ácidos nucleicos que codifican una actividad metionina-sintasa dependiente de la coenzima B12, ácidos nucleicos que codifican una actividad metionina-sintasa independiente de la coenzima B12, ácidos nucleicos que codifican una actividad sulfato-adenililtransferasa, ácidos nucleicos que codifican una actividad fosfoadenosinfosulfato-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una actividad ferredoxina-sulfito-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una actividad ferredoxina NADPH-reductasa, ácidos nucleicos que codifican una actividad ferredoxina, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la sulfatoreducción RXA077 , ácidos nucleicos que codifican una proteína de la sulfato-reducción RXA248, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la sulfato-reducción RXA247, ácidos nucleicos que codifican un regulador RXA0655, y ácidos nucleicos que codifican un regulador RXN2910.

Como se describió previamente en el procedimiento, la regulación de la expresión de estos genes en el microorganismo mediante unidades de expresión previamente mencionadas se logra:

dh1) introduciendo en el genoma del microorganismo una o más unidades de expresión previamente mencionadas de modo que la expresión de uno o más de estos genes endógenos se efectúa bajo el control de las unidades de expresión introducidas, o

dh2) introduciendo en el genoma del microorganismo uno o más genes, de modo que la expresión de uno o más de los genes introducidos se realiza bajo el control de las unidades de expresión endógenas, previamente mencionadas, o

dh3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen una unidad de expresión previamente mencionada y une funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a expresar.

Otra forma de realización preferida del procedimiento arriba descrito para la preparación de metionina está caracterizada porque los microorganismos genéticamente modificados presentan en comparación con el tipo silvestre adicionalmente una actividad aumentada, por lo menos una de las actividades, seleccionada entre el grupo de actividad aspartato-quinasa, actividad aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, actividad homoserina-deshidrogenasa, actividad glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, actividad 3-fosfoglicerato-quinasa, actividad piruvato-carboxilasa, actividad triosafosfato-isomerasa, actividad homoserina-O-acetiltransferasa, actividad cistahioninagamma-sintasa, actividad cistahionina-beta-liasa, actividad serina-hidroximetiltransferasa, actividad O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, actividad metileno-tetrahidrofolato-reductasa, actividad fosfoserina-aminotransferasa, actividad fosfoserina- fosfatasa, actividad serina-acetil-transferasa, actividad cisteínasintasa I, actividad cisteína-sintasa II, actividad metionina-sintasa dependiente de la coenzima B12, actividad metionina-sintasa independiente de la coenzima B12, actividad sulfato-adenililtransferasa, actividad fosfoadenosina-fosfosulfato-reductasa, actividad ferredoxina-sulfito-reductasa, actividad ferredoxina NADPH-reductasa, actividad ferredoxina, actividad de una proteína de la sulfato-reducción RXA077 , actividad de una proteína de la sulfato-reducción RXA248, actividad de una proteína de la sulfato-reducción RXA247 , actividad de un regulador RXA0655, y actividad de un regulador RXN2910.

Otra forma de realización especialmente preferida del procedimiento arriba descrito para la preparación de metionina está caracterizado porque los microorganismos genéticamente modificados presentan en comparación con el tipo silvestre adicionalmente una actividad reducida, por lo menos una de las actividades seleccionadas entre actividad homoserina-quinasa, actividad treonina-deshidratasa, actividad treonina-sintasa, actividad meso-diaminopimelato D-deshidrogenasa (actividad fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa, actividad piruvato-oxidasa, actividad dihidrodipicolinato D-sintasa, actividad dihidrodipicolinato reductasa y actividad diaminopicolinato descarboxilasa.

Estas actividades adicionales, aumentadas o reducidas de por lo menos una de las actividades arriba descritas sin embargo pueden pero no tienen que ser causadas por un ácido nucleico con actividad promotora previamente mencionado y/o una unidad de expresión previamente mencionada.

También está descrito un procedimiento para la preparación de treonina por cultivo de microorganismos genéticamente modificados del género *Corynebacterium* con grado de expresión aumentado de por lo menos un gen en comparación con el tipo silvestre, en donde:

la expresión de genes en el microorganismo se regula mediante unidades de expresión que contienen

5 E) la secuencia de ácido nucleico SEQ. ID. NO. 2 o

F) una secuencia derivada de esta secuencia mediante sustitución, inserción o delección de nucleótidos, que presenta una identidad de al menos 90 % a nivel de ácido nucleico con la secuencia SEQ. ID. NO. 2, en cuyo caso los genes son heterólogos respecto de las unidades de expresión, y en cuyo caso los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una aspartato-quinasa, ácidos nucleicos que codifican una aspartato-semialdehidodeshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una 3-fosfoglicerato-quinasa, ácidos nucleicos que codifican una piruvato-carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una triosafofato-isomerasa, ácidos nucleicos que codifican una homoserina-quinasa, ácidos nucleicos que codifican una treonina sintasa, ácidos nucleicos que codifican un portador exportador de treonina, ácidos nucleicos que codifican una glucosa-6-fosfato- deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican una transaldolasa, ácidos nucleicos que codifican una transcetolasa, ácidos nucleicos que codifican una malatoquinona-oxidoreductasa, ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, ácidos nucleicos que codifican un exportador de lisina, ácidos nucleicos que codifican una biotina ligasa, ácidos nucleicos que codifican una fosfoenolpiruvato-carboxilasa, ácidos nucleicos que codifican una proteína de eflujo de treonina, ácidos nucleicos que codifican una fructosa-1,6-bisfosfatasa, ácidos nucleicos que codifican una proteína OpcA, ácidos nucleicos que codifican una 1-fosfofructoquinasa, ácidos nucleicos que codifican una 6-fosfofructoquinasa y ácidos nucleicos que codifican una homoserina-deshidrogenasa.

Como se describió previamente en los procedimientos, la regulación de la expresión de estos genes en el microorganismo se logra por medio de las unidades de expresión previamente mencionadas

dh1) introduciendo en el genoma del microorganismo una o más unidades de expresión previamente mencionadas, de modo que la expresión de uno o más de estos genes endógenos se realiza bajo el control de las unidades de expresión introducidas, o

dh2) introduciendo en el genoma del microorganismo uno o más de estos genes al genoma del microorganismo, de modo que la expresión uno o más de los genes introducidos se efectúe bajo el control de las unidades de expresión endógenas, previamente mencionadas, o

dh3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen una unidad de expresión previamente mencionada, opcionalmente con actividad de expresión específica aumentada, y se unen funcionalmente uno o más ácidos nucleicos a expresar.

Otra forma de realización preferida del procedimiento descrito previamente para la preparación de treonina está caracterizado porque los microorganismos genéticamente modificados presentan adicionalmente, en comparación con el tipo silvestre una actividad aumentada, por lo menos una de las actividades, seleccionada entre el grupo actividad aspartato-quinasa, actividad aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, actividad gliceraldehído-3-fosfatodeshidrogenasa, actividad 3-fosfoglicerato-quinasa, actividad piruvato-carboxilasa, actividad triosafofatisomerasa, actividad treonina sintasa, actividad de un portador exportador de treonina, actividad transaldolasa, actividad transcetolasa, actividad glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, actividad malato-quinona-oxidoreductasa, actividad homoserina-quinasa, actividad biotina-ligasa, actividad fosfoenolpiruvato-carboxilasa, actividad de proteína de eflujo de treonina, proteína actividad OpcA, actividad fosfofructoquinasa, actividad 1-6-fosfofructoquinasa, actividad fructosa-1,6-bisfosfatasa, actividad 6- fosfogluconato-deshidrogenasa y actividad homoserina-deshidrogenasa.

Otra forma de realización preferida del procedimiento descrito previamente para la preparación de treonina está caracterizado porque los microorganismos genéticamente modificados presentan adicionalmente, en comparación con el tipo silvestre, una actividad reducida. por lo menos una de las actividades, seleccionadas entre el grupo de treoninadeshidratasa, actividad homoserina O-acetiltransferasa, actividad serina-hidroximetiltransferasa, actividad O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, actividad meso-diaminopimelato D-deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa, actividad piruvatooxidasa, actividad dihidrodipicolinato sintasa, actividad dihidrodipicolinato reductasa, actividad asparaginasa, actividad aspartato-descarboxilasa, actividad de exportador de lisina, actividad acetolactato-sintasa, actividad cetol-aid- reductoisomerasa, actividad de aminotransferasa de cadena ramificada, actividad metionina sintasa dependiente de la coenzima B12, actividad metionina sintasa independiente de la coenzima B12, actividad dihidroxiácidosdeshidratasa y actividad diaminopicolinato descarboxilasa,

Estas actividades adicionales, aumentadas o reducidas, de por lo menos una de las actividades previamente descritas, sin embargo pueden pero no tienen que ser causadas por un ácido nucleico con actividad promotora de acuerdo con la invención y/o una unidad de expresión de acuerdo con la invención.

5 Por el término "actividad" de una proteína se entiende en el caso de enzimas la actividad enzimática de la proteína correspondiente, en el caso de otras proteínas, por ejemplo proteínas estructurales o de transporte, la actividad fisiológica de las proteínas.

Por lo regular, las enzimas pueden transformar un sustrato en un producto y/o catalizar este paso de transformación.

10 Correspondientemente, por "actividad" de una enzima se entiende la cantidad de sustrato transformado o la cantidad de producto formado, por la enzima en un tiempo determinado.

En el caso de una actividad aumentada con respecto al tipo silvestre, se aumenta por lo tanto por parte de la enzima la cantidad de sustrato transformado y/o la cantidad de producto formado, en un tiempo determinado, en comparación con el tipo silvestre.

15 Este aumento de la "actividad" en todas las actividades descritas previamente y a continuación, es preferentemente de por lo menos 5%, más preferentemente de por lo menos 20%, más preferentemente de por lo menos 50%, más preferentemente de por lo menos 100%, más preferentemente aún de por lo menos 300%, más preferentemente todavía de por lo menos 500%, especialmente de por lo menos 600% de la "actividad del tipo silvestre".

20 En el caso de una actividad reducida en comparación con el tipo silvestre, se reduce por lo tanto por parte de la enzima la cantidad de sustrato transformado y/o la cantidad de producto formado, en un tiempo determinado, en comparación con el tipo silvestre.

Por una actividad reducida se entiende preferentemente la inhibición o el bloqueo parcial o sustancialmente completo, basado en diferentes mecanismos de biología celular, de la funcionalidad de esta enzima en un microorganismo.

25 Una reducción de la actividad comprende una disminución cuantitativa de una enzima hasta una falta sustancialmente completa de la enzima (es decir, la falta de detectabilidad de la actividad correspondiente o la falta de detectabilidad inmunológica de la enzima). Preferentemente se reduce la actividad en el microorganismo en comparación con el tipo silvestre en por lo menos 5%, más preferentemente por lo menos 20%, más preferentemente por lo menos 50%, más preferentemente por lo menos 100%. "Reducción" también significa la falta completa de la actividad correspondiente.

30 La actividad de determinadas enzimas en microorganismos genéticamente modificados así como también en el tipo silvestre y con ello el aumento o la reducción de la actividad enzimática se pueden calcular de acuerdo con procedimientos conocidos, como por ejemplo, ensayos enzimáticos.

Por ejemplo, por piruvatocarboxilasa se entiende una proteína que presenta la actividad enzimática de transformar piruvato en oxaloacetato.

35 Correspondientemente se entiende por una actividad piruvatocarboxilasa la cantidad de piruvato transformado y/o la cantidad de oxaloacetato formada por la proteína piruvatocarboxilasa en un tiempo determinado.

En el caso de una actividad piruvatocarboxilasa aumentada con respecto al tipo silvestre se aumenta por lo tanto la cantidad de piruvato transformada y/o la cantidad de oxaloacetato formada por la proteína piruvatocarboxilasa en un tiempo determinado, en comparación con el tipo silvestre

40 Este aumento de la actividad piruvatocarboxilasa es preferentemente de por lo menos 5%, más preferentemente de por lo menos 20%, más preferentemente de por lo menos 50%, más preferentemente de por lo menos 100%, más preferentemente aún de por 300%, más preferentemente todavía de por lo menos 500%, especialmente de por lo menos 600% de la actividad piruvatocarboxilasa del tipo silvestre.

45 Además, por una actividad fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa se entiende, por ejemplo, la actividad enzimática de una fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa.

Por una fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa se entiende una proteína que tiene la actividad enzimática de transformar oxaloacetato en fosfoenolpiruvato.

Correspondientemente, por una actividad fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa se entiende la cantidad de oxaloacetato transformada y/o la cantidad de fosfoenolpiruvato formada por la proteína fosfoenolpiruvato en un tiempo determinado.

- 5 En caso de una actividad fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa reducida con respecto al tipo silvestre se reduce por lo tanto en comparación con el tipo silvestre la cantidad de oxaloacetato transformado y/o la cantidad de fosfoenolpiruvato formado por la proteína fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa en un tiempo determinado en comparación con el tipo silvestre.

- 10 Una reducción de la actividad fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa comprende una reducción cuantitativa de una fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa hasta una falta sustancialmente completa de la fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (es decir, no se puede determinar la actividad de la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa o no se puede determinar inmunológicamente la fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa). Preferentemente se reduce la actividad de la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa en comparación con el tipo silvestre en por lo menos 5%, más preferentemente por lo menos 20%, más preferentemente por lo menos 50%, más preferentemente por lo menos 100%. "Reducción" también significa la falta completa de la actividad fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa.

- 15 El aumento adicional de actividades puede realizarse por medio de diversas vías, por ejemplo, por suspensión de mecanismos de regulación inhibidores a nivel de la expresión y de proteínas o por aumento de la expresión génica de ácidos nucleicos que codifican a la proteína arriba descrita con respecto al tipo silvestre.

- 20 El aumento de la expresión génica de los ácidos nucleicos que codifican a las proteínas previamente descritas con respecto al tipo silvestre, se puede realizar igualmente por medio de diversas vías, por ejemplo, por inducción del gen por medio de activadores o como se describió previamente por aumento de la actividad promotora o aumento de la actividad de expresión o por introducción de una o más copias de genes en el microorganismo.

Por aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una proteína se entiende de acuerdo con la invención también la manipulación de la expresión de las proteínas endógenas, propias del microorganismo.

- 25 Es posible, como se describió más arriba, modificar la expresión de las proteínas endógenas por medio de la aplicación de estímulos exógenos. Esto se puede realizar por medio de condiciones fisiológicas especiales, es decir, por la aplicación de sustancias extrañas.

- 30 Para obtener un aumento de la expresión génica, el experto puede recurrir a diversas medidas individuales o en combinación. Así, por ejemplo, se puede aumentar el número de copias de los genes correspondientes, o se puede mutar la región del promotor o de regulación o el sitio de unión ribosómico, que se encuentra corriente arriba del gen estructural. Por medio de promotores inducibles es posible además aumentar la expresión en el transcurso de la producción fermentativa. Por medio de medidas para la prolongación de la vida útil del ARNm se mejora igualmente la expresión. Además se refuerza igualmente la actividad enzimática por medio de la obstaculización de la degradación de la proteína enzimática. Los genes o constructos de genes pueden estar presentes o bien en plásmidos con diferente número de copias o integrados y amplificados en cromosoma. Alternativamente se puede lograr una sobreexpresión de los genes correspondientes por medio de la modificación de la composición del medio y la realización del cultivo.

- 40 El experto podrá encontrar instrucciones al respecto, entre otros, en Martin y col. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), en Guerrero y col. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya y Morinaga (BioTechnology 6, 428-430 (1988)), en Eikmanns y col. (Gene 102, 93-98 (1991)), en la patente europea 0472869, en la patente U.S. 4.601.893, en Schwarzer y Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), en Remscheid y col. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), en LaBarre y col. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), en la solicitud de patente WQ 96/15246, en Malumbres y col. (Gene 134, 15-24 (1993)), en la patente japonesa publicada antes del examen JP-A-10-229891, en Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195, (1998)), en Makrides (Microbiological Reviews 60: 512-538 (1996) y en manuales conocidos de genética y biología molecular.

- 45 Además puede ser ventajoso para la producción de productos de biosíntesis, especialmente L-lisina, L-metionina y L-treonina, suspender, aparte de la expresión y/o el refuerzo de un gen, reacciones colaterales indeseadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", en: "Overproduction of Microbial Products", Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

- 50 En una modalidad preferida, el aumento de la expresión génica de un ácido nucleico que codifica una de las proteínas arriba descritas se realiza por introducción de por lo menos un ácido nucleico que codifica una proteína correspondiente en el microorganismo. La introducción del ácido nucleico puede realizarse en forma cromosómica o extracromosómica, es decir, por aumento del número de copias en el cromosoma y/o una copia del gen sobre un plásmido que se replica en el microorganismo hospedero.

La introducción de ácidos nucleicos se realiza preferentemente, por ejemplo, en forma de un casete de expresión, que contiene los ácidos nucleicos, en forma cromosómica, especialmente por medio del método SacB previamente descrito.

Para ello se puede utilizar en principio cualquier gen, que codifica a una de las proteínas previamente mencionadas.

- 5 Para las secuencias de ácidos nucleicos genómicas de fuentes eucariotas, que contienen intrones, en el caso de que el microorganismo huésped no pueda, o no pueda llevarse a expresar las proteínas correspondientes, preferentemente secuencias de ácidos nucleicos ya procesadas, tienen que utilizarse los ADNc correspondientes.

Ejemplos de los genes correspondientes se indican en las Tablas 1 y 2.

- 10 La reducción de las actividades arriba mencionadas en los microorganismos se realiza preferentemente por medio de por lo menos uno de los siguientes procedimientos:

- introducción de por lo menos una secuencia de ácidos ribonucleicos sentido para la inducción de una co-supresión o de un casete de expresión que garantiza su expresión,

- introducción de por lo menos un factor que liga ADN o proteína contra el correspondiente gen, ARN o proteína o del casete de expresión que garantiza su expresión,

- 15 • introducción de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos viral que produce la degradación del ARN o de un casete de expresión que garantiza su expresión,

- 20 • introducción de por lo menos un constructo para la activación de una pérdida de función, como por ejemplo, la generación de codones de detención o un desplazamiento en el marco de lectura, en un gen, por ejemplo, generando una inserción, delección, inversión o mutación en un gen. Preferentemente se pueden generar mutantes knockout por medio de inserción selectiva en el gen objetivo deseado por recombinación homóloga o introducción de nucleasas específicas de secuencia contra el gen objetivo,

- introducción de un promotor con actividad promotora reducida o una unidad de expresión con actividad de expresión reducida.

- 25 El experto sabe que también se pueden usar otros procedimientos en el marco de la presente invención para la reducción de su actividad o función. Por ejemplo, también puede ser ventajosa la introducción de una variante dominante-negativa de una proteína o un casete de expresión que garantiza su expresión.

- 30 Cada uno de estos procedimientos puede provocar una disminución de la cantidad de proteína, la cantidad de ARNm y/o la actividad de una proteína. También es concebible una aplicación combinada. El experto conoce diversos métodos y estos pueden comprender la obstaculización o la supresión del procesamiento de la proteína, del transporte de la proteína o de su ARNm, la inhibición de la deposición de ribosomas, la inhibición del corte y empalme del ARN, la inducción de una enzima que degrada el ARN y/o la inhibición de la prolongación o terminación de la traducción.

- 35 En el procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de productos de biosíntesis se agrega preferentemente al paso de cultivo de los microorganismos modificados genéticamente del género *Corynebacterium* un aislamiento de los productos de biosíntesis de los microorganismos y/o del caldo de fermentación. Estos pasos pueden realizarse simultáneamente y/o preferentemente después del paso de cultivo.

- 40 Los microorganismos modificados genéticamente del género *Corynebacterium* de acuerdo con la invención pueden ser cultivados en forma continua o discontinua en el procedimiento "batch" (cultivo de a lotes) o en el procedimiento "fed batch" (procedimiento de alimentación) o "repeated fed batch" (procedimiento de alimentación repetida) para la producción de productos de biosíntesis, especialmente L-lisina, L-metionina y L-treonina. Un resumen de los métodos de cultivo conocidos se encuentra en el manual de Chmiel ("Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik" (Tecnología de bioprocesos 1. Introducción a la tecnología de bioprocesos) (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el manual de Storhas ("Bioreaktoren und periphere Einrichtungen" (Bioreactores y dispositivos periféricos) (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)).

- 45 El medio de cultivo a utilizar tiene que cumplir de forma adecuada con los requerimientos de cada cepa. Descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos se encuentran en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington, D.C., EE.UU., 1981).

Estos medios que se pueden utilizar de acuerdo con la invención comprenden comúnmente una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/u oligoelementos.

Fuentes de carbono preferidas son azúcares, como mono-, di- o polisacáridos. Fuentes de carbono muy buenas son, por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Se puede agregar azúcar a los medios también a través de compuestos complejos, como las melazas, u otros subproductos de la refinación de azúcar. También puede ser conveniente agregar mezclas de diversas fuentes de carbono. Otras fuentes de carbono posibles son aceites y grasas como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de maní y grasa de coco, ácidos grasos como por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linólico, alcoholes como por ejemplo, glicerina, metanol o etanol y ácidos orgánicos como por ejemplo, ácido acético o ácido láctico.

Fuentes de nitrógeno son comúnmente compuestos de nitrógenos orgánicos o inorgánicos o materiales que contienen estos compuestos. Fuentes de nitrógeno ilustrativas comprenden gas de amoníaco o sales de amonio, como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno complejas, como licor de maíz empapado, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno pueden utilizarse en forma individual o como mezcla.

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

Como fuente de azufre para la preparación de productos químicos finos, especialmente de metionina, pueden usarse compuestos inorgánicos como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitas, tetratiónatos, tiosulfatos, sulfuros pero también compuestos orgánicos de azufre, como mercaptanos y tioles.

Como fuente de fósforo se pueden usar ácido fosfórico, dihidrógenofosfato de potasio o hidrógenofosfato de dipotasio o las sales correspondientes que contienen sodio.

Se pueden agregar al medio formadores de quelatos para mantener en solución a los iones metálicos. Formadores de quelatos especialmente adecuados comprenden dihidroxifenoles, como catecol o protocatecolato, o ácidos orgánicos, como ácido cítrico.

Los medios de fermentación usados de acuerdo con la invención contienen comúnmente también otros factores de crecimiento, como vitaminas o estimulantes del crecimiento, entre los cuales se encuentran biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales provienen frecuentemente de componentes de medios complejos, como extracto de levadura, melazas, licor de maíz empapado, y similares. Al medio de cultivo se pueden agregar además precursores adecuados. La composición exacta de los compuestos de los medios depende mucho de cada experimento y se decide para cada caso específico individualmente. Información sobre la optimización se puede obtener del manual "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Ed. P. M. Rhodes, P. F. Stanbury, IRL Press (1997), págs. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Los medios de cultivo se pueden obtener también de proveedores comerciales, como Standard 1 (Merck) o BHI (Brain heart infusion, DIFCO) y similares.

Todos los componentes de medios son esterilizados o bien por calor (20 min a 1,5 bar y 121°C) o por filtración estéril. Los componentes pueden ser esterilizados o bien juntos o en caso necesario separadamente. Todos los componentes de los medios pueden estar presentes al comienzo del cultivo o pueden ser agregados a elección en forma continua o de a lotes.

La temperatura del cultivo se encuentra normalmente entre 15°C y 45°, preferentemente a 25°C hasta 40°C y puede mantenerse constante durante el experimento o ser modificada. El valor de pH del medio debería estar en el rango de 5 a 8,5, preferentemente alrededor de 7,0. El valor de pH para el cultivo se puede controlar durante el cultivo por medio de la adición de compuestos básicos como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco y/o agua de amoníaco o compuestos ácidos como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control del desarrollo de espuma pueden usarse agentes antiespumantes, como por ejemplo, poliglicoléster de ácido graso. Para mantener la estabilidad de plásmidos se pueden agregar al medio sustancias adecuadas que actúan selectivamente en el medio como, por ejemplo, antibióticos. Para mantener condiciones aerobias se pueden introducir en el cultivo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, tales como, por ejemplo, aire ambiente. La temperatura del cultivo se encuentra normalmente a 20°C hasta 45° C. El cultivo se continúa hasta que se ha formado un máximo del producto deseado. Este objetivo se logra normalmente dentro de las 10 horas hasta 160 horas.

Los caldos de fermentación así obtenidos tienen comúnmente una masa seca de 7,5 a 25% en peso.

También es ventajoso cuando la fermentación se realiza con limitación de azúcar por lo menos al final, especialmente sin embargo por lo menos durante el 30% de la duración de la fermentación. Es decir que durante este tiempo se mantiene la concentración de azúcar utilizable en el medio de fermentación de 0 a 3 g/l, y/o se disminuye.

- 5 El aislamiento de productos de biosíntesis a partir del caldo de fermentación y/o de los microorganismos se realiza de manera conocida de acuerdo con propiedades físico-químicas del producto de valor biosintético y de los subproductos biosintéticos.

10 El caldo de fermentación puede seguir siendo procesado, por ejemplo, a continuación. Según el requerimiento, la biomasa puede ser retirada total o parcialmente mediante métodos de separación como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos métodos, del caldo de fermentación o puede ser dejado en el mismo completamente.

15 A continuación se puede espesar y/o concentrar el caldo de fermentación con métodos conocidos, como por ejemplo, con ayuda de un evaporador rotativo, un evaporador de capa delgada, un evaporador molecular por gravedad, por ósmosis inversa, o por nanofiltración. Este caldo de fermentación concentrado puede ser procesado a continuación por secado por congelamiento, secado por rociado, granulación por rociado o por medio de otros procedimientos.

20 También es posible, sin embargo, seguir purificando los productos de biosíntesis, especialmente L-lisina, L-metionina y L-treonina. Para ello se somete el caldo que contiene el producto, después de la separación de la biomasa, a una cromatografía con una resina adecuada, en donde se retiene total o parcialmente el producto deseado o las impurificaciones en la resina de la cromatografía. Estos pasos de cromatografía pueden repetirse si es necesario, y pueden utilizarse las mismas resinas u otras resinas de cromatografía. El experto conoce la selección de las resinas de cromatografía adecuadas y su uso más efectivo. El producto purificado puede ser concentrado por filtración o ultrafiltración, y puede ser guardado a una temperatura a la cual es máxima la estabilidad del producto.

25 Los productos de biosíntesis pueden precipitar en formas diferentes, por ejemplo, en forma de sus sales o ésteres.

30 La identidad y pureza del o de los compuestos aislados puede ser determinada por medio de técnicas del estado de la técnica. Estas comprenden cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), procedimientos espectroscópicos, procedimientos de tinturado, cromatografía de capa delgada, NIRS, pruebas enzimáticas o pruebas microbiológicas. Estos procedimientos de análisis se resumen en: Patek y col., (1994), Appl. Environ. Microbiol. 60: 133-140; Malakhova y col. (1996), Bioteknologiya 11, 27-32; y Schmidt y col. (1998) Bioprocess Engineer. 19: 67-70; Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996), Vol. A27, VCH: Weinheim, págs. 89-90, págs. 521-540, págs. 540-547, págs. 559-566, 575-581 y págs. 581-587; Michal, G. (1999), "Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology", John Wiley and Sons; Fallon, A. y col. (1987), "Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology", Vol. 17.

35 La invención se describe con mayor detalle por medio de los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1

Preparación del vector pCLiK5MCS

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

40 SEQ ID NO: 5

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGCGCCGGCCGGCCGGTGTGAAATACCGCACA
G-3'

SEQ ID NO: 6

5'-TCTAGACTCGAGCGGCGCGCCGGCCGCTTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTC
G-3'

Aparte de las secuencias complementarias a pBR322, el cebador de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 5 contiene en dirección 5'-3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción SmaI, BamHI, NheI y Ascl y el cebador de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 6 en dirección 5' 3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción XbaI, XhoI, NotI y DraI. La reacción de PCR se realizó según métodos estándar como Innis y col. ("PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications", Academic Press (1990)) con Pfu Turbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). El fragmento de ADN obtenido con un tamaño de aprox. 2,1 kb se purificó con el equipo GFX™pCR, ADN y Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. Los extremos romos del fragmento de ADN fueron ligados entre sí con el equipo Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según instrucciones del fabricante y el resultado de la ligadura fue transformado según métodos estándar como se describen en Sambrook y col. ("Molecular cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, (1989)) en E. coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, EE. UU.). Se logró una selección sobre células portantes de plásmidos por medio de la extensión sobre placas de LB agar que contenían ampicilina (50 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

El ADN plásmido de un clon individual fue aislado con el equipo Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según instrucciones del fabricante y se verificó a través de digestión de restricción. El plásmido así obtenido obtiene el nombre pCLiK1.

Partiendo del plásmido pWLT1 (Liebl y col., 1992) como plantilla para una reacción de PCR se amplificó con los cebadores de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 7 y SEQ. ID. NO: 8 un casete de resistencia a la kanamicina.

SEQ ID NO: 7:

5'-GAGATCTAGACCCGGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO: 8:

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

Aparte de las secuencias complementarias a pWLT1, el cebador de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 7 contiene en dirección 5' 3' los sitios de corte para las endonucleasas XbaI, SmaI, BamHI, NheI y el cebador de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 8 en dirección 5' -3' los sitios de corte para las endonucleasas de restricción Ascl y NheI. La reacción de PCR se realizó según métodos estándar como Innis y col. ("PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications", Academic Press (1990)) con Pfu Turbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). El fragmento de ADN obtenido con un tamaño de aprox. 1,3 kb se purificó con el equipo GFX™pCR, DNA y Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN fue cortado con endonucleasas de restricción XbaI y Ascl (New England Biolabs, Beverly, EE.UU.) y purificado a continuación nuevamente con el equipo GFX™pCR, DNA y Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia; Freiburg) según instrucciones del fabricante. El vector pCLiK1 también fue cortado con las endonucleasas de restricción XbaI y Ascl y desfosforilado con fosfatasa alcalina (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) según instrucciones del fabricante. Después de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (aprox. 2,1 kb) con el equipo GFX™pCR, DNA y Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del equipo Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según instrucciones del fabricante con el fragmento de PCR cortado y el resultado de la ligadura se transformó según métodos estándar como se describe en Sambrook y col. ("Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, (1989)) en E. coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla / EE. UU.). Se logró una selección sobre células portantes de plásmidos por medio de la extensión sobre placas de LB agar que contenían ampicilina (50 µg/ml) y kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

El ADN plásmido de un clon individual fue aislado con el equipo Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según instrucciones del fabricante y se examinó a través de digestión de restricción. El plásmido así obtenido obtiene el nombre pCLiK2.

El vector pCLiK2 fue cortado con la endonucleasa de restricción DraI (New England Biolabs, Beverly, EE. UU.). Después de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló un fragmento de vector de aprox. 2,3 kb con el equipo GFX™pCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del equipo Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según instrucciones del fabricante con el fragmento de PCR cortado y el resultado de la ligadura se transformó según métodos estándar como se describen en Sambrook y col., Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (1989)), en E.coli XL- 1Blue competente (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Se logró una selección sobre células portantes de plásmidos por medio de la extensión sobre placas de LB agar que contenían kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

El ADN plásmido de un clon individual fue aislado con el equipo Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según instrucciones del fabricante y se verificó a través de digestión de restricción. El plásmido así obtenido obtiene el nombre pCLiK3.

5 Partiendo del plásmido pWLQ2 (Liebl y col., 1992) como plantilla para una reacción de PCR, con los cebadores de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 9 y SEQ. ID. NO: 10 se amplificó el origen de replicación pHM1519.

SEQ ID NO: 9:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO: 10:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

10 Aparte de las secuencias complementarias a pWLQ2, los cebadores de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 9 y SEQ. ID. NO: 10 contienen los sitios de corte para la endonucleasa de restricción NotI. La reacción de PCR se realizó según métodos estándar como Innis y col. ("PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications", Academic Press (1990)) con Pfu Turbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). El fragmento de ADN obtenido con un tamaño de aprox. 2,7 kb se purificó con el equipo GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. El fragmento de ADN fue cortado con la endonucleasa de restricción NotI (New England Biolabs, Beverly, EE.UU.) y purificado a continuación nuevamente con el equipo GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. El vector pCLiK3 también fue cortado con la endonucleasa de restricción NotI y desfosforilado con fosfatasa alcalina (I (Roche Diagnostics (Mannheim)) según instrucciones del fabricante. Después de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (aprox. 2,3 kb) con el equipo GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del equipo Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics (Mannheim)) según instrucciones del fabricante con el fragmento de PCR cortado y el resultado de la ligadura se transformó según métodos estándar como se describe en Sambrook y col. ("Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, (1989)) en E. coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Se logró una selección sobre células portantes de plásmidos por medio de la extensión sobre placas de LB agar que contenían kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

El ADN plásmido de un clon individual fue aislado con el equipo Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según instrucciones del fabricante y se verificó a través de digestión de restricción. El plásmido así obtenido obtiene el nombre pCLiK5.

30 Para la amplificación de pCLiK5 con un "multiple cloning site" (MCS) se unieron los dos oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 11 y SEQ. ID. NO:12 sintéticos, complementarios en gran parte, los que contienen sitios de corte para las endonucleasas de restricción SmaI, XhoI, AatI, ApaI, Asp718, MluI, NdeI, SpeI, EcoRV, SalI, ClaI, BamHI, XbaI y SmaI, por medio de un calentamiento en común a 95°C y enfriamiento lento a un fragmento de ADN bicatenario.

SEQ ID NO: 11:

5'-TCGAATTTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCCGGTACCACGCGTCATAT
GACTAGTTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTT-
35 CTGCGTTAATTAACAATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

SEQ ID NO: 12:

5'-GATCATTTTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCCAATTGTTAATTAACGCAGAAGAG
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAAGTATCATATGACGCGTGGTAC-
CGGGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTTAAAT-3'

40 El vector pCLiK5 fue cortado con las endonucleasas de restricción XhoI y BamHI (New England Biolabs, Beverly, EE.UU) y desfosforilado con fosfatasa alcalina (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) según instrucciones del fabricante. Después de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% se aisló el vector linealizado (aprox. 0,5 kb) con el equipo GFX™PCR/ DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. Este fragmento de vector se ligó con ayuda del equipo Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según instrucciones del fabricante con el fragmento de ADN bicatenario, sintético, y el resultado de la ligadura se transformó según métodos estándar, tal como se describe en Sambrook y col. ("Molecular Cloning. A

Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, (1989)) en E. coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Se logró una selección sobre células portantes de plásmidos por medio de la extensión sobre placas de LB agar que contenían kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

5 El ADN plásmido de un clon individual fue aislado con el equipo Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) según instrucciones del fabricante y se verificó a través de digestión de restricción. El plásmido así obtenido obtiene el nombre pCLiK5MCS.

Las reacciones de secuenciación se realizaron según Sanger y col. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU. 74:5463-5467. Las reacciones de secuenciación se separaron y evaluaron por medio de ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

10 El plásmido pCLiK5MCS que se obtuvo se indica como SEQ ID NO: 13.

Ejemplo 2

Preparación del plásmido PmetA metA

15 El ADN cromosómico de C. glutamicum ATCC 13032 fue preparado según Tauch y col. (1995), Plasmid 33: 168-179 o Eikmanns y col. (1994), Microbiology 140: 1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 14 y SEQ. ID. NO: 15, el ADN cromosómico como plantilla y la Pfu Turbo Polymerase (empresa Stratagene) se amplificó un gen metA de la región 5' no codificadora con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar, como se describe en Inni s y col. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press.

SEQ ID NO 14

20 5'-GCGCGGTACCTAGACTACCCAGTGCT -3'

y

SEQ ID NO 15

5'-CTCTACTAGTTTAGATGTAGAACTCGATGT-3'

25 El fragmento de ADN obtenido de aprox. 1,3 kb de tamaño fue purificado con el equipo GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante. A continuación se disoció con las enzimas de restricción Asp718 y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) y el fragmento de ADN se purificó con GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

30 El vector pCLiK5MCS SEQ ID NO: 13 fue cortado con las enzimas de restricción Asp718 y SpeI y se aisló un fragmento de 5 kb después de la separación electroforética con equipo GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

35 El fragmento de vector fue ligado junto con el fragmento de PCR con ayuda del equipo Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según instrucciones del fabricante y el resultado de la ligadura se transformó según métodos estándar como se describe en Sambrook y col. ("Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, (1989)) en E. coli XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Se logró una selección sobre células portantes de plásmidos por medio de la extensión sobre placas de LB agar que contenían kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

40 La preparación del ADN plásmido se realizó según métodos y con materiales de la firma Quiagen. Las reacciones de secuenciación se realizaron según Sanger y col. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. Las reacciones de secuenciación se separaron y evaluaron por medio de ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

El plásmido obtenido pCLiK5MCS PmetA metA se indica como SEQ ID NO: 16.

Ejemplo 3

Preparación del plásmido pCLiK5MCS P EF-TU metA

Se preparó ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC 13032 según Tauch y col. (1995), Plasmid 33: 168-179 o Eikmanns y col. (1994), Microbiology 140: 1817-1828. Con los cebadores de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 17 y SEQ. ID. NO: 18, el ADN cromosómico como plantilla y la Pfu Turbo Polymerase (Stratagene) se amplificó un fragmento de ADN de aprox. 200 pares de bases de la región 5' no codificadora (región promotora) de la superóxido-dismutasa (Psod) con ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) según métodos estándar, como se describe en Innis y col. (1990) "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications", Academic Press.

SEQ ID NO 17

5'-GAGACTCGAGGGCCGTTACCCTGCGAATG -3'

y

SEQ ID NO 18

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATTGTATGTCCTCCTGGAC -3'

El fragmento de ADN obtenido fue purificado con el equipo GFX™pCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante.

Partiendo del plásmido PmetA metA SEQ. ID. NO: 16 como plantilla para una reacción de PCR se amplificó con los cebadores de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 19 y SEQ. ID. NO: 20 una parte de metA.

SEQ ID NO 19

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

y

SEQ ID NO 20

5'-CTGGGTACATTGCGGCCC -3'

El fragmento de ADN obtenido de aproximadamente 470 pares de bases se purificó con equipo GFX™pCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) según instrucciones del fabricante.

En otra reacción de PCR se usaron los dos fragmentos obtenidos más arriba juntos como plantilla. Por las secuencias homólogas a metA, introducidas con el cebador de oligonucleótido SEQ. ID. NO: 18, se produce en la reacción de PCR una deposición de ambos fragmentos uno al lado del otro y una prolongación a una hebra de ADN continua por la polimerasa usada. El método estándar se modificó de tal modo que los cebadores de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 17 y SEQ. ID. NO: 20 usados recién se agregaron a la mezcla de reacción al comienzo del 2do. ciclo.

El fragmento de ADN amplificado de aproximadamente 675 pares de bases fue purificado con el equipo GFX™pCR, DNA and Gel Band Purification Kit según instrucciones del fabricante. A continuación se disoció con las enzimas de restricción XhoI y NcoI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se separó por electroforesis en gel. A continuación se purificó el fragmento de ADN de aprox. 620 pares de bases con el equipo GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) de agarosa. El plásmido PmetA metA SEQ. ID. NO: 16 fue dividido con las enzimas de restricción NcoI y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim). Después de la separación por electroforesis en gel se purificó un fragmento metA de aprox. 0,7 kb con el equipo GFX™pCR, DNA and Gel Band Purification Kit de agarosa.

El vector pClik5MCS SEQ. ID. NO: 13 fue cortado con las enzimas de restricción XhoI y SpeI (Roche Diagnostics, Mannheim) y se aisló un fragmento de 5 kb después de la separación electroforética con el equipo GFX™MPCR, DNA and Gel Band Purification Kit.

El fragmento de vector se ligó con el fragmento de PCR y el fragmento metA con ayuda del equipo Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) según instrucciones del fabricante y el resultado de la ligadura se transformó según métodos estándar como se describe en Sambrook y col. ("Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor, (1989)) en *E. coli* XL-1Blue competente (Stratagene, La Jolla, EE. UU.). Se logró una selección sobre células portantes de plásmidos por medio de la extensión sobre placas de LB agar que contenían kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, Virology, 1: 190).

La preparación del ADN plásmido se realizó según métodos y con materiales de la firma Quiagen. Las reacciones de secuenciación se realizaron según Sanger y col. (1977 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463 5467. Las reacciones de secuenciación se separaron y evaluaron por medio de ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt).

- 5 El plásmido obtenido pCLiK5MCS P_EFTUmetA se indica como SEQ ID NO: 21.

Ejemplo 4

Actividades MetA

- 10 La cepa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 fue transformada en cada caso con los plásmidos pClik5 MCS, pClik MCS PmetA metA y pCLiK5MCS P EF-TU metA según el método descrito (Liebl y col. (1989) FEMS Microbiology Letters 53: 299-303). La mezcla de transformación se colocó en placas CM que contenían adicionalmente 20 mg/l de kanamicina para alcanzar una selección sobre células que contenían plásmidos. Los clones resistentes a Kan obtenidos fueron removidos y separados.

- 15 Las cepas de *C. glutamicum*, que contenían uno de estos constructos de plásmidos fueron cultivadas durante la noche a 30°C en medio MMA ((40 g/l de sacarosa, 20 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de K₂HPO₄, 0,25g/l de MgSO₄ x 7H₂O, 54 g de Aces, 1 ml de CaCl₂ (10 g/l), 1 ml de protocatecoato (300 mg/10 ml), 1 ml de oligoelementos (10 g/l de FeSO₄ x H₂O, 10 g/l MnSO₄ x H₂O, 2 g/l de ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/l de CuSO₄, 0,02 g/l de NiCl₂ x 6 H₂O), 100 mg/l de vitamina B₁₂, 0,3 mg/l de tiamina, 1 mM de leucina, 1 mg/l de piridoxal HCl, 1 ml de biotina (100 mg/l), pH 7,0). Las células fueron centrifugadas a 4°C y lavadas dos veces con amortiguador Tris-HCl frío (0,1%, pH 8,0). Después de volver a centrifugar se tomaron las células en amortiguador Tris-HCl frío (0,1%, pH 8,0) y se ajustó una OD₆₀₀ de 160. Para la ruptura de las células se introdujo 1 ml de esta suspensión celular en tubos de ensayo para ribólisis de 2 ml de la firma Hybaid y se lisaron en un ribolizador de la firma Hybaid con un ajuste de rotación de 6,0 tres veces durante 30 seg cada vez. El lisado se aclaró por medio de una centrifugación durante 30 minutos a 15.000 rpm a 4°C en una centrifugadora Eppendorf y el sobrenadante se introdujo en un nuevo recipiente de Eppendorf. El contenido de proteína se determinó según Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254.

- 25 La actividad enzimática de MetA se realizó como sigue. Las mezclas de reacción de 1 ml contenían 100 mM de amortiguador fosfato de potasio (pH 7,5), 5 mM de MgCl₂, 100 µl de acetil CoA, 5 mM de L-homoserina, 500 µM de DTNB (reactivo de Ellmans) y extracto celular. La prueba se inició por adición del lisado de proteína correspondiente y se incubó a temperatura ambiente. Se tomó luego en una Kinetig a 412 nm por 10 min.

Los resultados se muestran en la Tabla 1a.

- 30 Tabla 1a

Cepa	Actividad específica [nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS PmetA metA	50,7
ATCC 13032 pClik5MCSP EF-TU metA	98,4

La actividad de MetA pudo ser aumentada notablemente por medio del uso de la unidad de expresión heteróloga.

Ejemplo 5

Construcción de plásmido pCIS lysC

- 35 En el primer paso de la construcción de la cepa se realizó un intercambio alélico del gen de tipo silvestre lysC en *C. glutamicum* ATCC 13032. Para ello se realizó en el gen lysC un intercambio de nucleótidos, de tal modo que en la proteína resultante el aminoácido Thr en la posición 311 fue intercambiado por un Ile. Partiendo del ADN cromosómico de ATCC 13032 como plantilla para una reacción PCR se amplificó con los cebadores de oligonucleótidos SEQ. ID. NO: 22 y SEQ. ID. NO: 23 lysC con ayuda del sistema Pfu-Turbo PCR Systems (Stratagene, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC 13032 se preparó según Tauch y col. (1995) Plasmid 33: 168-179 o Eikmanns y col. (1994) Microbiology 140: 1817-1828. El fragmento amplificado es flanqueado en su extremo 5' por un corte de restricción Sall y en su extremo 3' por un corte de restricción MluI. Antes de la clonación se digirió el fragmento amplificado por estas dos enzimas de restricción y se purificó con el equipo GFX™pCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg).

SEQ ID NO:22

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC-3'

SEQ ID NO:23

5'-CTCTCTCTGTCTGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'

- 5 El polinucleótido obtenido se clonó a través de los cortes de restricción Sall y MluI en pCLIK5 MCS integrativo SacB, denominado en lo sucesivo pCIS (SEQ. ID. NO: 24) y se transformó en *E. coli* XL-1 blue. Se logró una selección de células portadoras de plásmidos por medio de la extensión en placas sobre agar LB que contenía kanamicina (20 µg/ml) (Lennox, 1955, virology, 1:190). El plásmido fue aislado y se confirmó la secuencia de nucleótidos esperada por medio de secuenciación. La preparación del ADN plásmido se realizó según métodos y con materiales de la firma Quiagen. Las reacciones de secuenciación se realizaron según Sanger y col. (1977), Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74: 5463-5467. Las reacciones de secuenciación se separaron y evaluaron por medio de ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt). El plásmido pCIS lysC obtenido se indica como SEQ. ID. NO: 25.

Ejemplo 6

Mutagénesis del gen *lysC* de *C. glutamicum*

- 15 La mutagénesis selectiva del gen *lysC* de *C. glutamicum* se realizó con el Quick-Change Kit (firma Stratagene/EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La mutagénesis se realizó en el plásmido pCIS lysC, SEQ. ID. NO: 25. Para el intercambio de thr 311 hacia 311 ile con ayuda del método Quickchange (Stratagene) se sintetizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

SEQ ID NO:26

- 20 5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG-3'

SEQ ID NO:27

5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG-3'

- 25 El uso de estos cebadores de oligonucleótidos en la reacción Quickchange lleva en el gen *lysC* SEQ. ID. NO: 28 a un intercambio del nucleótido en la posición 932 (de C hacia T). El intercambio de aminoácidos resultante Thr311Ile en el gen *lysC* se confirmó después de la transformación en *E. coli* XL1-blue y la preparación del plásmido por medio de reacciones de secuenciación. El plásmido obtuvo la denominación pCIS lysC thr311ile y se indica como SEQ. ID. NO: 29.

- 30 El plásmido pCIS lysC thr311ile se transformó en *C. glutamicum* ATCC 13032 por medio de electroporación como se describió en Liebl y col. (1989) FEMS Microbiology Letters 53: 299-303. Las modificaciones del protocolo se describen en la DE 10046870. El ordenamiento cromosómico del locus *lysC* de transformantes individuales se examinó con los métodos estándar por transferencia Southern e hibridación como se describe en Sambrook y col. (1989), "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor. De este modo se aseguró que los transformantes eran aquellos que integraron el plásmido transformado por recombinación homóloga en el locus *lysC*. Después del crecimiento de estas colonias durante la noche en medios que no contienen antibiótico, se colocan las células en placas en un medio de sacarosa-CM-agar (10 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de carne, 5 g/l de extracto de levadura, 2,5 g/l de NaCl, 2 g/l de urea, 1% de glucosa, 10% de sacarosa, pH 6,8) y se incuban a 30 °C durante 24 horas. Como el gen *sacB* que contiene el vector pCIS lysC thr311ile transforma a la sacarosa en un producto tóxico, sólo pueden crecer aquellas colonias que delecionaron al gen *sacB* por un segundo corte de recombinación homólogo entre el gen *lysC* de tipo silvestre y el gen *lysC* thr311ile mutado. Durante la recombinación homóloga se puede delecionar o bien el gen de tipo silvestre o el gen mutado junto, con el gen *sacB*. Cuando se remueve el gen *sacB* junto con el gen de tipo silvestre, resulta un transformante mutado.

- 45 Se tomaron colonias que crecían y se examinaron con respecto a un fenotipo sensible a la kanamicina. Los clones con gen *SacB* delecionado tienen que demostrar simultáneamente un comportamiento de crecimiento sensible a la kanamicina. Esos clones sensibles a Kan fueron examinados en un matraz de agitación con respecto a su productividad de lisina (ver Ejemplo 6). Para la comparación se cultivó el *C. glutamicum* ATCC 13032 no tratado. Se seleccionaron clones con una producción de lisina aumentada con respecto a los controles, se obtuvieron ADN cromosómicos y la región correspondiente del gen *lysC* se amplificó y secuenció por una reacción PCR. Un clon como éste con la propiedad de una síntesis aumentada de lisina y mutación confirmada en *lysC* en la posición 932 se denominó ATCC 13032 *lysC*^{thr}.

Ejemplo 7

Preparación de un plásmido de integración para la sobreexpresión del gen *lysC* con ayuda de la unidad de expresión heteróloga *Peftu* (SEQ. ID. 2).

- 5 Para la amplificación del promotor del gen, que codifica para el factor de alargamiento *Tu*, se definieron los siguientes oligonucleótidos.

SEQ ID:30

CK 352: 5'-CGCCAATTGTGGCCGTTACCCTGCGAATG-3'

SEQ ID :31

CK 353: 5'-TTCTGTACGACCAGGGCCACTGTATGTCCTCCTGGACTTC-3'

- 10 Los cebadores se usaron en una reacción PCR con ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC 13032. Con esta mezcla se pudo amplificar un fragmento de ADN que correspondía al tamaño esperado de aprox. 200 bp.

Para la amplificación del gen, que codifica para la aspartatoquinasa, se definieron los siguientes oligonucleótidos.

SEQ ID:32

CK 354: 5'-GAAGTCCAGGAGGACATACAGTGGCCCTGGTCGTACAGAA-3'

- 15 SEQ ID:33

CK 355: 5'-CATGCCCGGGACAGCAGCAAGTTCCAGCAT-3'

Los cebadores se usaron en una reacción PCR con ADN cromosómico de *C. glutamicum* ATCC 13032 *lysC^{fbr}*. Con esta mezcla se pudo amplificar un fragmento de ADN que correspondía al tamaño esperado de aprox. 620 bp.

- 20 Los cebadores CK 354 y CK 353 contienen una secuencia que se superpone y son homólogos entre sí en los extremos 5'.

Los productos de PCR arriba obtenidos se usaron como plantilla para otra PCR, en la que se usaron los cebadores CK 352 y CK 355.

Con esta mezcla se pudo amplificar un fragmento de ADN que correspondía al tamaño de aprox. 820 bp esperado. Esta fusión *Peftu/lysC^{fbr}* fue cortada con las enzimas de restricción *MunI* y *SmaI*.

- 25 Para la amplificación de una región 5' del gen *lysC* se definieron los siguientes oligonucleótidos:

SEQ ID :34

CK 356: 5'-CGCGACGTCCGTCCCAAACGATCATGAT-3'

SEQ ID :35

CK 357: 5'-CGCCAATTGCTTTGTGCACCTTTGATCT-3'

- 30 Los cebadores se usaron en una reacción PCR con ADN cromosómico de *C. glutamicum*. Con esta mezcla se pudo amplificar un fragmento de ADN que correspondía al tamaño esperado de aprox. 600 bp. Este fragmento de ADN se digirió con las enzimas de restricción *AatII* y *MunI*. Este fragmento y la fusión digerida *Peftu/lysC^{fbr}* fueron clonados a continuación en el vector *pCIS*, el cual había sido digerido antes con las enzimas de restricción *AatII* y *SmaI*. El plásmido resultante se denominó *pCIS Peftu lysC^{fbr}* (SEQ. ID. NO: 36). Hasta este paso se realizaron todas las clonaciones en *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos).
- 35

Con el plásmido de transformación *pCIS Peftu lysC^{fbr}* se transformó luego *E. coli* Mn522 (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) junto con el plásmido *pTc15AcgIM* según Liebl y col. (1989) *FEMS Microbiology Letters* 53: 299-303. El plásmido *ptc15AcgIM* posibilita la metilación de ADN según el modelo de metilación de *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Mediante este paso se posibilita una electroporación subsiguiente de *Corynebacterium*

glutamicum con el plásmido de integración pCIS Peftu lysC^{fb}. De esta electroporación y la selección subsiguiente sobre placas CM con kanamicina (25 µg/ml) se obtuvieron varios transconjugados. Para la selección sobre el segundo evento de recombinación, que tiene que llevar a la escisión del vector junto con el promotor lysC y el gen lysC, se cultivaron estos transconjugados en medio CM durante la noche sin kanamicina y a continuación se colocaron en placas CM con 10% de sacarosa para la selección. El gen sacB presente en el vector pCIS codifica para la enzima levanosucrasa y cuando se cultiva sobre sacarosa, conduce a la síntesis de levano. Como el levano es tóxico para el *C. glutamicum*, sólo las células de *C. glutamicum*, que perdieron el plásmido de integración por el segundo paso de recombinación, pueden crecer en medio que contiene sacarosa (Jäger y col., Journal of Bacteriology 174 (1992), 5462-5466). Se examinaron 150 clones resistentes a la sacarosa con respecto a su resistencia a kanamicina. Para 56 de los clones probados se pudo determinar aparte de la resistencia con respecto a sacarosa también una sensibilidad con respecto a kanamicina. Se examinó también si se había realizado el intercambio deseado del promotor natural por el promotor Peftu, por medio de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Para este análisis se aisló ADN cromosómico de la cepa de partida y se aislaron 20 clones. Para ello se tomaron los clones correspondientes con un palillo de dientes de la placa de agar y se suspendieron en 100 µl de H₂O y se llevaron a ebullición a 95°C durante 10 minutos. Se usaron en la PCR en cada caso 10 µl de la solución obtenida como plantilla. Como cebador se usaron oligonucleótidos que son homólogos al promotor Peftu y al gen lysC. Las condiciones de la PCR se seleccionaron como sigue: desnaturalización previa: 5 min a 95°C; desnaturalización durante 30 seg a 95°C, hibridación durante 30 seg a 55°C; amplificación durante 2 min a 72°C, 30 ciclos, extensión final durante 5 minutos a 72°C. En la mezcla con el ADN de la cepa de partida no pudo obtenerse ningún producto de PCR por la selección de los oligonucleótidos. Sólo en clones que habían realizado en la 2da. recombinación el intercambio del promotor natural (PlysC) por el Peftu, se esperaba una banda con un tamaño de 552 bp. En total, de los 20 clones probados, 3 clones eran positivos.

Ejemplo 8

Ensayo de aspartoquinasa (lysC)

Las cepas de *C. glutamicum*, que contenían o bien una copia cromosómica del gen lysC^{fb} con el promotor natural o una copia cromosómica del constructo Peftu lysC^{fb}, fueron cultivados en el medio CM (10 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de carne, 5 g/l de extracto de levadura, 2,5 g/l de NaCl, 2 g/l de urea, 1% de glucosa, pH 6,8) a 30 °C hasta una OD₆₀₀ de 8. Las células fueron centrifugadas a 4 °C y lavadas dos veces con amortiguador Tris-HCl frío (0,1%, pH 8,0). Después de volver a centrifugar se tomaron las células en amortiguador Tris-HCl frío (0,1%, pH 8,0) y se ajustó una OD₆₀₀ de 160. Para la ruptura de las células se introdujo 1 ml de esta suspensión celular en tubos de ensayo para ribólisis de 2 ml de la firma Hybaid y se lisaron en un ribolizador de la firma Hybaid con un ajuste de rotación de 6,0 tres veces durante 30 seg cada vez. El lisado se aclaró por medio de una centrifugación durante 30 minutos a 15.000 rpm a 4°C en una centrifugadora Eppendorf y el sobrenadante se introdujo en un nuevo recipiente de Eppendorf. El contenido de proteína se determinó según Bradford, M. M. (1976) Anal. Biochem. 72: 248-254.

La actividad enzimática de la aspartoquinasa se realizó como sigue. Las mezclas de reacción de 1 ml que contenían 100 mM de tampón Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM de MgCl₂, 600 mM de hidroxilamina-HCl (pH 7,0 con 10 N KOH), 4 mM de ATP, 200 mM de aspartato (sal sódica) y H₂O en 1 ml se incubaron durante 10 min a 30°C. La prueba se inició por adición del lisado de proteína correspondiente y se incubó a 30°C durante 30 min. Para detener la reacción se agregó a la mezcla de reacción 1 ml de la solución de detención (10% de cloruro de hierro, 3,3% de ácido tricloroacético, 0,7 N de NaCl). Después de un paso de centrifugación se midió la OD₅₄₀ del sobrenadante. Una unidad corresponde a 1 nmol de aspartato hidroxamato, que se forma por mg de proteína por minuto.

Los resultados se muestran en la Tabla 2a.

Tabla 2a	
Cepa	Actividad específica [nmol/mg/min]
ATCC 13032 lysC ^{fb}	19,3
ATCC 13032 Peftu lysC ^{fb}	49,37

La actividad de la aspartoquinasa pudo ser aumentada 2,5 veces por la integración del constructo Peftu lysC^{fb} en el cromosoma.

Ejemplo 9

Producción de lisina

Para examinar el efecto del constructo Peftu lysC^{fb} sobre la producción de lisina se colocaron las cepas ATCC 13032, ATCC 13032 lysC^{fb} y ATCC 13032 Peftu lysC^{fb} sobre placas CM (10,0 g/l de D-glucosa, 2,5 g/l de NaCl, 2,0 g/l de urea, 10,0 g/l de Bacto Pepton (Difco), 5,0 g/l de extracto de levadura (Difco), 5,0 g/l de extracto de carne

(Difco), 22,0 g/l de agar (Difco), se colocó en autoclave (20 min, 121°C)), y se cultivó durante 2 días a 30°C. A continuación se rasparon las células de la placa y se volvieron a suspender en solución salina. Para el cultivo principal se inyectaron 10 ml de medio I y 0,5 g de CaCO₃ que se había colocado en autoclave (Riedel de Haen) en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con la suspensión celular hasta una OD₆₀₀ de 1,5 y se incubó durante 39 hs en uno del tipo Infors AJ118 (Infors, Bottmingen, Suiza) a 220 rpm. A continuación se determinó la concentración de la lisina excretada en el medio.

Medio I:

40g/l Sacarosa

60g/l Melasa ((calculada con respecto a un contenido de azúcar de 100 %)

10 10g/l (NH₄)₂SO₄

0.4g/l MgSO₄*7H₂O

0.6g/l KH₂PO₄

0.3mg/l Tiamina*HCl

1mg/l Biotina (de una solución stock de 1 mg/ml filtrada en forma estéril que fue ajustada con NH₄OH a pH 8,0)

15 2mg/l FeSO₄

2mg/l MnSO₄

Ajustado con NH₄OH a pH 7,8, colocado en autoclave (121°C, 20 min).

Adicionalmente se agrega vitamina B12 (hidroxicobalamina Sigma Chemicals) de una solución stock (200 µg/ml, filtrada en forma estéril) hasta una concentración final de 100 µg/l.

20 La determinación de la concentración de aminoácidos se realizó por medio de cromatografía líquida de alta presión según Agilent en una Agilent 1100 Series LC System HPLC.

Una derivación de columna previa con orto-ftalaldehído permite la cuantificación de los aminoácidos formados, la separación de la mezcla de aminoácidos se realiza en una columna Hypersil AA (Agilent).

El resultado del examen se presenta en la Tabla 3a.

25

Tabla 3a

Cepa	L-Lisina (g/l)
ATCC13032	0
ATCC13032 lysCfbr	10,15
ATCC13032 Peftu lysCfbr	13,2

Lista de secuencias

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> P EF-TU-Unidades de expresión

30 <130> PF 55183/Mec

<140> 20030320

<141>

<160> 42

<210> 1

ES 2 439 946 T3

<211> 186

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

5 <223> EFTU\RXA01284\PROMOTOR

<400> 1

```
ggccggttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaaatcaa cgccgttgcc 60
cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct cagtcttcca 120
ggctgcttat cacagtgaaa gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt agccaccacg 180
aagtcc                                     *      186
```

<210> 2

<211> 199

10 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> EFTU\RXA01284\GESAMTE

<400> 2

```
ggccggttacc ctgcgaatgt ccacagggta gctggtagtt tgaaaatcaa cgccgttgcc 60
cttaggattc agtaactggc acattttgta atgcgctaga tctgtgtgct cagtcttcca 120
ggctgcttat cacagtgaaa gcaaaaccaa ttcgtggctg cgaaagtcgt agccaccacg 180
aagtccagga ggacataca                                     199
```

15

<210> 3

<211> 1365

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>

<223> RXA00077

<400> 3

atgaatgatg agaattattca aagctccaac tatcagccat tcccagagttt tgacgattgg 60
 aaacagatcg aggtgtcgtc cttagatgtc atcgaatcct cagccattt ttctgatttg 120
 aaagatagca ctgatcgttc tgcgttagat gctgcgctag agagagcaaa aagagctgcc 180
 gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcgggtt tacccatata 240
 gttgcaacgc aggtaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300
 cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga 360
 actccaatct ctacgcaatg gattagaaat ttgcacgccg tcattctgcg gagccaagaa 420
 agccacgagg tttttacagc cgttggagtc caaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtat 480
 aaaactcagc caaatagtcc acagcgtcga gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540
 gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600

gcagccgaga aggttattca agctgcctat gccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660
 tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggtta gtgttttct atacaaagat 720
 cctggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780
 gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840
 actattaact ctattatcgt tgatctcact accccgatcg cgggtaaatc tggttcggct 900
 aagctttcgg atgcgctacg cccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960
 aggcctcaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020
 aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcgggt cccattcaaa tctgccagag 1080
 ggctataacg ctttcctga tagctattgt ctgaccttag ctttcaatag caactctcca 1140
 aaacaaatct tccacccgct atccatagta atagcagctc gagatgggaa aagagcgagc 1200
 agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaactttc acgcttacgg acgtgaagtc 1260
 gagcctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtgaaaa tttacgccga cgggattgta 1320
 gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

<210> 4

<211> 454

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 4

Met₁ Asn Asp Glu Asn₅ Ile Gln Ser Ser Asn₁₀ Tyr Gln Pro Phe Pro Ser
Phe Asp Asp Trp₂₀ Lys Gln Ile Glu Val₂₅ Ser Leu Leu Asp Val₃₀ Ile Glu
Ser Ser Arg₃₅ His Phe Ser Asp Leu₄₀ Lys Asp Ser Thr Asp₄₅ Arg Ser Ala
Leu Asp₅₀ Ala Ala Leu Glu Arg₅₅ Ala Lys Arg Ala Ala₆₀ Ala Val Asp Thr
Asn₆₅ Ala Ile Glu Gly Ile₇₀ Phe Gln Thr Asp Arg₇₅ Gly Phe Thr His Thr₈₀
Val Ala Thr Gln Val₈₅ Gly Ala Trp Glu Gln₉₀ Gln Met Ala Met Lys Gly₉₅
Lys His Val Lys₁₀₀ Pro Ala Phe Asp Asp₁₀₅ Thr Leu Glu Gly Phe Glu Tyr
Val Leu Asp₁₁₅ Ala Val Thr Gly Arg₁₂₀ Thr Pro Ile Ser Gln₁₂₅ Gln Trp Ile
Arg Asn₁₃₀ Leu His Ala Val Ile₁₃₅ Leu Arg Ser Gln Glu₁₄₀ Ser His Glu Val
Phe Thr Ala Val Gly Val₁₅₀ Gln Asn Gln Ala Leu₁₅₅ Gln Lys Gly Glu Tyr₁₆₀
Lys Thr Gln Pro Asn₁₆₅ Ser Pro Gln Arg Ser₁₇₀ Asp Gly Ser Val His Ala₁₇₅
Tyr Ala Pro Val₁₈₀ Glu Asp Thr Pro Ala₁₈₅ Glu Met Ala Arg Phe Ile Ser
Glu Leu Glu₁₉₅ Ser Lys Glu Phe Leu₂₀₀ Ala Ala Glu Lys Val₂₀₅ Ile Gln Ala
Ala Tyr₂₁₀ Ala His Tyr Ala Phe₂₁₅ Val Cys Ile His Pro₂₂₀ Phe Ala Asp Gly

Asn Gly Arg Val Ala Arg Ala Leu Ala Ser Val Phe Leu Tyr Lys Asp
 225 230 235 240
 Pro Gly Val Pro Leu Val Ile Tyr Gln Asp Gln Arg Arg Asp Tyr Ile
 245 250 255
 His Ala Leu Glu Ala Ala Asp Lys Asn Asn Pro Leu Leu Leu Ile Arg
 260 265 270
 Phe Phe Ala Glu Arg Val Thr Asp Thr Ile Asn Ser Ile Ile Val Asp
 275 280 285
 Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His
 305 310 315 320
 Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu
 325 330 335
 Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile
 340 345 350
 Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser
 355 360 365
 Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe
 370 375 380
 His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser
 385 390 395 400
 Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr
 405 410 415
 Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val
 420 425 430
 Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala
 435 440 445
 Lys Lys Phe Gln Gln Asn
 450

<210> 5

<211> 52

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_5

<400> 5

cccggtatcc gctagcggcg cgccggccgg ccggtgtga aataccgcac ag 52

10 <210> 6

<211> 53

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_6

<400> 6

tctagactcg agcggccgcg gccggcctt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 7

5 <211> 47

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_7

10 <400> 7

gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

<210> 8

<211> 38

<212> ADN

15 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_8

<400> 8

gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

20 <210> 9

<211> 34

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

25 <223> SEQ_ID_9

<400> 9

gagagggcgg ccgcgcaaag tcccgcttcg tgaa 34

<210> 10

<211> 34

30 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

ES 2 439 946 T3

<220>

<223> SEQ_ID_10

<400> 10

gagagggcg cgcctcaagt cggtaagcc acgc 34

5 <210> 11

<211> 140

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

10 <223> SEQ_ID_11

<400> 11

tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggtt ccacgcgtca tatgactagt 60
tcggacctag ggatatcgct gacatcgatg ctcttctgct ttaattaaca attgggatcc 120
tctagaccgg ggatttaaatt 140

<210> 12

<211> 140

15 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ

<400> 12

gatcatttaa atccccgggtc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60
tgtcgacgat atccctaggt ccgaactagt catatgacgc gtggtaccgg gcccgacgtc 120
aggcctctcg agatttaaatt 140

20

<210> 13

<211> 5091

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

25 <220>

<223> PCLIK5MCS

<220>

<221> misc_feature
 <222> (469) .. (4662)
 <223> KanR
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1527) .. (2387)
 <223> Ori EC_(pMB)
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (2533) .. (3207)
 <223> Orf1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3541) .. (4662)
 15 <223> Rep Proteína
 <400> 13

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccgggtac cacgcgtcat atgactagtt 60
 cggacctagg gatatcgctg acatcgatgc tcttctgctg taattaacaa ttgggaccc 120
 ctagaccccg gatttaaata gctagcgggc tgctaaagga agcgggaacac gtagaaagcc 180
 agtccgcaga aacgggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat ctggacaagg 240
 gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggtg gcttgcagtg ggcttacatg gcgatagcta 300
 gactgggagg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc gccctctggt 360
 aagggttggg agccctgcaa agtaaaactgg atggctttct tgccgccaag gatctgatgg 420
 cgcaggggat caagatctga tcaagagaca ggatgaggat cgtttcgcac gattgaacaa 480
 gatggattgc acgcagggtc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 540
 gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcagggggcg 600
 ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 660
 gcgcggctat cgtggctggc cagcagggc gttccttgct cagctgtgct cgacgttgct 720
 actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaaagtgc cggggcagga tctcctgtca 780
 tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgct gcggctgcat 840
 acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 900
 cgtactcgga tggaaagccg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 960
 ctgcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgcgg cgaggatctc 1020
 gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 1080
 ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct 1140
 acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac 1200
 ggtatcgccg ctcccgatcc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 1260
 tgagcgggac tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag 1320
 atttcgattc caccgcgcc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg 1380
 ccggctggat gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc cagctagcg 1440
 gcgcgccggc cggcccggtg tgaaataaccg cacagatgct taaggagaaa ataccgcac 1500
 aggcgctctt ccgcttctc gctcactgac tcgctgcgct cggctggtcg gctgcggcga 1560

gcggtatcag ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 1620
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg 1680
 ctggcggtttt tccataggct ccgccccctt gacgagcatc acaaaaaatcg acgctcaagt 1740
 cagagggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaaagctcc 1800
 ctcgtgcgct ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860
 tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc 1920
 gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 1980
 tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040
 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100
 tggtagccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 2160
 ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggg 2220
 agcggtggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa 2280
 gatcccttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 2340
 attttggcca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ggccggccgc 2400
 ggccgcgcaa agtcccgtt cgtgaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460
 ttaacgaacg ttcgttataa tgggtgcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520
 gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580
 gtcgatttaa aaacgggatg cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgcgccagca 2640
 tcacgagact gggccagtg cgcgagcgac ctagaaactc tcgtggcgga tcttgaggag 2700
 ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760
 atcagttgag cctactgcgg tggcctgatt cctccccggc ctgaccgcg aggacggcg 2820
 gcaaaatatt gctcagatgc gtgtcgtgcc gcagccagcc gcgagcgcg caaaaaacgc 2880
 cacgccgagg agctggaggc ggctaggtcg caaatggcg tggaaagtgc tccccgagc 2940
 gaaattttg ccatggctgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgtg 3000
 gcggtgcccg caggcatgac aaacatcgta aatgcccggt ttcgtgtgcc gtggccgccc 3060
 aggacgtgc agcggcgcca ccacctgcac cgaatcgga gcagcgtgc gcgtcgaaaa 3120
 agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaatacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180
 gtgagcggtg actcacaggg cgtcggctaa cccccagtc aaacctggga gaaagcgctc 3240
 aaaaatgact ctacgggatt cacgagacat tgacacaccg gcctggaaat tttccgctga 3300
 tctgttcgac acccatcccg agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcgaagaccg 3360
 ccgcgaattc ctgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420
 cgccagcgct tggatcaaag acccgacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt 3480
 ggttcaaaat cgcttgccc gtgccagtat gttgctctga cgcacgcgca gcacgcagcc 3540
 gtgcttgctc tggacattga tgtgccgagc caccaggccg gcgggaaaaat cagcacgta 3600
 aaccccagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgcc tggaaaaagc gccagcttg 3660
 atcggcgta atccactgag cgggaaatgc cagctcatct ggctcattga tccggtgtat 3720
 gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780
 acccgcggtt tcggcgtga ccaggctttt tcacataggc tgagccgtgg cactgcact 3840
 ctccgacgat cccagccgta ccgtggcat gccagcaca atcgcgtgga tcgcctagct 3900

```

gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaa aacctaataaa acgctatgag 3960
caggagtttt ctacgggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaagca 4020
aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgccg ctgaagcgtc tggagagctg 4080
atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccagggcggt ccgcccgtga tgagacggct 4140
tttcgccacg ctttgactgt gggataccag ttaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaagac 4200
accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaggcggt cggaggaggc 4260
cgtgagcctg atctgccgcc ggactgtgac cgccagacgg attggccgag acgtgtgctg 4320
ggctacgctg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgtc agacagagac gcagagccag 4380
ccgaggcgaa aagctctggc cactatggga agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
tggaagacc caaacagtga gtacgcccg gacacgagcg aaaaactagc taagtccagt 4500
caacgacaag ctaggaaagc taaaggaaat cgcttgacca ttgcagggtt gtttatgact 4560
gttgagggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
tcacgtcaga ccgtgaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cagaggagc 4680
ccgaaagctt ccagtaaat gtgccatctc gtaggcagaa aacgggtccc ccgtagggtc 4740
tctctcttgg cctcctttct aggtcgggct gattgctctt gaagctctct aggggggctc 4800
acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctgcgctcgt aagcgacaaa ggactgctcc 4860
caaagatctt caaagccact gccgcgactg ccttcgcgaa gccttgcccc gcggaattt 4920
cctccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttcgagagat 4980
tggaattcta ccgtggaaat tcttcgcaa aatcgctccc tgatcgccct tgcgacgttg 5040
gcgtcgggtg cgctggttgc gcttggttgc accgacttga tcagcggccg c 5091

```

<210> 14

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_14

<400> 14

gcgcggtacc tagactacc ccagtgt 28

10 <210> 15

<211> 30

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

15 <223> SEQ_ID_15

<400> 15

ctctactagt ttagatgtag aactcgatgt 30

<210> 16

<211> 6349

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> PCLIK5MCS_PMETA_META

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (42) .. (177)

<223> PmetA

<220>

<221> misc_feature

<222> (178) .. (1311)

15 <223> metA

<220>

<221> misc_feature

<222> (1727) .. (2518)

<223> KanR

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (2785) .. (3645)

<223> Orf1 (complementary)

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (3791) .. (4465)

<223> Ori- EC (pMP)

<220>

<221> misc_feature

30 <222> (4799) .. (5920)

<223> Rep Proteína

<400> 16

```

tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtag ctagactcac cccagtgcctt 60
aaagcgctgg gtttttcttt ttcagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120
tccatataca ctggacgaag ttttagtcct gtccaccag aacaggcggg tattttcatg 180
cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggatgatgt ctccaccgaa 240
gccggagcaa tcattacaaa cgtgaaatc gcctatcacc gctgggggtga ataccgcgta 300
gataaagaag gacgcagcaa tgtcgttctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggg cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac 420
tgcgtgatct gtaccaacgt catcgggtgt tgcaacgggt ccaccggacc tggctccatg 480
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc tccccgccg cgtccattcg tgatcaggta 540
aacgccgaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggg 600
ggttccatgg gtggtgcccg caccctagag tgggccgcaa tgtaccaga aactgttggc 660
gcagctgctg ttcttgacgt ttctgcacgc gccagcgctt ggcaaatcgg cattcaatcc 720
gccccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgacgca tcgccacct cacctaccgt 840
ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaaccactc 900
ggtccctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttggg ctaccaagca 960
gacaagctag tacagcgttt cgacgcgggc tcctacgtct tgctcaccga cgccctcaac 1020
cgccacgaca ttggtcgcga ccgcggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080
ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgat attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140
ctctccagaa acctgggaaa tctactggca atggcaaaaa tcgtatcccc tgcgggccac 1200
gatgctttcc tcaccgaaag ccgcaaagt gatcgcatcg tgaggaaactt cttcagcctc 1260
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagtctg 1320
gacctaggga tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct 1380
agacccggga tttaaactgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag 1440
tccgcagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga 1500

```

```

aaacgcaagc gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560
ctgggcggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620
ggttggaag ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaaaga tctgatggcg 1680
caggggatca agatctgac aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga 1740
tggattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 1800
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc 1860
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920
gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac 1980
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgcgc gggcaggatc tcctgtcatc 2040
tcaecttgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg 2160
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 2220
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt 2280
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaaatggc gcttttcttg 2340
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac 2400
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttccctg tgctttacgg 2460
tategccgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg 2520
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580
ttcgattcca cgcgcgctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc 2640
ggctggatga tctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc 2700
gcgccggcg gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag 2760
gcgctcttcc gcttcctcgc tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 2820
ggtatcagct cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccagggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 2940
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgctt ttctccctc 3120
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggatc ctgagttcgg tgtaggtcgt 3180
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 3240
cggttaactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 3300
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 3360
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgcgaagcc 3420
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3480
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 3540
tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc tcagtgaac gaaaactcac gttaagggat 3600
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg 3660
ccgcgcaaag tcccgttcg tgaaaatttt cgtgccgctg gattttccgc caaaaacttt 3720
aacgaacgtt cgttataatg gtgtcatgac cttcacgacg aagtactaaa attggcccga 3780

```

atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcg gacgcgctcg atgctgccgt 3840
 cgatttaaaa acggtgatcg gatttttccg agctctcgat acgacggacg cgccagcatc 3900
 acgagactgg gccagtgccg cgagcgacct agaaactctc gtggcggtac ttgaggagct 3960
 ggctgacgag ctgctgctc ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg aggatgcaat 4020
 cagttgcgcc tactgcggtg gcctgattcc tccccggcct gacccgcgag gacggcgcg 4080
 aaaatattgc tcagatgcgt gtcgtgccgc agccagccgc gagcgcgcca acaaacgcca 4140
 cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgcgtc ccccgagcga 4200
 aattttggcc atggtcgtca cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcgtggc 4260
 ggtgcccgcg ggcatagcaa acatcgtaaa tgccgcgttt cgtgtgccgt ggccgcccag 4320
 gacgtgtcag cgccgccacc acctgcaccg aatcggcagc agcgtcgcgc gtcgaaaaag 4380
 cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgttg aacgccccgt 4440
 gagcggtaac tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgtcaa 4500
 aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgate 4560
 tgttcgacac ccatcccag ctcgcgctgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgcc 4620
 gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680
 ccagcgcttg gatcaagac ccggacacgg agaaacacag ccgaagttat accgagttgg 4740
 ttcaaaatcg ctgcccggg gccagtatgt tgctctgacg cagcgcgagc acgcagccgt 4800
 gcttgctctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860
 ccccgaggtc tacgcgattt tggagcgtg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggtg 4920
 cggcgatgaat ccaactgagc ggaatgcca gctcatctgg ctcatctgac cggtgatgac 4980
 cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgca cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040
 ccgcgttttc ggcgtgacc aggcgttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100
 ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160
 tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220
 ggagttttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggagcaaaa 5280
 agcacttgcc acgcttgaaag caagcctgcc gagcgccgct gaagcgtctg gagagctgat 5340
 cgacggcgtc cgtgtcctct ggactgtccc agggcggtgc gcccgatgag agacggcttt 5400
 tcgccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgcc taaaagacac 5460
 caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggtcg gaggaggccg 5520
 tgagcctgat ctgccgccg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgagg 5580
 ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgtcag acagagacgc agagccagcc 5640
 gaggcgaaaa gctctggcca ctatgggaag acgtggcggg aaaaaggccg cagaacgctg 5700
 gaaagacca aacagtgagt acgcccagc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760
 acgacaagct aggaagcta aaggaaatcg ctgaccatt gcaggttggg ttatgactgt 5820
 tgaggagag actggctcgt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880
 acgtcagacc gtgaatagag cacttaaggc ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940
 gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcgt aggcagaaaa cggttcccc gtagggctc 6000
 tctcttggtc tctttctag gtcgggctga ttgctcttga agctctctag gggggctcac 6060
 accataggca gataacgttc cccaccggct cgctctgtaa gcgcacaagg actgctcca 6120

aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttgcggaagc cttgccccgc ggaaatttcc 6180
 tccaccgagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttcttcc accctaaatt cgagagattg 6240
 gattcttacc gtggaaattc ttgcagaaaa tcgtccccctg atcgcccttg cgacgttggc 6300
 gtcgggtgcc ctggttgcgc ttggttgac cgacttgatc agcggccgc 6349

<210> 17
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 5 <220>
 <223> SEQ_ID_17
 <400> 17
 gagactcgag ggccgttacc ctgcgaatg 29
 <210> 18
 10 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <223> SEQ_ID_18
 15 <400> 18
 cctgaaggcg cgaggggtggg cattgtatgt cctcctggac 40
 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <223> SEQ_ID_19
 <400> 19
 cccaccctcg cgccttcag 19
 25 <210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 30 <223> SEQ_ID_20
 <400> 20

ctgggtacat tgcggccc 18

<210> 21

<211> 6394

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> PCLIK5MCS

<220>

<221> misc_ feature

10 <222> (18) .. (216)

<223> Peftu

<220>

<221> misc_ feature

<222> (217) .. (1350)

15 <223> metA

<220>

<221> misc_ feature

<222> (1772) .. (2563)

<223> KanR

20 <220>

<221> misc_ feature

<222> (2830) .. (3690)

<223> Ori- EX (pMB)

<220>

25 <221> misc_ feature

<222> (3836) .. (4510)

<223> Orf1

<220>

<221> misc_ feature

30 <222> (4844) .. (6965)

<223> Rep Proteína

<400> 21

```

tcgatttaaa tctcgagggc cgttaccctg cgaatgtcca cagggtagct ggtagtttga 60
aatcaacgc cgttgccctt aggattcagt aactggcaca ttttgtaatg cgctagatct 120
gtgtgctcag tcttcaggc tgcttatcac agtgaaagca aaaccaattc gtggctgcga 180
aagtcgtagc caccacgaag tccaggagga catacaatgc ccaccctcgc gccttcagggt 240
caacttgaaa tccaagcgat cggatgatgc tccaccgaag cgggagcaat cattacaaac 300
gctgaaatcg cctatcacgc ctggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat 360
gtcgttctca tcgaacacgc cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac 420
ttgctcggtc ccggcaaaag catcaaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc 480
atcggtggtt gcaacgggtt caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg 540
ggtaatcgct tccccgccac gtccattcgt gatcaggtaa acgccgaaaa acaattcctc 600
gacgcactcg gcatcaccac ggtcgccgca gtacttggtg gttccatggg tggcgccgc 660
accctagagt gggccgcaat gtaccagaa actgttggcg cagctgctgt tcttgagtt 720
tctgcacgcg ccagcgctg gcaaatcggc attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa 780
aacgaccacc actggcacga aggcaactac tacgaatccg gctgcaacc agccaccgga 840
ctcggcgccg cccgacgat cgcccacct acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa 900
cgcttcggca ccaaagccca aaagaacgaa aaccactcg gtccctaccg caagcccgac 960
cagcgcttcg ccgtggaatc ctacttggaac taccaagcag acaagctagt acagcgttc 1020
gacgccggct cctacgtctt gtcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggcgcgac 1080
cgcgagggcc tcaacaaggc actcgaatcc atcaaagttc cagtccttgt cgagggcgta 1140
gataccgata ttttgtaacc ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctgggaaat 1200
ctactggcaa tggcaaaaat cgtatcccct gtcggccacg atgctttcct caccgaaagc 1260
cgccaaatgg atcgcatcgt gaggaacttc ttcagcctca tctcccaga cgaagacaac 1320
ccttcgacct acatcgagtt ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg 1380
tcgacatcga tgctcttctg cgtaattaa caattgggat cctctagacc cgggatttaa 1440
atcgctagcg ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg 1500
ctgaccccg atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaaa 1560
gagaaagcag gtagcttgca gtgggcttac atggcgatag ctagactggg cggttttatg 1620
gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct ggtaagggtg ggaagccctg 1680
caaagtaaac tggatggctt tcttgccgcc aaggatctga tggcgaggg gatcaagatc 1740

```

tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg 1800
 ttctccggcc gcttgggttg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcgg 1860
 ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg cggccgggtc tttttgtcaa 1920
 gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct 1980
 ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga 2040
 ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc 2100
 cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg catacgcttg atccggctac 2160
 ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc 2220
 cggctctgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact 2280
 gttcgcagg ctcaaggcgc gcattgcccga cggcgaggat ctctctgtga cccatggcga 2340
 tgcctgcttg ccgaatatca tggggaataa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg 2400
 ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg gctaccctg atattgctga 2460
 agagcttggc ggcgaatggg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccg 2520
 ttgcgagcgc atgccttct atgccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg 2580
 ttcgaaatga ccgaccaagc gacgcccaac ctgccatcac gagatttcga ttccaccgcc 2640
 gccttctatg aaagggttggg cttcggaatc gttttccggg acgccggctg gatgatectc 2700
 cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gccacgcta gcggcgcgcc ggccggcccg 2760
 gtgtgaaata ccgacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggcgct cttccgcttc 2820
 ctgcctcact gactcgtgc gctcggctgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc 2880
 aaaggcggtg atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc 2940
 aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag 3000
 gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc 3060
 gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt 3120
 tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 3180
 ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg 3240
 ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct 3300
 tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat 3360
 tagcagagcg aggtatgtag gcggtgttac agagtctctg aagtgggtgg ctaactacgg 3420
 ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta cttcggaaa 3480
 aagagttggt agctcttgat ccggcaaaac aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt 3540
 ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 3600
 tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctacgttaa gggatttttg tcatgagatt 3660
 atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaaggccggc cgcgcccgcg caaagtccc 3720
 cttcgtgaaa attttcgtgc cgcgtgattt tccgcaaaa actttaacga acgttcgtta 3780
 taatggtgtc atgaccttca cgacgaagta ctaaaattgg cccgaatcat cagctatgga 3840
 tctctctgat gtcgcgtgg agtccgacgc gctcgatgct gccgtcgatt taaaaacggt 3900
 gatcggattt ttccgagctc tcgatacgac ggacgcgcca gcatacagag actgggccag 3960
 tgccgcgagc gacctagaaa ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg 4020

tgctcgccca gcgccaggag gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt gcgcctactg 4080
 cgggtggcctg attcctcccc ggcttgaccc gcgaggacgg cgcgcaaat attgctcaga 4140
 tgcgtgtcgt gccgcagcca gccgcgagcg cgccaacaaa cgccacgccg aggagctgga 4200
 ggcggttagg tcgcaaatgg cgctggaagt gcgtccccc agcgaatttt tggccatggt 4260
 cgtcacagag ctggaagcgg cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat 4320
 gacaaacatc gtaaatgccg cgtttcgtgt gccgtggccg cccaggacgt gtcagcgccg 4380
 ccaccacctg caccgaatcg gcagcagcgt cgcgcgtcga aaaagcgcac aggcggcaag 4440
 aagcgataag ctgcacgaat acctgaaaaa tgttgaacgc cccgtgagcg gtaactcaca 4500
 gggcgctggc taacccccag tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg 4560
 attcacgaga cattgacaca ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacaccatc 4620
 ccgagctcgc gctgcgatca cgtggctgga cgagcgaaga ccgccgcgaa ttctcgcctc 4680
 acctgggcag agaaaatttc cagggcagca agaccgcga cttcgccagc gcttgatca 4740
 aagaccggga caggagaaaa cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc 4800
 ccggtgccag tatgttgcctc tgacgcacgc gcagcacgca gccgtgcttg tcctggacat 4860
 tgatgtgccg agccaccagg ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccccg aggtctacgc 4920
 gattttggag cgctgggcac gcctggaaaa agcgcacagt tggatcggcg tgaatccact 4980
 gagcgggaaa tgccagctca tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag 5040
 cagcccgaaat atgcgcctgc tggctgcaac gaccgaggaa atgaccgcg ttttcggcgc 5100
 tgaccaggct ttttcacata ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc 5160
 gtaccgctgg catgccagc acaatcgctg ggatcgcta gctgatctta tggaggttgc 5220
 tcgcatgatc tcaggcacag aaaaacctaa aaaacgctat gagcaggagt tttctagcgg 5280
 acgggcacgt atcgaagcgg caagaaaagc cactgcggaa gcaaaagcac ttgccacgct 5340
 tgaagcaagc ctgccgagcg ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt 5400
 cctctggact gctccagggc gtgcgcgccg tgatgagacg gcttttcgcc acgctttgac 5460
 tgtgggatac cagttaaaag cggctggtga gcgcctaaaa gacaccaagg gtcacgagc 5520
 ctacgagcgt gcctacaccg tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc 5580
 gccggactgt gaccgccaga cggattggcc gcgacgtgtg cgcggctacg tcgctaagg 5640
 ccagccagtc gtccctgctc gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct 5700
 ggccactatg ggaagacgtg gcggtaaaaa ggccgcagaa cgctggaaaag acccaaacag 5760
 tgagtacgcc cgagcacagc gagaaaaact agctaagtc agtcaacgac aagctaggaa 5820
 agctaaagga aatcgcttga ccattgcagg ttggtttatg actgttgagg gagagactgg 5880
 ctggtggccg acaatcaatg aagctatgtc tgaatttagc gtgtcacgtc agaccgtgaa 5940
 tagagcactt aaggtctgcg ggcattgaac ttccacgagg acgcgaaaag cttcccagta 6000
 aatgtgccat ctgtaggca gaaaacgggt ccccgtagg gtctctctct tggcctcctt 6060
 tctaggtcgg gctgattgct cttgaagctc tctagggggg ctcacacat aggcagataa 6120
 cgttccccac cggctcgct cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc 6180
 actgcgcga ctgccttcgc gaagccttgc ccgcggaaa tttcctccac cgagtctgtg 6240
 cacacccta tgccaagctt ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgga 6300
 aattcttcgc aaaaatcgtc ccctgatcgc cttgcgacg ttggcgctcg tgccgctggt 6360
 tgcgcttggc ttgaccgact tgatcagcgg ccgc 6394

<210> 22

<211> 35

5 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_22

<400> 22

gagagagaga cgcgtcccag tggctgagac gcatc 35

5 <210> 23

<211> 34

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

10 <223> SEQ_ID_23

<400> 23

ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg 34

<210> 24

<211> 4323

15 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> PCLIK5

<400> 24

```

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagtctg gacctaggga 60
tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120
tttaaatacgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcggtt 300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540
atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt 600
gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660
tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720
agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780
cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgccc ggctgcatac gcttgatccg 840
gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg 900
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacctat 1020
ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140
gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200

```

```

cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260
tgggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
ccgcccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgccggccg 1440
gccccgtgtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500
gttctctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560
cactcaaagg cggtaatatc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 1680
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aacccgacag gactataaag ataccaggcg ttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgect ttctcccttc gggaagcgtg 1860
gcgctttctc atagctcag ctgtaggat ctcagtccg tgtaggctgt tcgctccaag 1920
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag ccgaccgct gcgccttacc cggtaactat 1980
cgctttgagt ccaacccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgcgtaagcc agttaccttc 2160
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt 2220
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gttaagggat ttgtgtcatg 2340
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaagg ccggccgcgg ccgccatcg 2400
cattttcttt tgcgttttta ttgtttaact gttaatgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580
ttcgccttag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggtta catcgtagg atcaagatcc 2640
atttttaaca caaggccagt ttgttcagc ggcttgtagt ggccagttaa agaattagaa 2700
acataaccaa gcatgtaaat atcgtagac gtaatgccgt caatcgcat ttttgatccg 2760
cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcactgttta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca 2880
tcgttttagc caatcatacc gagagcgccg ttgtctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000
ttgttaaata aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atggttgctg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt tttccgtca 3180
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gctgatgct 3240
gatacgttaa cttgtgcagt tgcagtgtt tgtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattcttgt 3360
gtttggtctt ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgctgtcttt aaagacgcgg 3420
ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaatc 3480
gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaattgca agacgatgtg gtagccgtga 3540

```

```

tagtttgcga cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600
tttgagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatttttca 3660
tttttttgcg gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720
gtttccttat atggcctttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
agcagtgcgg tagtaaaggt taatactggt gcttgttttg caaacttttt gatgttcac 3840
gttcagtgtc ccttttttat gtactgtgtt agcgggtctgc ttcttcagc cctcctgttt 3900
gaagatggca agttagttag gcacaataaa aaaagacctt aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020
ccgcgcgatt tacttttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattg caactggtct 4080
attttctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140
actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagtttc tgttgcattg 4200
gcataaagtt gcctttttta tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260
taatagttaa cggcagggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcgccg ctcgatttaa 4320
atc 4323

```

<210> 25

<211> 5860

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> PCIS_LYSC

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (155) .. (1420)

<223> CDS lysC

<220>

<221> misc_feature

<222> (1974) .. (2765)

15 <223> KanR

<220>

<221> misc_feature

<222> (3032) .. (3892)

<223> Ori- EC (pMP)

20 <220>

<221> C_region

<222> (3913) .. (3934)

<223> sacB downstream (complement)

<220>

<221> misc_ feature

5 <222> (3935) .. (5356)

<223> CDS: sacB complement; (Bacillus subtilis)

<220>

<221> promoter

<222> (5357) .. (5819)

10 <223> Promotor sacB (complement)

<400> 25

```

cccggtagca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaagggtgcac aaagggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180
cgggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240

```

```

caagaaggct ggaaatgatg tcgtggtgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gtcctgtaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgtg tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctaccaccg agcggcacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tctctcagg tcgtgtgctg gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
gggtcgtggt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttgcca gctgcttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacggtgt gtataccgct gaccgcgca tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggttc 780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgctg 840
acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac ttgtattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtgctg tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
catcaccttc acctgcccct gttccgacgg ccgcccgcg atggagatct tgaagaagct 1140
tcagggtcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcatagaat ctacccagg tgttaccgca gagtcatgg aagctctgct 1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cactctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gacagttcc agctgggagg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagtttt 1440
acaatgacca ccatcgagcgt tgttggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgcacc 1500
cttttggaag agcgcaatct cccagctgac actgttcggt tctttgcttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atctcttaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagctc gcagaaacgg tgcgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 1860
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaaagta actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
gatggcgagc gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgtt cgcatgattg 1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgcgt gttccggctg tcagcgcagg 2100
ggcggccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
tgcatacgct tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccgggtctg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg 2520
atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580

```

tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
 tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
 tttacgggat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt 2760
 tcttctgagc gggactctgg gggtcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 2820
 acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 2880
 ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggtctcatg ctggagtctc tcgcccacgc 2940
 tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
 gcatcaggcg ctcttcgct tctcgtccta ctgactcgt gcgctcggc gttcggctgc 3060
 ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg taatacgtt atccacagaa tcaggggata 3120
 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
 cgttgctggc gtttttccat aggcctcgc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
 caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccttgaa 3300
 gtcctctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgcgcttac cggatactg tccgccttcc 3360
 tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420
 aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
 ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca accggtaag acacgactta tcgccactgg 3540
 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagtctc 3600
 tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgctctgc 3660
 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
 ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
 aagggtttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctgatacctt ttaaaggccg 3900
 gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc gtttttattt gtttaactgt aattgtcctt 3960
 gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg tttcttgc tttgatgttc agcaggaagc 4020
 tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgct agaatcctt gtttgtcata tagcttgtaa 4080
 tcacgacatt gtttcttcc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
 cgttaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagtctt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
 cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatac gtttagacgta atgccgtcaa 4260
 tcgtcatctt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca ttgcccgttc attttaaaga 4320
 cgttcgcg cgttcaatttca tctgttactg tgttagatgc aatcagcggc ttcacactt 4380
 ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgtt gctaactcag 4440
 ccgtgcgttt tttatcgct tgcagaagt tttgacttcc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
 ttttgccata gtatgccttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
 cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
 tcagcgtagt gttgtcgcct gagctgtagt tgccttcac gatgaactgc tgtacatttt 4680
 gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
 aagagctgtc tgatgtgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
 gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860

```

aacctgacca ttcttgtgtt tggctcttta ggatagaatc atttgcacgc aatttgtcgc 4920
tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaatacat gtgtcatccg ctttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggtg gccgtgatag ttgctgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga ttttttaaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcgtt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaatc tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

```

<210> 26

<211> 38

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_26

<400> 26

cggcaccacc gacatcatct tcactgccc tcgtccg 38

10 <210> 27

<211> 38

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

15 <223> SEQ_ID_27

<400> 27

cggaacgagg gcagggaag atgatgtcgg tggcgccg 38

<210> 28

<211> 1263

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

5 <223> LYSC

<400> 28

```

gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60
aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgctctg 120
tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180
ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggt agcgtatttc taacgctctc 240
gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300

ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360
gtgctggaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca ggggtgtaat 420
aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtgggt ctgacaccac tgcagtgtcg 480
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgtat 540
accgctgacc cgcgcacgtg tcctaataga cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt tgaatacgtc 660
cgtgcattca atgtgccact tcgcgtagcg tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720
attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgcgcaacc 780
gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840
aaggttttcc gtgctgtggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960
cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gtccagggca actggaccaa tgtgctttac 1020
gacgaccagg tcggcaaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccagggtgt 1080
accgagagt tcattggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260
cgc

```

<210> 29

<211> 5860

10 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> PCIS\LYSC\THR311ILE

<220>

```

<221> misc_feature
<222> (155) .. (1420)
<223> lysC
<220>
5  <221> misc_feature
    <222> (1974) .. (2765)
    <223> CDS: KanR
    <220>
    <221> misc_feature
10  <222> (3032) .. (3892)
    <223> Ori- EC (pMP) complement
    <220>
    <221> C_region
    <222> (3913) .. (3934)
15  <223> sacB downstream (complement)
    <220>
    <221> misc_feature
    <222> (3935) .. (5356)
    <223> CDS: sacB (complement)
20  <220>
    <221> promoter
    <222> (5357) .. (5819)
    <223> sacB Promotor (complement)
    <400> 29
25  cccggtacca cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60

```

agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
 aactgtcagc acgtagatcg aaagggtcac aaagggtggc ctggtcgtac agaaatatgg 180
 cggttcctcg cttgagagtg cggaaacgat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
 caagaaggct ggaatgatg tctggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
 acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
 cctgactgct ggtgagcgt tttctaaccg tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
 cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctgggtgt ctaccaccg agcggcacgg 480
 aaacgcacgc attgttgatg tctactcagg tctgtgtcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
 gatctgcatt gttgctggt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
 gggctcgtgt ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgcttga acgctgatgt 660
 gtgtgagatt tactcggacg ttgacggtgt gtataccgct gacccgcgca tcgttcctaa 720
 tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggtc 780
 caagattttg gtgctgcgca gtgttgaaata cgctcgtgca ttcaatgtc cacttcgct 840
 acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac ttgtattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
 tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
 tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgcgaagggt ttccgtcgtg tggctgatgc 1020
 agaaatcaac attgacatgg tttgacagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
 catcatcttc acctgccctc gttccgacgg ccgcccgcg atggagatct tgaagaagct 1140
 tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggctcgga aagtctccct 1200
 cgtgggtgct ggcataagat ctaccaccag tgttaccgca gaggttcatg aagctctgct 1260
 cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cactctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
 ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gacagttcc agctgggagg 1380
 cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaag gagtagtttt 1440
 acaatgacca ccatgcagt tgttgggtca accggccagg tcggccagggt tatgcgcacc 1500
 cttttggaag agcgaatatt cccagctgac actgttcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560
 gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
 atctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
 aagccagtcc gcagaaacgg tctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
 caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat 1800
 agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct 1860
 ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
 gatggcgtag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgtt cgcattgatt 1980
 aacaagatg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040
 actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg 2100
 ggcgcccgg tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
 aggcagcgc gctatcgtg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
 ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg caggatctcc 2280
 tgtcatctca ccttgtcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
 tgcatacgt tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaacat cgcctcgagc 2400

gagcacgtac tcggatggaa gccgggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
 aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcgagg 2520
 atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
 tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
 tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaaat ggctgaccgc ttcctcgtgc 2700
 tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt 2760
 tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc 2820
 acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 2880
 ggacgcccgc tggatgatcc tccagcgcg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
 tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
 gcatcaggcg ctcttccgct tctcgcctca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc 3060
 ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120
 acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaaccgt aaaaaggccg 3180
 cggtgctggc gtttttccat aggtctccgc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
 caagtcatag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt ccccttgaa 3300
 gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatacctg tccgccttc 3360
 tcccttcggg aagcgtggcg ctcttcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420
 aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
 ccttatccg taactatcgt ctgagtcga acccggttag acacgactta tcgccactgg 3540
 cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct 3600
 tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggatc tgcgtctgc 3660
 tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
 ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
 aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
 aagggatctt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
 gccgcggccg ccatcgcat tttcttttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960
 gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg tttcttgc tttgatgttc agcaggaagc 4020
 tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctt gtttgcata tagcttgtaa 4080
 tcacgacatt gtttctttt gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
 cgttaggatc aagatccatt ttaacacaa ggccagttt gttcagcggc ttgtatggg 4200
 cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa 4260
 tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320
 cgttcgcggt ttcaatttca tctgttactg tgtagatgc aatcagcggg ttcactactt 4380
 ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgcggtt gctaactcag 4440
 ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
 ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
 cagtgtttgc ttcaataact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
 tcagcgtatg gttgtcgctt gagctgtagt tgccttcac gatgaactgc tgtacatttt 4680

gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc 4920
tgtctttaa gacgcggcca gcgttttcc agctgtcaat agaagtctcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggccctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgcgtgt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcggt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcgtt 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcattggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg cagggtatag tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gattttaaac tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

<210> 30

<211> 29

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> CK_352

<400> 30

cgccaattgt ggccgttacc ctgcgaatg 29

10 <210> 31

<211> 40

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

15 <223> CK_353

<400> 31

ttctgtacga ccagggccac tgtatgtcct cctggacttc 40

<210> 32

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> CK_354

<400> 32

gaagtcagg aggacataca gtggccctgg tcgtacagaa 40

10 <210> 33

<211> 30

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

15 <223> CK_355

<400> 33

catgcccggg acagcagcaa gttccagcat 30

<210> 34

<211> 29

20 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> CK_356

<400> 34

25 cgcgacgtcc gtccaaaac gatcatgat 29

<210> 35

<211> 29

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>

<223> CK_357

<400> 35
 cgccaattgc ttgtgcacc ttctgatct 29
 <210> 36
 <211> 5670
 5 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <223> PCIS
 <220>
 10 <221> misc_ feature
 <222> (18) .. (633)
 <223> 5' ask
 <220>
 <221> misc_ feature
 15 <222> (641) .. (840)
 <223> Peftu
 <220>
 <221> misc_ feature
 <222> (841) .. (1460)
 20 <223> part of ask
 <220>
 <221> misc_ feature
 <222> (1804) .. (2595)
 <223> KanR
 25 <220>
 <221> misc_ feature
 <222> (2862) .. (3722)
 <223> ori- EC (pMP) complement
 <220>
 30 <221> misc_ feature
 <222> (3765) .. (5186)

<223> sacB (complement)

<220>

<221> misc_ feature

<222> (5187) .. (5649)

5 <223> PSCB (complement)

<400> 36

tcgagaggcc tgacgtccgt cccaaaacga tcatgatgcc cacggctacg gtgaggaggg 60
 tagcccagaa gatttcagtt cggcgtagtc ggtagccatt gaatcgtgct gagagcggca 120
 gcgtgaacat cagcgacagg acaagcactg gttgcactac caagaggggtg ccgaaaccaa 180
 gtgtactgt ttgtaagaaa tatgccagca tcgcggtact catgcctgcc caccacatcg 240
 gtgtcatcag agcattgagt aaaggtgagc tccttaggga gccatctttt ggggtgcgga 300
 gcgcgatccg gtgtctgacc acggtgcccc atgcgattgt taatgccgat gctagggcga 360
 aaagcacggc gagcagattg ctttgcactt gattcagggg agttgactaa agagttgctc 420
 gcgaagtagc acctgtcact tttgtctcaa atattaaatc gaatatcaat atatggctcg 480
 tttattggaa cgcgtcccag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aacctgtgc 540
 agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 600
 aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaagcaattg tggccgttac cctgcgaatg 660
 tccacagggg agctggtagt ttgaaaatca acgccgttg ccttaggatt cagtaactgg 720
 cacattttgt aatgcgctag atctgtgtgc tcagtcttcc aggtgtctta tcacagtga 780
 agcaaaacca attcgtggct gcgaaagtcg tagccaccac gaagtccagg aggacataga 840
 gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 900
 aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggtgtgtgc 960
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 1020
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgtctctg actgctgggt agcgtatttc taacgctctc 1080
 gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 1140
 ggtgtgtcga ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 1200
 gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcatgttg ctggtttcca ggggtgtaat 1260
 aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggt ctgacaccac tgcagttgcg 1320
 ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgat 1380
 accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 1440
 atgttggaac ttgctgctgt cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aagggaagcg 1500
 aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgcagacccc ggatgaatgt cagctactgg 1560
 gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt 1620
 acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct 1680
 ggggcgcct ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg 1740
 ccaaggatct gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt 1800
 cgcatgattg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta 1860
 ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg 1920
 tcagcgcagg ggcgcccgtt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa 1980
 ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct 2040
 gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgccgggg 2100
 caggatctcc tgtcatctca cttgtctcct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca 2160
 atgcggcggc tgcatacgct tgatccggct acctgcccat tcgaccacca agcgaaacat 2220

cgcacgcgac gagcacgtac tcggatggaa gccgggtcttg tcgattcayya tgatctggac 2280
 gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc 2340
 gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa 2400
 aatggccgct tttctggatt catcgaactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag 2460
 gacatagcgt tggctacccg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc 2520
 ttctcgtgc tttacggtat cgcgcgtccc gattcgcagc gcacgcctt ctatcgctt 2580
 cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc 2640
 acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa 2700
 tcgttttccg ggacgcccgc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct 2760
 tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaa taccgcacag atgcgtaagg 2820
 agaaaaatcc gcacaggcg ctcttcgct tcctcgtca ctgactcgt gcgctcggc 2880
 gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa 2940
 tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaaccgt 3000
 aaaaaggccg cgttgcctgc gtttttccat aggcctccgc cccctgacga gcacacaaa 3060
 aatcgacgct caagtacagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 3120
 ccccttgaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct tgccgcttac cggatactg 3180
 tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 3240
 agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccc cgttcagccc 3300
 gaccgctgcg ctttatccg taactatcgt cttgagtcca acccggttaag acacgactta 3360
 tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatatg aggcgggtgct 3420
 acagagttct tgaagtgtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc 3480
 tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gttagctctt atccggcaaa 3540
 caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 3600
 aaaggatctc aagaagatcc tttgatctt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 3660
 aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctatgctctt 3720
 ttaaaggccg gccgcggcgg ccacggcat tttcttttgc gtttttattt gtttaactgt 3780
 aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg tttctttgcc tttgatgttc 3840
 agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaactcctt gtttgcata 3900
 tagcttgtaa tcacgacatt gtttccttcc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta 3960
 aagggtacat cgttaggac aagatccatt tttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc 4020
 ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta 4080
 atgccgtcaa tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc 4140
 attttaaga cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tggttagatgc aatcagcgg 4200
 ttcatcactt tttcagtggt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgccgttt 4260
 gctaactcag ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt ttgactttc ttgacggaag 4320
 aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca 4380
 tcttcagttc cagtgtttgc ttcaataact aagtatttgt ggcccttata ttctacgtag 4440
 tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgcct gagctgtagt tgccctcacc gatgaactgc 4500
 tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg 4560

```

ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt 4620
ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta 4680
aatgtggctg aacctgacca ttcttggtt tggctcttta ggatagaatc atttgcatcg 4740
aatgtgtcgc tgtctttaaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg 4800
ccgacttttt gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct 4860
aatgcaaaga cgatgtggtg gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat 4920
ggccagctgt cccaaacgtc caggcccttt gcagaagaga ttttttaat tgtggacgaa 4980
tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgctggt cagggatttg cagcatatca 5040
tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg gcttttggtt cgtttctttc 5100
gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag taaagggtta tactgttgct 5160
tgttttgcaa actttttgat gttcatcgtt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc 5220
ggctctgctt ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa 5280
agacctaaaa tatgtaagggt gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacattttag 5340
gtcttgcttg ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta 5400
gactctcgtt tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa 5460
aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttcct ttcattctct 5520
gtatttttta tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa 5580
aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta 5640
aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaate 5670

```

<210> 37

<211> 1005

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> FRUCTOSE- 1, 6- BISFOSFATASE

<400> 37

ES 2 439 946 T3

```

atgaacctaa agaaccccga aacgccagac cgtaaccttg ctatggagct ggtgcgagtt 60
acggaagcag ctgcactggc ttctggacgt tgggttggaac gtggcatgaa gaatgaaggc 120
gacgggtgccg ctggtgacgc catgcgccag ctcactcaact cagtgaccat gaagggcgctc 180
gttggttatcg gcgagggcga aaaagacgaa gctccaatgc tgtacaacgg cgaagaggtc 240
ggaaccggct ttggacctga ggttgatata gcagttgacc cagttgacgg caccaccctg 300
atggctgagg gtcgccccaa cgcaatttcc attctcgag ctgcagagcg tggcaccatg 360
tacgatccat cctccgtctt ctacatgaag aagatcgccg tgggacctga ggccgcaggc 420
aagatcgaca tcgaagctcc agttgcccac aacatcaacg cgggtggcaaa gtccaaggga 480
atcaaccctt ccgacgtcac cgttgtcgtg cttgaccgtc ctcgccacat cgaactgac 540
gcagacattc gtcgtgcagg cgcaaagggt cgtctcatct ccgacggcga cgttgcaggt 600
gcagttgcag cagctcagga ttccaactcc gtggacatca tgatgggcac cggcggaacc 660
ccagaaggca tcatcactgc gtgcgccatg aagtgcattg gtggcgaaat ccagggcatc 720
ctggcccaaa tgaacgattt cgagcgccag aaggcacacg acgctggtct ggttcttgat 780
caggttctgc acaccaacga tctggtgagc tccgacaact gctacttcgt ggcaaccggt 840

gtgaccaacg gtgacatgct ccgtggcggt tcctaccgcg caaacggcgc aaccaccgct 900
tccctgggta tgcgcgcaaa gtcaggcacc atccgccaca tcgagtctgt ccaccagctg 960
tccaagctgc aggaatactc cgtggttgac tacaccaccg cgacc 1005

```

<210> 38

<211> 335

<212> PRT

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 38

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

<210> 39

<211> 6

<212> ADN

5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> POTENTIELLE_-10-REGION_1

<400> 39

tagttt 6
 <210> 40
 <211> 6
 <212> ADN
 5 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <223> POTENTIELLE_-10-REGION_2
 <400> 40
 taggat 6
 10 <210> 41
 <211> 6
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 15 <223> POTENTIELLE_-10-REGION_3
 <400> 41
 tgcgct 6
 <210> 42
 <211> 7
 20 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <223> RIBOSOMALE
 <400> 42
 25 aggagga 7

REIVINDICACIONES

1. Proceso para aumentar el grado de transcripción de genes en microorganismos del género *Corynebacterium* en comparación con el tipo silvestre mediante regulación de la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad promotora que contienen

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

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

En cuyo caso los genes son heterólogos respecto de los ácidos nucleicos con actividad promotora.

10 2. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo mediante los ácidos nucleicos con actividad promotora se logra

b1) introduciendo uno o varios de los ácidos nucleicos con actividad promotora de acuerdo con la reivindicación 1 al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o de varios genes endógenos se efectúe bajo el control de los ácidos nucleicos con actividad promotora introducidos o

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

b3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico con actividad promotora de acuerdo con la reivindicación 1 y una funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribir.

20 3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dioles, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas, en cuyo caso los genes pueden contener opcionalmente otros elementos de regulación.

30 4. Proceso según la reivindicación 3, caracterizado porque las proteínas de la vía de biosíntesis de aminoácidos se selecciona del grupo de aspartatoquinasa, aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, diaminopimelato-deshidrogenasa, diaminopimelatodescarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato-reductasa, glicerinaldehído-3-fosfatodeshidrogenasa, 3-fosfoglicerato-quinasa, piruvato-carboxilasa, triosafosfato-isomerasa, regulador transcripcional LuxR, regulador transcripcional LysR1, regulador transcripcional LysR2, malato-quinona oxidoreductasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahionina-gamma-sintasa, cistahionina-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metileno-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa, homoserinadeshidrogenasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-quinasa, treonina-sintasa, treonina-exportador-transportador, treonina-deshidratasa, piruvato oxidasa, lisina-exportador, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, metionina-sintasa dependiente de la coenzima B12, metionina-sintasa independiente de la coenzima B12, sulfatoadeniltransferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina-sulfito-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, regulador RXA00655, regulador RXN2910, arginil-t-ARN-sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína de eflujo de treonina, serinahidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, proteína de la sulfato-reducción RXA077, proteína de la sulfato-reducción RXA248, proteína de la sulfato-reducción RXA247, proteína OpcA, 1-fosfofructoquinasa y 6-fosfofructoquinasa.

50 5. Microorganismo genéticamente modificado del género *Corynebacterium*, en cuyo caso la modificación genética conduce a un aumento del grado de transcripción de al menos un gen en comparación con el tipo silvestre y está condicionada por la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo mediante ácidos nucleicos con actividad promotora, que contienen

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

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

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

5 6. Microorganismo genéticamente modificado según la reivindicación 5, caracterizado porque la regulación de la transcripción de genes en el microorganismo se logra mediante ácidos nucleicos con actividad promotora

b1) introduciendo uno o varios de los ácidos nucleicos con actividad promotora de acuerdo con la reivindicación 5 al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o de varios genes endógenos se efectúe bajo el control de los de los ácidos nucleicos con actividad promotora introducidos o

10 b2) introduciendo uno o varios genes al genoma del microorganismo, de modo que la transcripción de uno o de varios de los genes introducidos se efectúa bajo el control de los ácidos nucleicos endógenos con actividad promotora de acuerdo con la reivindicación 5, o

b3) introduciendo en el microorganismo uno o varios constructos de ácidos nucleicos que contienen un ácido nucleico con actividad promotora de acuerdo con la reivindicación 5 y uno funcionalmente uno o varios ácidos nucleicos a transcribir.

15 7. Microorganismo genéticamente modificado según la reivindicación 5 o 6, caracterizado porque los genes se seleccionan del grupo de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de nucleótidos y nucleósidos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de ácidos orgánicos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de lípidos y ácidos grasos, de
20 ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de dioles, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de carbohidratos, ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de compuestos aromáticos, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de vitaminas, de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de cofactores y de ácidos nucleicos que codifican una proteína de la vía de biosíntesis de enzimas, en cuyo caso los genes pueden contener
25 opcionalmente otros elementos de regulación.

8. Microorganismo genéticamente modificado según la reivindicación 7, caracterizado porque las proteínas de la vía de biosíntesis de aminoácidos se selecciona del grupo de aspartatoquinasa, aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, diaminopimelato-deshidrogenasa, diaminopimelatodescarboxilasa, dihidrodipicolinato-sintetasa, dihidrodipicolinato-reductasa, glicerinaldehído-3-fosfatodeshidrogenasa, 3-fosfoglicerato-quinasa, piruvato-
30 carboxilasa, triosafofato-isomerasa, regulador transcripcional LuxR, regulador transcripcional LysR1, regulador transcripcional LysR2, malato-quinonaoxidoreductasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, 6-fosfogluconato-deshidrogenasa, transcetolasa, transaldolasa, homoserina-O-acetiltransferasa, cistahionina-gamma-sintasa, cistahionina-beta-liasa, serina-hidroximetiltransferasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, metileno-tetrahidrofolato-reductasa, fosfoserina-aminotransferasa, fosfoserina-fosfatasa, serina-acetil-transferasa,
35 homoserinadeshidrogenasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-quinasa, treonina-sintasa, treonina-exportador-transportador, treonina-deshidratasa, piruvatooxidasa, lisina-exportador, biotina-ligasa, cisteína-sintasa I, cisteína-sintasa II, metionina-sintasa dependiente de la coenzima B12, metionina-sintasa independiente de la coenzima B12, sulfatoadeniltransferasa subunidad 1 y 2, fosfoadenosina fosfosulfato reductasa, ferredoxina-sulfito-reductasa, ferredoxina NADP reductasa, 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, regulador RXA00655, regulador
40 RXN2910, arginil-t-ARN-sintetasa, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, proteína de eflujo de treonina, serinahidroximetiltransferasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa, proteína de la sulfato-reducción RXA077, proteína de la sulfato-reducción RXA248, proteína de la sulfato-reducción RXA247 , proteína OpcA, 1-fosfofructoquinasa y 6-fosfofructoquinasa.