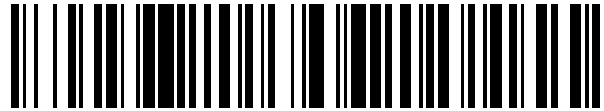


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 962**

51 Int. Cl.:

C07K 14/32 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2008 E 08801456 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2150559**

54 Título: **Producción incrementada de un producto diana vía estabilización del ARNm**

30 Prioridad:

07.06.2007 EP 07011200

11.06.2007 EP 07011415

14.06.2007 EP 07011681

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

23.05.2016

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

HET OVERLOON 1

6411 TE HEERLEN, NL

72 Inventor/es:

LEHMANN, MARTIN;

PRAGAI, ZOLTAN y

SCHABER, MICHÈLE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 570 962 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

Producción incrementada de un producto diana vía estabilización del ARNm

La presente invención se refiere a elementos estabilizadores del ARNm recientemente identificados útiles para la producción de un producto de fermentación diana, tal como por ejemplo vitaminas o enzimas, en particular riboflavina (vitamina B2), biotina, ácido pantoténico (vitamina B5), ácido fólico, tiamina, piridoxina (vitamina B6), vitamina B12, xilanasa, amilasa, proteasa, glucanasa, amilomaltasa, o amilasa maltogénica.

Muchos productos comercialmente valiosos se producen mediante reacciones de fermentación, tales como por ejemplo vitaminas o enzimas.

Existen varios métodos para la producción de productos de fermentación diana, incluyendo, por ejemplo, la sustitución del promotor (débil) natural por un promotor fuerte o la amplificación de casetes de expresión en el cromosoma, conteniendo dicho casete un único promotor ligado operablemente a un gen de interés y un gen marcador seleccionable ampliable, por ejemplo un marcador de resistencia a antibióticos. La amplificación conduce a la producción de múltiples copias del casete de expresión y del gen marcador seleccionable en el cromosoma. Se podría también incrementar la cantidad de un producto de fermentación deseado desacoplando la producción del producto deseado del crecimiento de dicha célula hospedante.

Sin embargo, hay desventajas asociadas con los enfoques mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede no ser posible lograr niveles saturantes de ARNm mediante amplificación de genes conducida por un único promotor. Además, la producción de múltiples copias del casete de expresión y del gen marcador seleccionable en el cromosoma de una célula hospedante puede no ser estable o incluso puede evitar la expresión posterior del gen respectivo (inhibición por retroalimentación).

Es un objeto de la presente invención mejorar el rendimiento y/o productividad de un producto de fermentación diana, en particular la producción de vitaminas o enzimas.

Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que la producción de un producto de fermentación diana se podría potenciar incrementando la estabilidad del transcrito, es decir, la estabilización del ARNm generado vía transcripción del gen o genes respectivos implicados en la biosíntesis de tales productos de fermentación diana.

En particular, ahora se ha encontrado que la introducción de un polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica que es al menos 95% idéntica a una secuencia mostrada en SEC ID NO:2 desempeña un papel importante en la estabilización del ARNm transcrito a partir de un gen respectivo. El elemento estabilizador del ARNm se puede introducir en dirección 3' del comienzo de la transcripción de un gen diana respectivo. También se ha encontrado que introduciendo dicho polinucleótido o elemento estabilizador del ARNm en un microorganismo adecuado, tal como por ejemplo *Bacillus*, se puede mejorar enormemente la producción de un producto de fermentación diana debido al ARNm estabilizado transcrito a partir del gen o genes respectivos implicados en la producción del producto diana deseado.

Los productos de fermentación diana se pueden seleccionar de vitaminas. En el caso de vitaminas, el producto de fermentación diana se selecciona particularmente del grupo que consiste en riboflavina (vitamina B2), biotina, ácido pantoténico (vitamina B5), ácido fólico, tiamina y piridoxina (vitamina B6). En una realización, la presente invención se refiere a la producción fermentativa de riboflavina (vitamina B2). Como se usa aquí, el término "riboflavina" incluye, pero no se limita a, riboflavina, flavin mononucleótido (FMN), flavin adenin dinucleótido (FAD), así como precursores, derivados y sales de riboflavina, FMN o FAD, tales como por ejemplo riboflavina-5-fosfato o riboflavina-5-fosfato de sodio. Los precursores y/o derivados de riboflavina, FMN y FAD se pueden seleccionar de, por ejemplo, DRAPP; 5-amino-6-ribosilamino-2,4(1H,3H)-pirimidindiona-5'-fosfato; 2,5-diamino-6-ribitilamino-4(3H)-pirimidinona-5'-fosfato; 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidindiona-5'-fosfato; 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidindiona; 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (DMRL); y flavoproteínas. Los términos "riboflavina" y "vitamina B2" se usan aquí de forma intercambiable. Se conocen los genes implicados en la biosíntesis de riboflavina, así como los métodos para la producción fermentativa de riboflavina (véanse, por ejemplo, documento EP 405370 o Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo Vitaminas). Estos métodos también se pueden aplicar para la producción de riboflavina usando un agente estabilizador del ARNm como se describe aquí.

El operón de riboflavina (*rib*) de *B. subtilis* consiste en el promotor medio fuerte P_{rib} , una secuencia líder en 5' que contiene un denominado riborregulador, y los genes *ribD* (*ribG*), *ribE* (*ribB*), *ribA*, *ribH*, y *ribT*. Además de *RibT*, se conoce la función y la actividad catalítica de todos los productos génicos. El riborregulador de la secuencia líder en 5' es capaz de unirse a flavin monofosfato (FMN). Tras la unión a FMN, un repliegamiento de la líder evita la transcripción posterior de los cinco genes en el operón *rib*. En ausencia de FMN, la estructura del riborregulador permite la transcripción de los cinco genes *rib*, y consiguientemente la síntesis de riboflavina.

En una realización, la presente invención se refiere a la producción fermentativa de biotina. Como se usa aquí, el término "biotina" incluye, pero no se limita a, biotina, precursores y/o derivados de biotina. Los ejemplos de tales precursores se seleccionan de ácido pimélico, pimelil-CoA, ácido 7-ceto-8-amino-pelargónico (7-KAP), ácido 7,8-diamino-pelargónico (DAPA) o destiobiotina (DTB). Se conocen los genes implicados en la biosíntesis de biotina, así

como métodos para la producción fermentativa de biotina (véanse, por ejemplo, los documentos EP 635572 o EP 892066 o Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo Vitaminas). Estos métodos también se pueden aplicar para la producción de biotina usando un elemento estabilizador del ARNm como se describe aquí.

5 En una realización adicional, el producto de fermentación diana es ácido pantoténico (vitamina B5). Como se usa aquí, la expresión "ácido pantoténico" incluye, pero no se limita a, ácido pantoténico, precursores y/o derivados del mismo tales como sales o ésteres del mismo, es decir, pantotenato, en particular pantotenato de calcio, o la forma alcohólica de ácido pantoténico, es decir, pantotenol o pantenol. Las expresiones "ácido pantoténico", "pantotenato" y "vitamina B5" se usan aquí de forma intercambiable. Los precursores/intermedios en la ruta biosintética de ácido
10 pantoténico que se incluyen se pueden seleccionar de, por ejemplo, pantoato, α -cetopantoato o α -cetoisovalerato. Se conocen los genes implicados en la biosíntesis del ácido pantoténico, así como métodos para la producción fermentativa de ácido pantoténico (véanse, por ejemplo, los documentos WO 01/21772, WO 02/057474, WO 02/061108 o Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo Vitaminas). Estos métodos también se pueden aplicar para la producción de ácido pantoténico usando un elemento estabilizador del ARNm como se describe aquí.
15

En otra realización, el producto de fermentación diana es ácido fólico. Como se usa aquí, la expresión "ácido fólico" incluye, pero no se limita a, ácido fólico y precursores/derivados del mismo, tales como por ejemplo folato, guanosina 5'-trifosfato (GTP), ácido p-aminobenzoico, ácido L-glutámico, tri-/mono-fosfato de dihidropterina, dihidropterina, hidroximetildihidropterina, pirofosfato de hidroximetildihidropterina, ácido dihidroptérico, y ácido
20 dihidrofólico. Se conocen los genes implicados en la biosíntesis de ácido fólico, así como métodos para la producción fermentativa de ácido fólico (véase, por ejemplo, Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo Vitaminas). Estos métodos también se pueden aplicar para la producción de ácido fólico usando un elemento estabilizador del ARNm como se describe aquí.

En una realización adicional, el producto de fermentación diana es tiamina. Como se usa aquí, el término "tiamina" incluye, pero no se limita a, tiamina, monofosfato de tiamina (TMP), pirofosfato de tiamina, y precursores/derivados de los mismos, tales como, por ejemplo, 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina (HMP), 5-(2-hidroxietil)-4-metiliazol (HET), y una combinación de los mismos. Además, se incluyen precursores y/o derivados de la ruta de HMP y/o de HET, tales como, por ejemplo, glicina, cisteína, isoleucina, treonina, 5-aminoimidazol ribótido (AIR) o 4-amino-2-metil-5-pirimidinmetanamina (Diamina de Grewe). Se conocen los genes implicados en la biosíntesis de tiamina, así
25 como los métodos para la producción fermentativa de tiamina (véanse, por ejemplo, el documento WO 2004/106557, o Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo Vitaminas). Estos métodos también se pueden aplicar para la producción de tiamina usando un elemento estabilizador del ARNm como se describe aquí.
30

En una realización, el producto de fermentación diana es piridoxina (vitamina B6). Como se usa aquí, el término "piridoxina" incluye, pero no se limita a, piridoxina, piridoxol, piridoxal, piridoxamina, y precursores/derivados de los mismos, tales como, por ejemplo, piridoxal 5'-fosfato. Los términos "piridoxina" y "vitamina B6" se usan de forma intercambiable aquí. Se conocen los genes implicados en la biosíntesis de piridoxina, así como métodos para la
35 producción fermentativa de piridoxina (véanse, por ejemplo, Mittenhuber, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3(1), p. 1-20, 2001 o el documento EP 950715 o Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo Vitaminas). Estos métodos también se pueden aplicar para la producción de piridoxina usando un elemento estabilizador del ARNm como se describe aquí.
40

En consecuencia, la invención se refiere al uso de un polipéptido para la producción de un producto de fermentación diana, seleccionándose dicho polinucleótido del grupo que consiste en:

- (a) polinucleótidos que comprenden la secuencia nucleotídica según SEC ID NO:2; y
 - (b) polinucleótidos que son al menos 95% idénticos a un polinucleótido como se define en uno cualquiera de
45 (a) y que tiene la actividad de un elemento estabilizador del ARNm
- o
- la hebra complementaria de tal polinucleótido.

En particular, la invención se refiere a un procedimiento para la producción de un producto de fermentación diana con un microorganismo, en el que dicho microorganismo se incuba en un medio acuoso en condiciones que
50 permiten la producción de dicho producto de fermentación diana a partir de una fuente de carbono, y en el que opcionalmente el producto de fermentación diana se aísla como el producto de fermentación, en el que dicho microorganismo se altera genéticamente mediante introducción de un polinucleótido que conduce a un rendimiento y/o eficiencia mejorados de la producción del producto de fermentación diana producido mediante dicho microorganismo, seleccionándose dicho polinucleótido del grupo que consiste en:

- (a) polinucleótidos que comprenden la secuencia nucleotídica según SEC ID NO:2; y
- (b) polinucleótidos que son al menos 95% idénticos a un polinucleótido como se define en uno cualquiera de

(a) y que tiene la actividad de un elemento estabilizador del ARNm

o

la hebra complementaria de tal polinucleótido.

Se encontró que la secuencia de ácido nucleico como se describe aquí y como se aísla a partir de *Bacillus subtilis* mostrada en SEC ID NO:2 es particularmente útil en la estabilización del ARNm, y de este modo es útil en la producción de un producto de fermentación diana como se describe anteriormente en un microorganismo, en particular bacterias, tales como bacterias grampositivas y gramnegativas, tales como por ejemplo *Bacillus*.

La expresión "elemento estabilizador del ARNm", como se usa aquí, se refiere a una secuencia de ADN que, al introducirla en la región no traducida de 5', por ejemplo en dirección 3' del comienzo de la transcripción del gen respectivo, es capaz de proporcionar una mayor estabilidad al ARNm que se transcribe a partir del gen respectivo que comprende dicho "elemento estabilizador del ARNm". El elemento estabilizador del ARNm contiene preferiblemente 1 o más tallo bucles, pero también puede no contener ningún bucle en absoluto.

La presente invención proporciona secuencias de ARNm estabilizado. El ARNm estabilizado se transcribe a partir de un gen endógeno que contiene una secuencia de ADN como se define anteriormente que se introduce en dirección 3' del comienzo de la transcripción del gen o genes relevantes. Este gen puede estar implicado en la producción de un producto de fermentación diana deseado como se describe anteriormente. El elemento estabilizador del ARNm se puede introducir directamente en dirección 3' del comienzo de la transcripción, o 1 o más nucleótidos en dirección 3' del mismo. La introducción de dicho elemento estabilizador del ARNm tiene el efecto de que el ARNm ya no es accesible, o es menos accesible, a la degradación enzimática, y de este modo da como resultado una mayor producción/rendimiento/eficiencia del producto de fermentación diana deseado.

Cualquier secuencia de ácido nucleico capaz de formar uno o más tallo bucles que conducen a una mayor estabilidad de los transcritos de ARNm a partir de uno o más genes diana que están implicados preferiblemente en la producción de un producto de fermentación diana deseado como se define anteriormente puede estar dentro del alcance de la presente invención. La estabilización del ARNm también puede ser posible vía el sitio de unión al ribosoma (RBS) fuerte que no forma necesariamente un bucle, como por ejemplo en el caso de SEC ID NO:5 o SEC ID NO:20.

De este modo, la presente invención se refiere a elementos estabilizadores del ARNm introducidos en el extremo 5' de un gen endógeno que, con la transcripción, da como resultado transcritos de ARNm estabilizados, es decir, que son capaces de incrementar la estabilidad de los transcritos del ARNm.

Un ácido nucleico se puede obtener mediante amplificación del ácido nucleico usando como molde, por ejemplo, ADNc, ARNm, o, como alternativa, ADN genómico, y cebadores oligonucleotídicos apropiados tales como los cebadores nucleótidos según SEC ID NO:6/SEC ID NO:7, SEC ID NO:8/SEC ID NO:9, SEC ID NO:10/SEC ID NO:11, SEC ID NO:12/SEC ID NO:13 y SEC ID NO:14/SEC ID NO:15, respectivamente, según técnicas de amplificación mediante PCR estándar, tales como, por ejemplo, según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector apropiado y se puede caracterizar mediante análisis de secuencia de ADN. El ADN sintético también se puede usar como molde para tal PCR.

El ADN molde puede derivar de la misma célula hospedante o de una diferente a usar para la producción del producto de fermentación diana deseado. Además, el molde para la reacción puede ser ADNc obtenido mediante transcripción inversa de ARNm preparado a partir de cepas que se sabe o que se sospecha que comprenden un polinucleótido según la invención. El producto de la PCR se puede subclonar y secuenciar para asegurarse de que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una nueva secuencia de ácido nucleico como se describe aquí, o un equivalente funcional de la misma. Además, una secuencia de ácido nucleico según la presente invención se puede sintetizar completa o parcialmente usando métodos bien conocidos en la técnica.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos y a su uso para la producción de un producto de fermentación diana como se define aquí. La invención también se refiere a polinucleótidos y a su uso para la producción de un producto de fermentación diana como se define aquí que son al menos 95% idénticos a un polinucleótido como se define aquí y que tiene la actividad de un elemento estabilizador del ARNm; y la invención también se refiere a polinucleótidos que son la hebra complementaria de un polinucleótido como se define aquí anteriormente.

Se pueden usar cebadores, sondas y fragmentos para amplificar o detectar un ADN según la invención, así como su uso para la producción de un producto de fermentación diana como se define aquí.

Los elementos estabilizadores del ARNm como se definen anteriormente pueden tener cualquier longitud, pero preferiblemente consisten en al menos 15 nucleótidos, más preferiblemente al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 nucleótidos, lo más preferible 39-87 nucleótidos, que comprenden preferiblemente 1 o más tallo bucles, en particular 1 o 2 tallo bucles. El tallo puede consistir en al menos 4 pares de bases, preferiblemente al menos 8, 10, 12, 15 pares de bases (estando presentes de forma posible nucleótidos desemparejados/bucles interiores y/o bucles

sobresalientes), y los bucles pueden consistir en, por ejemplo, 3-30 nucleótidos no unidos, preferiblemente 4, 6, 8, 10, 11, 14, 15, 25 o más nucleótidos. La longitud de los bucles interiores es preferiblemente 2, 4, 6, 8, 10, 12 nucleótidos no unidos. Puede estar presente uno o más bucles sobresalientes, que consisten en, por ejemplo, 1, 2 o incluso 6 nucleótidos no unidos. La estabilidad termodinámica calculada (ΔG) del tallo bucle se puede calcular según algoritmos desarrollados por Zuker (2003, *Nucleic Acids Res.* 31:3406-3415). En una realización, la estabilidad termodinámica calculada es -2,8 kcal/mol o menor, preferiblemente -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -15, -20 kcal/mol o menor. En otra realización de la presente invención, los elementos estabilizadores del ARNm pueden no comprender ningún bucle en absoluto.

La invención también se refiere a procedimientos para producir microorganismos genéticamente manipulados con un polinucleótido como se define anteriormente que son capaces de producir un transcrito de ARNm con estabilidad incrementada y/o mejorada.

La invención también se refiere a microorganismos, que se manipulan genéticamente con las secuencias de ácidos nucleicos como se definen anteriormente, así como a procedimientos para producir dichas células manipuladas genéticamente.

La presente invención también se refiere a microorganismos manipulados genéticamente en los que el rendimiento y/o eficiencia de la producción de un producto de fermentación diana como se define anteriormente está mejorada y/o potenciada, y a microorganismos en los que la estabilidad de un ARNm transcrito a partir de un gen implicado en la ruta biosintética de un producto de fermentación diana como se define anteriormente está incrementada y/o mejorada de manera que el rendimiento del producto de fermentación diana que se produce a partir de una fuente de carbono está incrementado.

Además, la invención se refiere al uso de secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo elementos estabilizadores del ARNm como se definen anteriormente, o al uso de un microorganismo manipulado genéticamente para la producción de un producto de fermentación diana como se define anteriormente.

La persona experta sabrá cómo generar tales células manipuladas genéticamente, en particular microorganismos, es decir, cómo introducir una secuencia de ADN de la presente invención como se define anteriormente que conduzca a transcritos estabilizados. La introducción de una secuencia de ADN como se usa aquí puede ser por ejemplo adición o inserción de una secuencia de ADN mediante transformación, conjugación o transducción en el cromosoma de una célula hospedante. Dicha adición o inserción se puede producir mediante recombinación de ADN que puede dar también o no una eliminación o supresión de nucleótidos del ADN cromosómico. Los métodos mediante los cuales se logra la introducción de secuencias de ADN en una célula hospedante, por ejemplo microorganismos, especialmente mediante introducción específica del sitio, son bien conocidos en la técnica, y se describen por ejemplo en Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N. Y.; and Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.). La secuencia de ADN capaz de formar uno o más tallobucles se pueden introducir en dirección 3' del comienzo de la transcripción, en particular al menos 1, 2, 3, 5, 6, 7 o más, por ejemplo 8, 9, 10, 11, 12, 13 nucleótidos en dirección 3' del sitio del comienzo de la transcripción del gen o genes relevantes implicados en la biosíntesis de un producto de fermentación diana deseado. El número y tipo de cambios nucleotídicos están limitados por el hecho de que no se forma una secuencia que representa un sitio de escisión de nucleasas específico de ARNasa E. El mismo método también se aplica a elementos que no forman ningún bucle.

La estabilidad de los transcritos del ARNm se puede medir, por ejemplo, mediante determinación de la semivida del ARNm usando transferencia Northern y/o estabilización mediante PCR en tiempo real como se describe, por ejemplo, por Allenby et al., *Microbiology*, 150, p. 2619-2628 (2004) o Sharp y Bechhofer, *Mol. Microbiol.* 57, 484-495 (2005). Como se usa aquí, la estabilidad del ARNm se incrementa (o la degradación del ARNm se reduce/bloquea) si la semivida de dicho ARNm se incrementa en al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200%, o incluso más de 500%, en comparación con la semivida del ARNm transcrito a partir de un gen de tipo salvaje, es decir, que no contiene un elemento estabilizador del ARNm como la presente invención.

La invención se puede llevar a cabo en/con cualquier microorganismo que porte el gen o genes implicados en la biosíntesis de los productos de fermentación diana definidos anteriormente. Los microorganismos adecuados se pueden seleccionar, por ejemplo, de bacterias, hongos (incluyendo levadura) y algas. El término "bacterias" incluye microorganismos gramnegativos y grampositivos. Las bacterias adecuadas se pueden seleccionar, por ejemplo, de *Escherichia*, *Glarconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* o *Streptomyces*. Preferiblemente, el microorganismo o célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. punitis*, *B. halodurans*, *B. pumilus*, *G. oxydans*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Pseudomonas zeaxanthinifaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *E. coli*, *C. glutamicum*, *Streptomyces lividans*, *Sinorhizobium melioli* y *Rhizobium radiobacter*. Los ejemplos de levaduras son *Saccharomyces*, particularmente *S. cerevisiae*, *Pichia* o *Candida*. Los ejemplos de otros hongos preferidos son *Aspergillus* y *Penicillium*, en particular *A. niger* y *P. chrysogenum*.

Los microorganismos que se pueden usar para la presente invención pueden estar públicamente disponibles de

diferentes fuentes, por ejemplo Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, IL, USA, Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón (antiguamente: Institute for Fermentation, Osaka (IFO), 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón), o del *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC), The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 USA. Un ejemplo de una bacteria preferida es, por ejemplo, *B. subtilis* 1A747 obtenible de BGSC, que es un derivado de *B. subtilis* 168.

En relación con el procedimiento anterior que usa un microorganismo, se entiende que los microorganismos mencionados anteriormente también incluyen sinónimos o basónimos de tales especies que tienen las mismas propiedades fisiológicas, como se define por el Código Internacional de Nomenclatura de Procariotas. La nomenclatura de los microorganismos, como se usa aquí, es la aceptada oficialmente (en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad) por el Comité Internacional sobre Sistemática de Procariotas y la División de Bacteriología y Microbiología Aplicada de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas, y publicada por su vehículo de publicación oficial International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM).

Los ejemplos de cepas preferidas para la producción de, por ejemplo, riboflavina se seleccionan de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. ammoniagenes*, *E. coli* y *C. glutamicum*. Una cepa más preferida es *B. subtilis* RB50::[pRF69]_n que contiene múltiples (n) copias (por ejemplo alrededor de 5 a alrededor de 20 copias) de pRF69 que codifica un operón *rib* modificado con el promotor SPO1 fágico fuerte (*P*₁₅) para potenciar la transcripción de los genes *rib* (véase por ejemplo el documento EP 405370 y Perkins et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 22:8-18, 1999, para la construcción de la cepa y las condiciones de cultivo para dar como resultado la producción de riboflavina. *B. subtilis* RB50 y el plásmido pRF69 pueden estar disponibles de NRRL (número de acceso B 18502) y de ATCC (número de acceso ATCC 68338), respectivamente. De este modo, en una realización, las cepas preferidas mencionadas anteriormente, tales como, por ejemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. ammoniagenes*, *E. coli* o *C. glutamicum*, se alteran genéticamente mediante introducción de un elemento estabilizador del ARNm tal como, por ejemplo, se identifica en SEC ID NO:2, y tales cepas alteradas se usan para la producción de riboflavina. La construcción de tal cepa se lleva a cabo como se ejemplifica en la Figura 1, en la que los genes del operón de pantotenato (*panB*, *panC*, *panD*) se sustituyen por los genes correspondientes del operón de riboflavina (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 1 y 2).

Los ejemplos de cepas preferidas para la producción de, por ejemplo, biotina se seleccionan de *B. subtilis*, *B. sphaericus* y *E. coli*, más preferiblemente cepas disponibles de ATCC, tales como por ejemplo *B. subtilis* PA3, HB43, HB3, BI544, BI535, BI421, BI304, BI282, y BI274 (números de acceso ATCC 55567 a ATCC 55575), como se describe en el documento EP 635572. De este modo, en una realización, las cepas preferidas mencionadas anteriormente, tales como por ejemplo *B. subtilis*, *B. sphaericus* o *E. coli*, se alteran genéticamente mediante introducción de un elemento estabilizador del ARNm tal como se identifica por ejemplo en SEC ID NO:2, y tales cepas alteradas se usan para la producción de biotina. La construcción de tal cepa se lleva a cabo como se ejemplifica en la Figura 1, en la que los genes del operón de pantotenato (*panB*, *panC*, *panD*) se sustituyen por los genes correspondientes del operón de biotina (para más detalles, véanse por ejemplo los Ejemplos 1 y 2).

Los ejemplos de cepas preferidas para la producción de, por ejemplo, ácido pantoténico se seleccionan de *B. subtilis*, tales como *B. subtilis* 168, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. puntis*, *B. halodurans* y *C. glutamicum*. De este modo, en una realización, las cepas preferidas mencionadas anteriormente, tales como por ejemplo *B. subtilis* 168, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. puntis*, *B. halodurans* o *C. glutamicum*, se alteran genéticamente mediante introducción de un elemento estabilizador del ARNm tal como se identifica por ejemplo en SEC ID NO:2, y tales cepas alteradas se usan para la producción de ácido pantoténico. La construcción de tal cepa se lleva a cabo como se ejemplifica en la Figura 1.

Los ejemplos de las cepas preferidas para la producción de, por ejemplo, tiamina se seleccionan de *B. subtilis* y *E. coli*, más preferiblemente cepas según se depositan bajo los términos del Tratado de Budapest con ATCC y DSMZ, respectivamente, tales como por ejemplo *B. subtilis* TH95, *B. subtilis* TH101, *B. subtilis* TH115, *B. subtilis* TH116 (números de acceso ATCC PTA-5221 a ATCC PTA-5224) o *B. subtilis* TH404 y *B. subtilis* TH405 (números de acceso DSM 16333 y 16334). De este modo, en una realización, las cepas preferidas mencionadas anteriormente, tales como por ejemplo *B. subtilis* o *E. coli*, se alteran genéticamente mediante introducción de un elemento estabilizador del ARNm tal como se identifica en SEC ID NO:2, y tales cepas alteradas se usan para la producción de tiamina. La construcción de tal cepa se lleva a cabo como se ejemplifica en la Figura 1, en la que los genes del operón de pantotenato (*panB*, *panC*, *panD*) se sustituyen por los genes correspondientes implicados en la biosíntesis de tiamina (para más detalles, véanse por ejemplo los Ejemplos 1 y 2). Se conocen los genes implicados en la biosíntesis de tiamina; véase, por ejemplo, Schyng et al., Journal Bacteriology, vol. 187, No. 23, p. 8127-8136, 2005).

Los ejemplos de cepas preferidas para la producción de, por ejemplo, piridoxina se seleccionan de *B. sarbtillis*, *E. coli*, *S. melioli*, *P. putida*, *L. brevis*, *F. indolgenes*, *C. ammoniagenes*, *C. glutamicum*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *E. cloacae*, *P. maltophila*, más preferiblemente cepas disponibles de NITE Biological Resource Center, tales como por ejemplo *Sinorhizobium melioli* (número de acceso IFO 14782 o DSM 10226), *Flavobacterium indologenes* (número de acceso IFO 14944), *Lactobacillus brevis* (número de acceso IFO 13110), *Bacillus subtilis*

(número de acceso IFO 3007), *Klebsiella planticola* (número de acceso IFO 3317), *Escherichia coli* (número de acceso IFO 13168), *Pseudomonas putida* (número de acceso IFO 3738), *Pseudomonas maltophila* (número de acceso IFO 12692), *Enterobacter cloacae* (número de acceso IFO 3320), *Corynebacterium ammoniagenes* (número de acceso IFO 12612), *Corynebacterium glutamicum* (número de acceso IFO 12168), *Brevibacterium acetyllicum* (número de acceso IFO 12146), *Pichia guilliermondii* (número de acceso IFO 10106), *Saccharomyces cerevisiae* (números de acceso IFO 0304 y IFO 0306) y *Candida tropicalis* (números de acceso IFO 0199 y IFO 0587). De este modo, en una realización, las cepas preferidas mencionadas anteriormente, tales como por ejemplo *B. subtilis*, *E. coli*, *S. melioli*, *P. putida*, *L. brevis*, *F. indolgenes*, *C. ammoniagenes*, *C. glutamicum*, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*, *E. cloacae* o *P. maltophila*, se alteran genéticamente mediante introducción de un elemento estabilizador del ARNm tal como se identifica por ejemplo en SEC ID NO:2, y tales cepas alteradas se usan para la producción de piridoxina. La construcción de tal cepa se lleva a cabo como se ejemplifica en la Figura 1, en la que los genes del operón de pantotenato (*panB*, *panC*, *panD*) se sustituyen por los genes correspondientes implicados en la biosíntesis de piridoxina (para más detalles, véanse por ejemplo los Ejemplos 1 y 2). Se conocen los genes implicados en la biosíntesis de piridoxina; véase, por ejemplo, Mittenhuber, Journal Mol. Microbiol. Biotechnol. 3(1), p. 1-20, 2001.

La invención también se refiere a procedimientos para la expresión de gen o genes endógenos implicados en la biosíntesis de un producto de fermentación diana como por ejemplo se define anteriormente en un microorganismo, en el que el ARNm transcrito a partir de dicho gen o genes tiene una mayor estabilidad. Esta mayor estabilidad se logra mediante la introducción de un elemento estabilizador del ARNm como se define anteriormente en el microorganismo. Como resultado, el ARNm así generado es más estable que el ARNm generado a partir del gen de tipo salvaje correspondiente.

La presente invención también se refiere a la producción de microorganismos capaces de producir el producto de fermentación diana, en el que la productividad y/o rendimiento de dicho producto de fermentación diana se incrementa en comparación con el organismo de tipo salvaje. Este incremento se obtiene alterando dicho microorganismo mediante la introducción de un polinucleótido de la presente invención de manera que el microorganismo produce un ARNm más estable.

De este modo, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un producto de fermentación diana con un microorganismo, en el que dicho microorganismo se incuba en un medio acuoso en condiciones que permiten la producción de dicho producto de fermentación diana a partir de una fuente de carbono, y en el que opcionalmente el producto de fermentación diana se aísla como el producto de fermentación, en el que dicho microorganismo se altera genéticamente mediante introducción de un polinucleótido como se define anteriormente que conduce a un rendimiento y/o eficiencia mejorados de la producción del producto de fermentación diana producido por dicho microorganismo.

Además, la presente invención describe un procedimiento para la producción de ARNm con mayor estabilidad transcrito a partir de un gen implicado en la ruta biosintética de un producto de fermentación diana en un microorganismo, comprendiendo dicho microorganismo un polinucleótido como se define anteriormente introducido en dirección 3' del comienzo de la transcripción del gen o genes respectivos. Los microorganismos adecuados y el gen o genes diana putativos se dan anteriormente.

Como una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un microorganismo capaz de producir un producto de fermentación diana, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de alterar dicho microorganismo mediante introducción de un polinucleótido como se define anteriormente de manera que el microorganismo produce un ARNm estabilizado que conduce a un rendimiento y/o eficiencia de producción mejorados del producto de fermentación diana producido por dicho microorganismo, así como a un procedimiento para la producción de un microorganismo en el que se incrementa la estabilidad del ARNm transcrito a partir de dicho gen endógeno, que comprende la etapa de alterar dicho microorganismo mediante introducción de un polinucleótido como se define anteriormente en dirección 3' del comienzo de la traducción del gen endógeno respectivo.

Todos estos procedimientos pueden comprender la etapa de alterar un microorganismo, en el que "alterar", como se usa aquí, engloba el proceso de "alterar genéticamente" de tal manera que se puede mejorar (i) el rendimiento y/o productividad del producto de fermentación y/o (ii) la estabilidad de un transcrito de ARNm, en comparación con el organismo de tipo salvaje. Esto se logra introduciendo una secuencia de ácido nucleico como se define anteriormente en el organismo respectivo.

La expresión "manipulado genéticamente" o "alterado genéticamente" significa la alteración científica de la estructura del material genético en un organismo vivo. Implica la producción y uso de ADN recombinante. Más en particular, se usa para distinguir el organismo genéticamente manipulado o modificado del organismo de origen natural. La manipulación genética se puede realizar mediante un número de técnicas conocidas en la técnica, tales como por ejemplo sustitución génica, amplificación génica, interrupción, adición, inserción, supresión, transfección o transformación de genes usando plásmidos, virus, u otros vectores. Un organismo modificado genéticamente, por ejemplo un microorganismo modificado genéticamente, también se denomina a menudo como un organismo recombinante, por ejemplo microorganismo recombinante.

La secuencia de ácido nucleico como se define en SEC ID NO:2 se determinó secuenciando un clon genómico obtenido de *B. subtilis*.

5 Los fragmentos/derivados pueden consistir en 1 o más, en particular 1 o 2, tallo-bucle(s). Un ejemplo de tal fragmento se muestra en SEC ID NO:16, 17, 18, o 19. Tales fragmentos también pueden no consistir en ningún bucle en absoluto, como se ejemplifica en SEC ID NO:20.

Los ácidos nucleicos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en forma aislada, y preferiblemente purificados hasta homogeneidad.

10 El término "aislada" significa que el material se retira de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido de origen natural presente en un microorganismo vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido, separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector, y/o tales polinucleótidos podrían ser parte de una composición, y todavía pueden estar aislados por cuanto tal vector o composición no es parte de su entorno natural.

15 Como se usa aquí, el término "gen" se refiere a moléculas de ácido nucleico que pueden estar aisladas del ADN cromosómico, que incluyen un marco de lectura abierto que codifica una proteína, por ejemplo proteínas implicadas en la síntesis del producto de fermentación diana deseado, tales como por ejemplo enzimas de la ruta biosintética de riboflavina de *B. subtilis*.

20 Un gen puede incluir secuencias codificantes, secuencias no codificantes tales como por ejemplo secuencias no traducidas situadas en los extremos 3' y 5' de la región codificante de un gen, tales como por ejemplo regiones promotoras, regiones reguladoras y regiones terminadoras, importantes para la expresión y estabilización apropiadas del polipéptido derivado de ellas.

25 Como se usa aquí, el término "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados usando análogos nucleotídicos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. El ácido nucleico se puede sintetizar usando análogos o derivados oligonucleotídicos (por ejemplo, nucleótidos de inosina o de fosforotioato). Tales oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen capacidades de emparejamiento de bases alteradas, o mayor resistencia a nucleasas.

30 Excepto que se indique de otro modo, todas las secuencias nucleotídicas determinadas mediante secuenciación de una molécula de ADN aquí se determinaron usando un secuenciador de ADN automatizado. Por lo tanto, como se conoce en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada mediante este enfoque automatizado, cualquier secuencia nucleotídica determinada aquí puede contener algunos errores. Las secuencias nucleotídicas determinadas mediante automatización son típicamente al menos alrededor de 90% idénticas, más típicamente al menos alrededor de 95% hasta al menos alrededor de 99,9% idénticas a la secuencia nucleotídica real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real se puede determinar de forma más precisa mediante otros enfoques, incluyendo métodos de secuenciación de ADN manuales bien conocidos en la técnica.

35 La persona experta en la técnica es capaz de identificar tales bases identificadas erróneamente, y sabe cómo corregir tales errores.

40 Una molécula de ácido nucleico puede comprender solamente una porción o un fragmento de la secuencia de ácido nucleico proporcionada por la presente invención, tal como por ejemplo la secuencia mostrada en SEC ID NO:2, por ejemplo un fragmento que se puede usar como una sonda o cebador, tal como por ejemplo SEC ID NO:8, 9, o un fragmento que consiste en el tallo y uno o más bucles del elemento estabilizador del ARNm, tal como se muestra por ejemplo en SEC ID NO:17, o un fragmento sin un bucle. La sonda/cebador comprende típicamente oligonucleótidos sustancialmente purificados que comprenden típicamente una región de secuencia nucleotídica que se hibrida preferiblemente en condiciones muy restrictivas a al menos alrededor de 12 o 15, preferiblemente alrededor de 18 o 20, más preferiblemente alrededor de 22 o 25, incluso más preferiblemente alrededor de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 45 65, o 75 o más nucleótidos consecutivos de una secuencia nucleotídica mostrada en SEC ID NO:2 o un fragmento o derivado de la misma.

50 Una molécula de ácido nucleico que engloba toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico de SEC ID NO:1 se puede aislar también mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores oligonucleotídicos sintéticos diseñados basándose en la información de secuencia contenida aquí.

En una realización, un ácido nucleico de la invención es al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más homólogo a una secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID NO:2 o el complemento de la misma.

55 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, tal como por ejemplo una molécula de ácido nucleico mostrada en SEC ID NO:2, se puede aislar usando técnicas de biología molecular estándar y la información de secuencia proporcionada aquí. Por ejemplo, usando toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEC ID NO:2 como sonda de hibridación, se pueden aislar moléculas de ácidos nucleicos según la invención

usando técnicas estándar de hibridación y clonación (por ejemplo, como se describen en Sambrook et al., más arriba).

Además, los oligonucleótidos que corresponden a o que se pueden hibridar a secuencias nucleotídicas según la invención se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo usando un sintetizador de ADN automatizado.

Los términos "homología" o "porcentaje de identidad" se usan aquí de forma intercambiable. Para los fines de esta invención, se define aquí que a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia de ácido nucleico para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de ácido nucleico). Entonces se comparan los nucleótidos en las posiciones correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias [es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir, posiciones que solapan) x 100]. Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La persona experta estará al tanto del hecho de que existen varios programas de ordenador diferentes para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48, 444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.accelrys.com>), que usa una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. La persona experta apreciará que todos estos parámetros diferentes producirán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje global de identidad de dos secuencias no se ve alterado significativamente cuando se usan algoritmos diferentes.

En todavía otra realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias nucleotídicas se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.accelrys.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacio de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra realización, el porcentaje de identidad entre dos secuencias nucleotídicas se determina usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4: 11-17, 1989) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) (disponible en <http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>), que usa una tabla de restos ponderales de PAM120, una penalización de longitud de espacio de 12 y una penalización de espacio de 4.

Las secuencias de ácidos nucleicos, es decir, los elementos estabilizadores del ARNm, según la presente invención se pueden enlazar de forma operativa a un promotor apropiado, que puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. El promotor será el natural, o un promotor que no está originalmente enlazado de forma natural al gen o genes respectivos implicados en la biosíntesis de un producto de fermentación diana. La persona experta sabrá cómo seleccionar promotores adecuados. Los constructos de expresión pueden contener sitios para el inicio de la transcripción, para la terminación, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos puede incluir preferiblemente un codón de iniciación al comienzo y un codón de terminación situado apropiadamente en el extremo del polipéptido a traducir.

Los promotores adecuados para la expresión de gen o genes respectivos implicados en la biosíntesis de un producto de fermentación diana deseado útiles para la presente invención se pueden encontrar en la bibliografía, véanse, por ejemplo, los documentos EP 405370, EP 635572, WO 01/21772, WO 04/106557, EP 950715 o WO 03/062409 para promotores usados en la producción fermentativa de riboflavina, biotina, ácido pantoténico, piridoxina, y enzimas seleccionadas de transferasas o hidrolasas, respectivamente.

Un método útil para construir un microorganismo según la presente invención, es decir, introducir un elemento estabilizador del ARNm en dirección 3' del comienzo de la transcripción de un gen implicado en la producción de un producto de fermentación diana deseado se muestra en la Figura 1, en el que el gen o genes en dirección 3' del promotor puede ser cualquier gen implicado en la biosíntesis del producto de fermentación diana deseado, tal como, por ejemplo, panB, bioA, ribD, amyQ, en el que la introducción de un elemento estabilizador del ARNm descrito aquí conduce a transcritos de ARNm más estables a partir del gen o genes respectivos que conduce además a un mayor rendimiento y/o productividad del producto de fermentación diana respectivo. Las secuencias de dicho gen o genes implicados en la biosíntesis de los productos deseados están públicamente disponibles como conoce la persona experta. La selección de microorganismos recombinantes se puede llevar a cabo vía introducción de un gen resistente a antibióticos, tal como por ejemplo cloranfenicol, neomicina, estreptomycin, espectinomycin o similar. Opcionalmente, el promotor natural puede sustituirse además por uno más fuerte, tal como, por ejemplo, el promotor fuerte constitutivo P₁₅.

Como se menciona anteriormente, las secuencias de ácidos nucleicos según la presente invención se pueden utilizar en ingeniería genética de una célula hospedante adecuada para hacerla mejor y más eficiente en la

fermentación, por ejemplo en la producción de un producto de fermentación diana como se define aquí.

Según la invención, una célula hospedante manipulada genéticamente/producida recombinantemente (también denominada como célula recombinante o célula transformada) que porta tal elemento estabilizador del ARNm según la presente invención, de manera que se mejora el rendimiento, la producción y/o la eficiencia de producción de un producto de fermentación diana, en particular vitaminas o enzimas como se definen aquí. La célula hospedante se puede seleccionar de un microorganismo capaz de producir dicho producto de fermentación diana, tal como por ejemplo vitamina B2, ácido pantoténico a partir de una fuente de carbono dada, en particular *Bacillus*, preferiblemente *B. subtilis*.

Una "célula transformada" o "célula recombinante" es una célula en la que (o en cuyo ancestro) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico según la invención que conduce a una estabilidad incrementada y/o potenciada del ARNm transcrito a partir del gen o genes respectivos. Las células hospedantes adecuadas incluyen células de microorganismos capaces de producir un producto de fermentación dado, por ejemplo convertir una fuente de carbono dada en un producto diana como se define anteriormente. Las cepas útiles para llevar a cabo dicho procedimiento de fermentación se dan anteriormente y son conocidas en la técnica.

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de un producto de fermentación diana tal como, por ejemplo, riboflavina, biotina, ácido pantoténico, ácido fólico, tiamina, piridoxina, en el que la producción/rendimiento de dichos productos de fermentación diana usando un organismo recombinante se incrementa en comparación con un organismo no modificado. Como se usa aquí, "rendimiento mejorado de producto de fermentación diana" significa un incremento de al menos 5%, 10%, 25%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200% o incluso más de 500%, en comparación con un microorganismo de tipo salvaje, es decir, un microorganismo no modificado.

En un procedimiento de la presente invención, es decir, un procedimiento para la producción de un producto de fermentación diana como se menciona anteriormente, se pueden usar varios sustratos como fuente de carbono. Las fuentes de carbono particularmente adecuadas se pueden seleccionar de compuestos que consisten en 3, 5 o 6 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, D-glucosa, glicerol, zumo espeso, dextrosa, almidón, sacarosa o ribosa. Preferiblemente, la fuente de carbono es D-glucosa. La expresión "fuente de carbono", "sustrato" y "sustrato de producción", en relación con el procedimiento anterior que usa un microorganismo, se usa de forma intercambiable aquí.

Un medio como se usa aquí para el procedimiento anterior que usa un microorganismo puede ser cualquier medio adecuado para la producción del producto de fermentación diana deseado. Típicamente, el medio es un medio acuoso que comprende por ejemplo sales, sustrato o sustratos, y un cierto pH. El medio en el que el sustrato se convierte en el producto deseado también se denomina como medio de producción.

"Fermentación" o "producción" o "procedimiento de fermentación", como se usa aquí, puede ser el uso de células en crecimiento que usan medios, condiciones y procedimientos conocidos por la persona experta, o el uso de denominadas células en reposo que no crecen, después de que se han cultivado usando medios, condiciones y procedimientos conocidos por la persona experta, en condiciones apropiadas para la conversión de sustratos adecuados en productos deseados tales como por ejemplo vitaminas o enzimas.

En una realización, un microorganismo es capaz de convertir cierto sustrato en el producto especificado por medio de una o más etapas de conversión biológica, sin la necesidad de ninguna etapa de conversión química adicional. Dicho microorganismo se cultiva en condiciones que permiten tal conversión a partir del sustrato como se define anteriormente.

El producto de fermentación diana producido se puede recuperar de las células por cualquier medio adecuado. Recuperar significa por ejemplo que el producto de fermentación producido se puede separar del medio de producción. Opcionalmente, el producto de fermentación diana así producido se puede procesar adicionalmente.

En relación con el procedimiento anterior que usa un microorganismo, en un aspecto, la etapa de crecimiento se puede llevar a cabo en un medio acuoso, es decir, el medio de crecimiento, suplementado con nutrientes apropiados para el crecimiento normalmente en condiciones aerobias. El cultivo se puede realizar, por ejemplo, en modo discontinuo, alimentado-discontinuo, semicontinuo o continuo, en el que se prefiere el modo alimentado-discontinuo o semicontinuo. El periodo de cultivo puede variar dependiendo por ejemplo del hospedante, del producto de fermentación diana, del pH, de la temperatura y del medio nutriente a usar, y puede ser por ejemplo alrededor de 10 h a alrededor de 10 días, preferiblemente alrededor de 4 a alrededor de 7 días, más preferiblemente alrededor de 2 a alrededor de 6 días, dependiendo del microorganismo. Si el microorganismo se selecciona de bacterias, el cultivo se puede realizar por ejemplo a un pH de alrededor de 7,0, preferiblemente en el intervalo de alrededor de 6 a alrededor de 8, más preferiblemente alrededor de 6,5 a 7,5. Un intervalo de temperatura adecuado para llevar a cabo el cultivo usando bacterias puede ser por ejemplo de alrededor de 13°C a alrededor de 70°C, preferiblemente de alrededor de 35°C a alrededor de 39°C, más preferiblemente de alrededor de 30°C a alrededor de 39°C, y lo más preferible de alrededor de 36°C a alrededor de 39°C. El medio de cultivo para el crecimiento puede contener habitualmente nutrientes tales como fuentes de carbono asimilables, por ejemplo D-glucosa, glicerol, zumo espeso,

dextrosa, almidón, sacarosa o ribosa; y fuentes de nitrógeno digestibles tales como sustancias orgánicas, por ejemplo peptona, extracto de levadura y aminoácidos. Los medios pueden ser con o sin urea y/o licor de maceración del maíz y/o levadura de panadero. También se pueden usar como fuentes de nitrógeno diversas sustancias inorgánicas, por ejemplo nitratos y sales de amonio. Además, el medio de crecimiento puede contener habitualmente sales inorgánicas, por ejemplo sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato de potasio, y carbonato de calcio. Las células obtenidas usando los procedimientos descritos anteriormente se pueden incubar entonces adicionalmente a esencialmente los mismos modos, temperatura y condiciones de pH como se describen anteriormente, en presencia de sustratos tales como los descritos anteriormente, de tal manera que pueden convertir estos sustratos en el producto de fermentación diana deseado. La incubación se puede realizar en un medio rico en nitrógeno, que contiene, por ejemplo, fuentes de nitrógeno orgánico, por ejemplo peptona, extracto de levadura, levadura de panadero, urea, aminoácidos, y licor de maceración del maíz, o fuentes de nitrógeno inorgánico, por ejemplo nitratos y sales amónicas, en cuyo caso las células serán capaces de crecer adicionalmente mientras producen el producto de fermentación diana deseado. Como alternativa, la incubación se puede realizar en un medio pobre en nitrógeno, en cuyo caso las células no crecerán sustancialmente, y estarán en un modo de célula en reposo, o modo de biotransformación. En todos los casos, el medio de incubación también puede contener sales inorgánicas, por ejemplo sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, fosfato de potasio, y cloruro de calcio. Un ejemplo de un medio adecuado para la producción de un producto de fermentación diana deseado como se describe aquí se describe en el documento WO 04/113510 (medio VF), que es particularmente útil con respecto a *Bacillus*.

En la técnica se conocen métodos analíticos para determinar el rendimiento/productividad de un producto de fermentación diana dado. Tales métodos pueden incluir, pero no se limitan a, HPLC o el uso de cepas indicadoras: para riboflavina, véase por ejemplo Bretzel et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22, 19-26, 1999; para biotina, véase por ejemplo el documento EP 635572 o Tanaka et al., J. Micro. Methods 6, 237-247, 1987; para ácido pantoténico, véase por ejemplo el documento WO 04/113510; para ácido fólico, véase por ejemplo Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo Vitaminas; para tiamina, véase por ejemplo el documento WO 04/106557; para piridoxina, véase por ejemplo Tazoe et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 63 (8), 1378-1382, 1999.

Los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Figura 1: las 3 etapas diferentes para construir un microorganismo genéticamente alterado que porta un elemento estabilizador del ARNm (St) en dirección 3' de un promotor constitutivo fuerte P₁₅ vía LFH-PCR se ejemplifican para el operón de pantotenato (pan) que comprende los genes *panB*, *panC*, *panD* (panBCD). Para la selección de microorganismos recombinantes, se usa el gen de resistencia al antibiótico cloranfenicol (Cm). Para una mayor explicación, véanse los ejemplos.

Ejemplos

Los siguientes medios como se citan en los ejemplos se describen en el documento WO 04/106557: medio caldo de agar sangre con triptosa (TBAB), medio de caldo de infusión de ternera-extracto de levadura (VY), 10X sales Spizizen y Medio Mínimo (MM).

100X disolución A de oligoelementos: 12,5 g de MgCl₂·6H₂O; 0,55 g de CaCl₂; 1,35 g de FeCl₂·6H₂O; 0,1 g de MnCl₂·4H₂O; 0,17 g/l de ZnCl₂; 0,043 g de CuCl₂·2H₂O; 0,06 g de CoCl₂·6H₂O; 0,06 g de Na₂MoO₄·2H₂O; ad 11H₂O, en autoclave.

5X disolución de sal mínima: 0,057 M de K₂SO₄; 0,31 M de K₂HPO₄·5H₂O; 0,22 M de KH₂PO₄; 0,017 M de citrato de Na₂·7H₂O; 0,004 M de MgSO₄·H₂O, pH 7,0, en autoclave.

100X disolución B de oligoelementos: 0,55 g de CaCl₂; 0,17 g de ZnCl₂; 0,043 g de CuCl₂·2H₂O; 0,06 g de CoCl₂·6H₂O; 0,06 g Na₂MoO₄·2H₂O; ad 11H₂O, en autoclave.

Ejemplo 1: Integración del elemento estabilizador del ARNm *aprE*, *grpE*, *cotG*, SP82, RSBgsiB en dirección 3' del promotor nativo del operón de riboflavina (*rib*) y el promotor fuerte nativo de *rpsD*

La sobreproducción de proteína mediada por el elemento estabilizador del ARNm *aprE*, *grpE*, *cotG*, SP82 o RSBgsiB se ensayó vía inserción de dichos elementos estabilizadores del ARNm (SEC ID NO:1 a 5) entre el promotor nativo del operón *rib* (*P_{rib}*) y el gen informador *lacZ* en el primer conjunto de constructos. En un segundo conjunto de constructos, dichos elementos estabilizadores del ARNm se insertaron entre el promotor fuerte nativo de *rpsD* (*P_{rpsD}*) y el gen informador *lacZ*.

En primer lugar, se construyó el vector pBest4 que porta el gen informador *lacZ* y múltiples sitios de clonación (MCS): los oligonucleótidos pBestMCS+ (SEC ID NO:21) y pBestMCS- (SEC ID NO:22) que contienen el sitio de restricción *AscI* se hibridaron y clonaron en el plásmido pDG1728 digerido con *HindIII* y *BamHI* (ECE114; Guerout-Fleury et al., 1996, Gene 180:57-61; disponible de BGSC). El plásmido resultante pBest4 se usó para acomodar diez constructos sintéticos en el extremo 5' del gen informador *lacZ*, respectivamente.

En el primer conjunto de constructos con el promotor *P_{rib}* nativo, los cuatro fragmentos de ADN sintético contenían (i)

el promotor *rib* y el elemento estabilizador *aprE* ($P_{rib\Omega aprE}$; SEC ID NO:23); (ii) el promotor *rib* y el elemento estabilizador *grpE* ($P_{rib\Omega grpE}$; SEC ID NO:24); (iii) el promotor *rib* y el elemento estabilizador *cotG* ($P_{rib\Omega cotG}$; SEC ID NO:25); y (iv) solamente el promotor *rib* nativo (P_{rib} ; SEC ID NO:26) usado como control.

5 En el segundo conjunto de constructos con el promotor fuerte nativo P_{rpsD} , los seis fragmentos de ADN sintético contenían (i) el promotor *rpsD* y el elemento estabilizador *aprE* ($P_{rpsD\Omega aprE}$; SEC ID NO:27); (ii) el promotor *rpsD* y el elemento estabilizador *grpE* ($P_{rpsD\Omega grpE}$; SEC ID NO:28); (iii) el promotor *rpsD* y el elemento estabilizador *cotG* ($P_{rpsD\Omega cotG}$; SEC ID NO:29); (iv) el promotor *rpsD* y el elemento estabilizador SP82 ($P_{rpsD\Omega SP82}$; SEC ID NO:30); (v) el promotor *rpsD* y el elemento estabilizador RBSgsiB [RBSgsiB] ($P_{rpsD\Omega RBSgsiB}$; SEC ID NO:31); y (vi) solamente el promotor *rpsD* nativo (P_{rpsD} ; SEC ID NO:32) usado como control. En los constructos de ADN sintético (véase
10 anteriormente), los elementos estabilizadores del ARNm se insertaron 10 nucleótidos en dirección 3' del sitio del comienzo de la transcripción +1.

Los fragmentos de ADN sintético se sintetizaron y se clonaron a medida mediante DNA2.0 Inc. (Menlo Park, California, USA). Los fragmentos de ADN sintético mostrados en SEC ID NOs: 23, 25, 27, 29 y 31 se insertaron entre los sitios *Bam*HI y *Sall* en pBest4 dando como resultado los plásmidos pBest55, pBest59, pBest70, pBest74, y pBest79, respectivamente. Los fragmentos de ADN sintético mostrados en SEC ID NOs: 26, 24, 32, 28 y 30 se insertaron entre los sitios *Ascl* y *Bam*HI en pBest4 dando como resultado los plásmidos pBest51, pBest57, pBest66, pBest72, y pBest77, respectivamente. Los diez plásmidos se transformaron en *B. subtilis* 1A747 [$SP\beta^c$, protótrofo, derivado de *B. subtilis* 168 (*trpC2*); disponible de BGSC] que selecciona para resistencia a espectinomicina ($Spec^f$) para integrar las diferentes fusiones de *lacZ* en el locus cromosómico *amyE*, generando las cepas BE111 ($P_{rib-lacZ}$), BE115 ($P_{rib\Omega aprE-lacZ}$), BE117 ($P_{rib\Omega grpE-lacZ}$), BE119 ($P_{rib\Omega cotG-lacZ}$), BE126 ($P_{rpsD-lacZ}$), BE130 ($P_{rpsD\Omega aprE-lacZ}$), BE132 ($P_{rpsD\Omega grpE-lacZ}$), BE134 ($P_{rpsD\Omega cotG-lacZ}$), BE137 ($P_{rpsD\Omega SP82-lacZ}$) y BE139 ($P_{rpsD\Omega RBSgsiB-lacZ}$). La integración de doble intercambio genético correcta se confirmó con los ensayos de α -amilasa (Prágai et al., 2001, J. Bacteriology 183:2505-2515): los transformantes con los derivados del plásmido pBest4 se aplicaron sobre agar TBAB (documento WO 04/106557) que contiene 1% de almidón (Sigma) para el ensayo de la producción de α -amilasa. Después de 24 h de incubación a 37°C, los halos producidos como resultado de la hidrólisis del almidón se visualizaron con tinción usando disolución de Lugol (yodo/yoduro de potasio) (Sigma). Después de la recombinación de doble intercambio genético de los derivados pBest4 en el gen *amyE* del cromosoma de *B. subtilis* 1A747, no se formó ningún halo alrededor de las dos cepas BE que portan las diferentes fusiones *lacZ* y el gen *spec* en las colonias del gen *amyE* de los transformantes $Spec^f$.

30 La determinación de las actividades de β -galactosidasa se llevó a cabo según lo siguiente: se inocularon cepas *B. subtilis* BE en medio rico en LB que contiene 100 μ g/ml de *Spec* y en un medio mínimo definido de BFA que contiene 100 μ g/ml de *Spec*, y se hicieron crecer toda la noche a 37°C con una agitación de 250 rpm. Los cultivos de la noche se diluyeron 100 veces en medio LB reciente (25 g de caldo LB, Merck, número de catálogo 1.10285.0500 ad 1 l de H₂O, en autoclave) y en medio mínimo definido de BFA reciente (1X disolución de sal mínima, más arriba; 1X de disolución B de oligoelementos, más arriba; 0,4% de glucosa; 0,2% de L-glutamina; 4 mg de FeCl₃; 0,2 mg de MnSO₄, ad 1 l H₂O), y se hicieron crecer a 37°C con una agitación de 250 rpm. Las muestras se recogieron a cada hora para la determinación de la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) y la actividad de β -galactosidasa (pelete celular de 0,1-1 ml de cultivo). Las muestras de β -galactosidasa se almacenaron a -20°C. El ensayo de β -galactosidasa se llevó a cabo, y la actividad de β -galactosidasa específica (expresada en nmol ONP/min./OD₆₀₀; ONP es 2-nitrofenol) se determinó como se describió previamente (Prágai y Harwood, 2002, Microbiology 148:1593-1602). Como resultado, la cepa BE115 produjo 4-5 veces más actividad de β -galactosidasa específica, BE117 produjo 2-2,5 veces más actividad de β -galactosidasa específica, y BE119 produjo 2-2,5 veces más actividad de β -galactosidasa específica que la cepa isogénica BE111 ($P_{rib-lacZ}$) sin los elementos estabilizadores del ARNm en ambos medios ensayados. Cuando se usan las cepas del promotor *rpsD*, los resultados fueron los siguientes: la cepa BE132 produjo 2,5-3 veces más actividad de β -galactosidasa específica, BE134 produjo 2-2,5 veces más actividad de β -galactosidasa específica, BE137 produjo 1,5-2 veces más actividad de β -galactosidasa específica y BE139 produjo 17-18 veces más actividad de β -galactosidasa específica que la cepa isogénica BE126 ($P_{rpsD-lacZ}$) sin los elementos estabilizadores del ARNm en ambos medios ensayados.

Ejemplo 2: Producción de riboflavina vía desregulación y uso de los elementos estabilizadores del ARNm

50 Para analizar el efecto de los elementos estabilizadores del ARNm sobre la producción de riboflavina en *Bacillus subtilis*, se insertaron tres elementos estabilizadores del ARNm, es decir, SEC ID NO:1, 2 y 5, en dirección 5' del operón *rib*. Se construyeron seis cepas que portan (i) el promotor P_{rib} de tipo salvaje [control], (ii) el promotor fuerte constitutivo P_{15} [desregulación], (iii) el promotor fuerte constitutivo P_{rpsD} [desregulación], (iv) el promotor fuerte constitutivo P_{15} y el elemento estabilizador del ARNm *aprE* [desregulación y estabilización del ARNm], (v) el promotor fuerte constitutivo P_{15} y el elemento estabilizador del ARNm *grpE* [desregulación y estabilización del ARNm], y (vi) el promotor fuerte constitutivo P_{rpsD} y el elemento estabilizador del ARNm RBSgsiB [desregulación y estabilización del ARNm]. El promotor P_{15} (también denominado promotor PE4) del bacteriófago SPO1 de *B. subtilis* (Steward et al., 1998, Virology, 246:329-340) se obtuvo del plásmido pXI23roDTD-SPO1-15, un derivado del plásmido pX12 (Hümbelin et al., 1999, J. Ind. Microbiol. Biotech. 22:1-7). El promotor P_{rpsD} se obtuvo del ADN cromosómico de *B. subtilis* 1A747 (Grundy y Henkin, 1990, J. Bacteriol. 172:6372-6379; Grundy y Henkin, 1990, J.

Bacteriol. 173:4595-4602; Grundy y Henkin, 1992, J. Bacteriol. 174:6763-6770).

Para sustituir el promotor P_{rib} nativo por promotores fuertes constitutivos (P_{15} y P_{rpsD}) e insertar los elementos estabilizadores del ARNm ($aprE$, $grpE$ y $RBSgsiB$) en dirección 5' de los cinco genes rib , en primer lugar, se construyó la cepa *B. subtilis* BS3813 auxótrofa de riboflavina. En BS3813, el promotor del operón de riboflavina, la secuencia no traducida de 5' y el extremo 5' del gen estructural $ribD$ se sustituyó por un casete de resistencia a neomicina (neo) obtenido del plásmido pBEST501 (Itaya et al., 1989, Nucleic Acid Res. 17:4410). Para la construcción de la cepa, se usó reacción en cadena de la polimerasa con homología de flaqueo larga (LFH-PCR) para generar fragmentos de ADN que contienen la resistencia a neo de 1236 pb flanqueado por la región en dirección 5' de 526 bp del promotor P_{rib} nativo (flanco 5') y el extremo 3' de 512 pb del gen $ribD$ (flanco 3'). Por lo tanto, se amplificaron en primer lugar mediante PCR tres fragmentos de ADN: el flanco 5', el gen neo y el flanco 3'. Los fragmentos de ADN del flanco 3' y del flanco 5' se generaron como sigue: 0,2 μ l de una disolución 100 mM de cebadores p50 (SEC ID NO:33) junto con p51 (SEC ID NO:34) o cebadores p44 (SEC ID NO:35) junto con p45 (SEC ID NO:36) se añadieron a 0,1 μ g de ADN cromosómico de *B. subtilis* 1A747 en un volumen de reacción de 50 μ l que contiene 1 μ l de 40 mM de dNTP's, 5 μ l de 10X tampón y 0,5 μ l de enzima Pfu polimerasa (Stratagene). Para generar el fragmento de AND que contiene el gen neo , 0,2 μ l de una disolución 100 mM de cebadores p9 (SEC ID NO:37) junto con p10 (SEC ID NO:38) se añadieron a 0,05 μ g de pBEST501 ADN que contiene el casete de resistencia a neo en un volumen de reacción de 50 μ l que contiene 1 μ l de 40 mM de dNTP's, 5 μ l de 10X tampón y 0,5 μ l de enzima Pfu polimerasa (Stratagene). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en 30 ciclos de tres etapas secuenciales: (i) etapa de desnaturalización a 95°C durante 30 s; (ii) etapa de hibridación a 52°C durante 30 s; (iii) etapa de elongación a 72°C durante 1,5 min. Los tres productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se extrajeron del gel usando el MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). En la reacción de LFH-PCR final, los tres productos de PCR purificados (flanco 5', gen neo y flanco 3') se ensamblaron: 0,2 μ l de una disolución 100 mM de cebadores p45 junto con p51, 0,5 μ l de producto de PCR del flanco 5' (25 ng), 0,5 μ l de producto de PCR del flanco 3' (25 ng) y 2 μ l del casete de resistencia a neo (100 ng) se añadieron en un volumen de reacción de 50 μ l final que contiene 1 μ l de 40 mM de dNTP's, 5 μ l de 10X tampón y 0,5 μ l de enzima HF Expand polymerase (Roche Biochemicals). La reacción de LFH-PCR se llevó a cabo en 35 ciclos de tres etapas secuenciales: (i) etapa de desnaturalización a 95°C durante 30 s; (ii) etapa de hibridación a 52°C durante 30 s; (iii) etapa de elongación a 72°C durante 2,5 min. El producto de LFH-PCR ensamblado se purificó usando el kit de purificación de PCR QiaQuick (Qiagen). El producto de LFH-PCR purificado (2 μ g) se usó para la transformación de células competentes de *B. subtilis* 1A747. Los transformantes resistentes a neomicina (Nm^r) se seleccionaron en placas de TBAB que contienen 2 mg/l de neomicina (Nm) y 100 mg/l de riboflavina. El genotipo correcto de la cepa Nm^r BS3813 y auxótrofa de riboflavina resultante se confirmó mediante dos reacciones de PCR usando cebadores p45 junto con p10, y cebadores p51 junto con p9, y ADN cromosómico de los transformantes como ADN molde. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando condiciones de reacción estándar como se describen anteriormente para la generación de fragmentos de ADN que contienen el flanco 5' y el flanco 3'. Además, la secuencia del extremo 3' de $ribD$ en BS3813 se confirmó mediante secuenciación.

En la segunda etapa de construcción de la cepa, el gen neo de la cepa *B. subtilis* BS3813 auxótrofa de riboflavina se sustituyó por cinco productos de LFH-PCR que contienen (i) el promotor fuerte constitutivo P_{15} (P_{15}); (ii) el promotor fuerte constitutivo P_{rpsD} (P_{rpsD}), (iii) el promotor fuerte constitutivo P_{15} y el elemento estabilizador del ARNm $aprE$ ($P_{15\Omega aprE}$), (iv) el promotor fuerte constitutivo P_{15} y el elemento estabilizador del ARNm $grpE$ ($P_{15\Omega grpE}$), y (v) el promotor fuerte constitutivo P_{rpsD} y el elemento estabilizador del ARNm $RBSgsiB$ ($P_{rpsD\Omega RBSgsiB}$) en dirección 5' del operón rib .

Para la construcción del producto de LFH-PCR que contiene el constructo $P_{15}ribDEAHT$, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR estándar en las que la secuencia del promotor P_{15} se introdujo en los productos de la PCR. En una tercera reacción de PCR, los dos productos de la PCR se combinaron. Para amplificar el producto 1 de la PCR que contiene la región 5' del operón de riboflavina y el extremo 5' del promotor P_{15} , se usó el par de cebadores p45 y p63 (SEC ID NO:40) y el ADN cromosómico de la cepa *B. subtilis* 1A747 como molde en las condiciones de PCR estándar. Para amplificar el producto 2 de la PCR que contiene el $ribD$ en el extremo 3' del promotor P_{15} , se usaron los cebadores p51 y Spo15S' (SEC ID NO:39) y el ADN cromosómico de la cepa *B. subtilis* 1A747 como molde en las condiciones de PCR estándar. En la reacción de LFH-PCR estándar, los productos 1 y 2 de la PCR purificados en gel se ensamblaron en un fragmento de ADN usando el par de cebadores p45 y p51 como se describe anteriormente. El producto de LFH-PCR purificado se transformó en células competentes *B. subtilis* BS3813 auxótrofas de riboflavina, en las que la región del promotor de riboflavina y la parte 5' de $ribD$ se sustituyó por el casete de resistencia a neo . Los transformantes protótrofos de riboflavina se seleccionaron en medio de agar mínimo (SMM: 886 ml de 1,5% de agar en H₂O destilada; en autoclave durante 30 min. a 121°C seguido de adición de 100 ml de 10X sales de Spizizen, más arriba, 4 ml de 50% de glucosa, 10 ml de 100 X de disolución A de oligoelementos, más arriba). Los transformantes de *Bacillus* protótrofos de riboflavina se suspendieron en 1 ml de disolución de NaCl al 0,9%, y 100 μ l de la dilución de 500 veces de la suspensión celular original se colocaron en placa de agar TBAB. Se transfirieron colonias individuales sobre placas de agar TBAB reciente, y las placas de agar TBAB se suplementaron con 2 mg/l de Nm y 100 mg/l de riboflavina. Los transformantes correctos crecieron solamente en placa de agar TBAB, y por lo tanto fueron sensibles a neomicina. Además, el genotipo se confirmó con secuenciación de la región $ribD$. La cepa final se denominó BS3944 ($P_{15}ribDEAHT$).

Para la construcción del producto de LFH-PCR que contiene el constructo $P_{15\Omega\text{aprE}}$, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR estándar en las que la secuencia de ADN del elemento estabilizador del ARNm *aprE* se integró en dos productos de PCR. Para amplificar el producto 1 de la PCR que contiene la región 5' del operón de riboflavina y el promotor P_{15} en el extremo 5' del elemento estabilizador del ARNm *aprE*, se usaron los cebadores p45 junto con p143' (SEC ID NO:41) y el ADN cromosómico de la cepa BS3944 como molde en las condiciones de PCR estándar. Para amplificar el producto 2 de la PCR que contiene el *ribD* en el extremo 3' del elemento estabilizador del ARNm *aprE*, se usaron los cebadores p51 junto con p142 (SEC ID NO:42) y el ADN cromosómico de la cepa BS3944 como molde en las condiciones de PCR estándar. En la reacción de LFH-PCR estándar, los productos 1 y 2 de la PCR purificados en gel se ensamblaron en un fragmento de ADN usando el par de cebadores p45 y p51 como se describe anteriormente. El producto de LFH-PCR purificado se transformó nuevamente en células competentes *B. subtilis* BS3813 auxótrofas de riboflavina, en las que la región del promotor de riboflavina y la parte 5' de *ribD* se sustituyó por el gen de resistencia a *neo*. Los transformantes de *Bacillus* protótrofos de riboflavina se seleccionaron en placas de SMM. Los transformantes se suspendieron en 1 ml de disolución de NaCl al 0,9%, y se colocaron 100 μl de la disolución de 500 veces de la suspensión celular original en placa de agar TBAB. Se transfirieron colonias individuales sobre placas de agar TBAB reciente, y las placas de agar TBAB se suplementaron con 2 mg/l de Nm y 100 mg/l de riboflavina. Los transformantes correctos crecieron solamente en placa de agar TBAB, y por lo tanto fueron sensibles a neomicina. Además, el genotipo se confirmó con secuenciación de la región *ribD*. La cepa resultante fue BS5193 ($P_{15\Omega\text{aprE}}\text{ribDEAHT}$).

Se aplicó el mismo método para insertar el elemento estabilizador del ARNm *grpE* entre el promotor P_{15} y el operón *rib* dando como resultado la cepa BS5196 ($P_{15\Omega\text{grpE}}\text{ribDEAHT}$), en el que para las dos primeras reacciones de PCR se usaron los pares de cebadores p45 y p145' (SEC ID NO:43) y p51 y p144 (SEC ID NO:44) junto con el ADN cromosómico de la cepa BS3944 como molde.

Para la construcción del producto de LFH-PCR que contiene el constructo $P_{\text{rpsD}}\text{ribDEAHT}$, se amplificaron mediante PCR tres fragmentos de ADN que contienen el promotor P_{rpsD} (fragmento PST2) flanqueado por la región en dirección 5' de 1013 pb del operón *rib* (flanco 5') y el gen *ribD* de 1108 pb (flanco 3'). Los fragmentos de ADN flanco 5' y flanco 3' se generaron con reacciones de PCR estándar como se describe anteriormente usando el par de cebadores PUS1 (SEC ID NO:45) y PSTP2 (SEC ID NO:46) y el par de cebadores PST2P3 (SEC ID NO:47) y p51 junto con ADN cromosómico de *B. subtilis* 1A747 como molde. Para generar el fragmento de AND de PST2, se usaron los cebadores PSTF (SEC ID NO:48) y PSTR2 (SEC ID NO:49) y ADN cromosómico de *B. sarbtillis* BE126 como molde. Tras la extracción en gel, los tres productos de la PCR se ensamblaron en un producto de LFH-PCR como se describió anteriormente usando los cebadores PUS1 y p51. El producto de LFH-PCR de purificado se transformó en las células competentes *B. sarbtillis* BS3813 auxótrofas de riboflavina. Los transformantes protótrofos de riboflavina y sensibles a Nm se seleccionaron en medio de agar mínimo como se describió anteriormente, y el genotipo se confirmó con secuenciación de la región *ribD*. La cepa final se denominó BE460 ($P_{\text{rpsD}}\text{ribDEAHT}$).

Se aplicó el mismo método para insertar el elemento estabilizador del ARNm RBSgsiB entre el promotor P_{rpsD} y el operón *rib*, dando como resultado la cepa BE454 ($P_{\text{rpsD}\Omega}\text{RBSgsiB}\text{ribDEAHT}$). Para la construcción del producto de LFH-PCR, se generaron tres fragmentos de ADN: el fragmento de PST1 de 162 pb que contiene el promotor P_{rpsD} y el elemento estabilizador RBSgsiB y flanqueado por la región en dirección 5' de 1013 pb del operón *rib* (flanco 5') y el gen *ribD* de 1108 pb (flanco 3'). Los fragmentos de ADN flanco 5' y flanco 3' se generaron con reacciones de PCR estándar como se describió anteriormente usando el par de cebadores PUS1 y PSTP2 y el par de cebadores PST1P3 (SEC ID NO:50) y p51 junto con ADN cromosómico de *B. subtilis* 1A747 como molde. Para generar el fragmento de ADN de PST1, se usaron los cebadores PSTF y PSTR1 (SEC ID NO:51) y ADN cromosómico de *B. sarbtillis* BE139 como molde.

A fin de transferir los nuevos constructos a un trasfondo productor de riboflavina, se prepararon lisados fágicos PBS1 a partir de BS3944, BS5193, BS5196, BE460 y BE454 como se describe en Cutting y Vander Horn, 1990, Genetic Analysis en Harwood and Cutting (eds), Molecular biological methods for Bacillus. New York: John Wiley and Sons. Se usó la transducción generalizada mediada por PBS1 para transferir los cinco constructos $P_{15}\text{ribDEAHT}$, $P_{15\Omega\text{aprE}}\text{ribDEAHT}$, $P_{15\Omega\text{grpE}}\text{ribDEAHT}$, $P_{\text{rpsD}}\text{ribDEAHT}$ y $P_{\text{rpsD}\Omega}\text{RBSgsiB}\text{ribDEAHT}$ en BS5178 ($\Delta\text{ribD}::\text{neo tktR357A}$, *ribC*, *spo0A12*). BS5178 es un auxótrofo de riboflavina, puesto que el promotor del operón de riboflavina, la secuencia no traducida de 5' y el extremo 5' del gen estructural *ribD* se sustituyó por un casete de resistencia a *neo* de forma similar a como se describió anteriormente para BS3813. Tras la transducción de BS5178 mediada por PBS1, las cepas protótrofas de riboflavina y sensibles a Nm se seleccionaron en placas de SMM como se describió anteriormente. Las cepas resultantes fueron BS5240 ($P_{15}\text{ribDEAHT}$), BS5237 ($P_{15\Omega\text{aprE}}\text{ribDEAHT}$), BS5238 ($P_{15\Omega\text{grpE}}\text{ribDEAHT}$), BE476 ($P_{\text{rpsD}}\text{ribDEAHT}$) y BE475 ($P_{\text{rpsD}\Omega}\text{RBSgsiB}\text{ribDEAHT}$). La cepa de control isogénica con el operón *rib* de tipo salvaje fue BS5191 ($P_{\text{rib}}\text{ribDEAHT}$). Las seis cepas BS5191, BS5240, BS5137, BS5138, BE476 y BE475 se evaluaron para la producción de riboflavina en cultivos de matraces de agitación: las cepas se inocularon a partir de lotes de glicerol congelados en 5 ml de medio rico en VY (documento WO 04/106557), y se hicieron crecer toda la noche a 37°C con una agitación de 280 rpm. Las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de medio de cribado de riboflavina (RSM: 100 ml de 10X sales de Spizizen, más arriba; 10 ml de 100X disolución A de oligoelementos, más arriba, 2 ml de 50% de glucosa; 36 ml de 25% de rafinosa, 10 ml de 10% de extracto de levadura, ad 11 H₂O). Se usaron 250 μl de la suspensión celular para la inoculación de 25 ml de RSM en matraces de agitación con pantallas de 250 ml. Tras una incubación durante 48 h a 39°C con una agitación

de 220 rpm, se tomaron 500 μ l de cultivo y se mezclaron 35 μ l de NaOH 4 N con la muestra durante 1 minuto a temperatura ambiente, permitiendo disolver los cristales de riboflavina. Las muestras se neutralizaron mediante adición de 465 μ l de tampón de fosfato potásico 1 M (pH 6,8) y se purificaron con centrifugación (5 min., 13,2 krpm). El sobrenadante se usó para la determinación mediante HPLC de las concentraciones de riboflavina y dos productos secundarios: 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (DMRL) y oxolumazina. Además, se tomó una segunda muestra de cultivo y, tras la centrifugación (5 min., 13,2 krpm) el sobrenadante se usó para la determinación de las concentraciones de la glucosa residual y rafinosa en el medio.

El análisis mediante HPLC para el análisis de riboflavina se llevó a cabo según lo siguiente: las muestras procedentes de cultivos de matraces de agitación se analizaron mediante HPLC usando un sistema Agilent 1100 HPLC equipado con un automuestreador termostatzado, un conjunto de diodos y un detector de fluorescencia. La separación se llevó a cabo en una columna Supelcosil LC-8DB- μ p (150 mm x 4,6 mm) equipada con una columna de guarda de 4 mm LC-8DB. Como fase móvil se usó una mezcla de ácido acético 0,1 M y metanol. Se aplicó elución en gradiente partiendo de 2% de metanol (constante durante 5 min.) y continuando hasta 50% de metanol en 15 minutos. La columna se mantuvo a 20°C. La señal se registró mediante UV a 280 nm. La riboflavina se separó bien de las impurezas (por ejemplo productos secundarios: DMRL y oxolumazina), y eluyó a 15,2 minutos. La calibración se basó en material de referencia obtenido de Fluka. El intervalo de calibración del método fue de 10 μ g/ml a 1 mg/ml. Para el análisis mediante HPLC de los azúcares, se aplicó el siguiente procedimiento usando un sistema de HPLC de la serie Agilent 1100 con una bomba cuaternaria, un automuestreador y un detector de UV y del índice de refracción. La separación se logró en una columna CAPCELL PAK NH2 UG80 (4,6 mm x 250 mm, 5 μ) (Shiseido). La temperatura óptima de la columna fue 35°C. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y agua DI a una relación 65/35. El caudal fue 1,0 ml/min., y el volumen de inyección se ajustó a 5 μ l. La señal del índice de refracción se monitorizó y se usó para la detección. El intervalo de calibración para cada compuesto fue de 0,5 mg/ml a 30 mg/ml.

Los resultados mostraron que incrementando el nivel de transcripción del operón *ribDEAHT* mediante el promotor fuerte constitutivo P_{15} y suprimiendo la secuencia riborreguladora [desregulación] dio como resultado un rendimiento de riboflavina 2,3 veces mayor en fuente de carbono para BS5240 que el obtenido con la cepa de control BS5191 que contiene el operón *rib* de tipo salvaje. Usando el promotor fuerte constitutivo P_{15} e incrementando la estabilidad de los transcritos de *ribDEAHT* mediante el elemento estabilizador del ARNm *aprE* y *grpE* [desregulación y estabilización del ARNm], condujo respectivamente a un rendimiento de riboflavina 3,9 veces y 6,4 veces mayor en fuente de carbono para BS5237 y BS5238, respectivamente que el que se produjo mediante la cepa de control BS5191. Usando P_{rpsD} e incrementando la estabilidad de los transcritos de *ribDEAHT* introduciendo el elemento estabilizador del ARNm *RBSgsiB* [desregulación y estabilización del ARNm] condujo a un rendimiento de riboflavina 1,5 veces mayor en fuente de carbono para BE475 que el que se produjo mediante la cepa de control BE476 (P_{rpsD} *ribDEAHT*) [desregulación]. De este modo, la estabilización del ARNm dio como resultado un incremento adicional de al menos 50% en el rendimiento de riboflavina. Una comparación entre la cantidad de riboflavina producida a partir de la cepa de control BS5191 que contiene el operón *rib* de tipo salvaje y una cepa que contiene el P_{rib} natural junto con los elementos estabilizadores del ARNm respectivos muestra un incremento de al menos 10% cuando se usan los elementos estabilizadores del ARNm. Los resultados muestran que la estabilización del ARNm es una herramienta poderosa para la ingeniería de las cepas, y potencia significativamente el incremento del rendimiento de riboflavina que resulta tanto del uso del promotor natural así como mediante la desregulación del operón *rib* con el promotor SPO1 fuerte constitutivo P_{15} .

Ejemplo 3: Integración de los elementos estabilizadores del ARNm en dirección 3' de los genes implicados en biotina, ácido pantoténico y α -amilasa

Los elementos estabilizadores del ARNm se pueden usar para incrementar el rendimiento de un producto de fermentación diana distinto de riboflavina, tal como por ejemplo biotina, ácido pantoténico o α -amilasa. La construcción de cepas de *B. subtilis* manipuladas genéticamente que portan los elementos estabilizadores del ARNm respectivos en dirección 3' del promotor natural o de un promotor constitutivo fuerte tal como por ejemplo P_{15} se lleva a cabo según el Ejemplo 2 o la Figura 1.

Para incrementar el rendimiento de biotina, se siguen las etapas descritas en la Figura 1, en la que los elementos estabilizadores del ARNm se introducen entre el promotor natural o el promotor constitutivo y el gen *bioA*. Los cebadores para las reacciones de PCR se construyen basándose en secuencias públicamente disponibles, incluyendo la secuencia para *bioA*.

Para incrementar el rendimiento de pantotenato, se siguen exactamente las etapas descritas en la Figura 1, en la que los elementos estabilizadores del ARNm se introducen entre el promotor natural o en constitutivo y el gen *panB*. Los cebadores para las reacciones de PCR se construyen basándose en las secuencias públicamente disponibles, incluyendo la secuencia para *panB*.

La cantidad del producto de fermentación diana respectivo se incrementa en al menos 10% cuando se usa el promotor natural, y al menos 50% cuando se usa el promotor constitutivo fuerte.

ES 2 570 962 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Producción incrementada de un producto diana vía estabilización del ARNm

<130> 26210

<160> 51

5 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 41

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

10 <400> 1

acagaatagt ctttaagta agtctactct gaattttt a 41

<210> 2

<211> 57

<212> ADN

15 <213> *Bacillus subtilis*

<400> 2

atztatcga agggcagcac ctgtcctct ccttacactt tgaggaggt gaacaca 57

<210> 3

<211> 27

20 <212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 3

aaggatctc atcctaaca tatttt 27

<210> 4

25 <211> 42

<212> ADN

<213> Bacteriófago SP82

<400> 4

ggagccgctg agctaccaca gatttgaaa ggagaggta ac 42

30 <210> 5

<211> 19

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 5

35 aaaggaggaa ttcaaatg 19

<210> 6

<211> 18

<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
5 <400> 6
acagaatagt cttttaag 18
<210> 7
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 7
taaaaaaatt cagagtag 18
15 <210> 8
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
20 <223> cebador
<400> 8
atttatcga agggcagc 18
<210> 9
<211> 18
25 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 9
30 tgtgttcacc tccctcaa 18
<210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> cebador
<400> 10

aaggatcttc atccttaa 18

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 11

aaaaatatgt taaggatg 18

10 <210> 12

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 12

ggagccgctg agctacca 18

<210> 13

<211> 18

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 13

25 gttaacctct cctttcac 18

<210> 14

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 14

aaaggaggaa ttcaaaat 18

<210> 15

35 <211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 15
 cattttgaat tcctcctt 18
 5 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*
 <400> 16
 10 cagaatagtc tttaagtaa gtctactctg 30
 <210> 17
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*
 15 <400> 17
 ttatcgaag ggcagcacct gtcctctcc ttacacttg agggaggtga a 51
 <210> 18
 <211> 16
 <212> ADN
 20 <213> *Bacillus subtilis*
 <400> 18
 aaggatcttc atcctt 16
 <210> 19
 <211> 17
 25 <212> ADN
 <213> Bacteriófago SP82
 <400> 19
 ggagccgctg agctacc 17
 <210> 20
 30 <211> 8
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*
 <400> 20
 aaaggagg 8
 35 <210> 21
 <211> 52
 <212> ADN

ES 2 570 962 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 5 gatccggcgc gccggccggc cgtttaaacg cggccgcgca tgccctgcag ga 52
 <210> 22
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 22
 agcttctgc agggcatgcg cggccgcgtt taaacggccg gccggcgcgc cg 52
 <210> 23
 15 <211> 146
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*
 <400> 23
 ctcaaattgt aagtttattt cattgcgtac tttaaaaagg atcgctataa taaccaataa 60
 ggacacagaa tagtctttta agtaagtcta ctctgaattt ttttaggtgg tgaactactg 120
 tggaagttac tgacgtaaga ttacgg 146
 20 <210> 24
 <211> 122
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*
 <400> 24
 ctcaaattgt aagtttattt cattgcgtac tttaaaaagg atcgctataa taaccaataa 60
 ggacaatttt atcgaagggc agcacctgtc cttctcctta cactttgagg gaggtgaaca 120
 ca 122
 25 <210> 25
 <211> 133
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*
 30 <400> 25

ES 2 570 962 T3

	ctcaaattgt aagtttattt cattgcgtac tttaaaaagg atcgctataa taaccaataa	60
	ggacaaaagga tcttcatcct taacatattt ttggtggtga actactgtgg aagttactga	120
	cgtaagatta cgg	133
	<210> 26	
	<211> 65	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Bacillus subtilis</i>	
	<400> 26	
	ctcaaattgt aagtttattt cattgcgtac tttaaaaagg atcgctataa taaccaataa	60
	ggaca	65
	<210> 27	
	<211> 224	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Bacillus subtilis</i>	
	<400> 27	
	gatctttagt ttgttctacc atgtttttat cacctaaaag ttaccacta atttttgttt	60
	attatatcat aaacggtgaa gcaataatgg aggaatggtt gacttcaaaa caataaatt	120
	atataatgac ctttgtgtga aatcagaata gtcttttaag taagtctact ctgaattttt	180
	ttaggtggtg aactactgtg gaagttactg acgtaagatt acgg	224
15	<210> 28	
	<211> 200	
	<212> ADN	
	<213> <i>Bacillus subtilis</i>	
	<400> 28	
	gatctttagt ttgttctacc atgtttttat cacctaaaag ttaccacta atttttgttt	60
	attatatcat aaacggtgaa gcaataatgg aggaatggtt gacttcaaaa caataaatt	120
	atataatgac ctttgtgtga aatattttat cgaagggcag cacctgtcct tctccttaca	180
20	ctttgagggg ggtgaacaca	200
	<210> 29	
	<211> 211	
	<212> ADN	
	<213> <i>Bacillus subtilis</i>	
25	<400> 29	

ES 2 570 962 T3

gatctttagt ttgttctacc atgtttttat cacctaaaag tttaccacta atttttgttt 60
attatatcat aaacggtgaa gcaataatgg aggaatgggt gacttcaaaa caaataaatt 120
atataatgac ctttgtgtga aataaggatc ttcatcctta acatattttt ggtggtgaac 180
tactgtggaa gttactgacg taagattacg g 211

<210> 30
<211> 185
<212> ADN

5 <213> *Bacillus subtilis*
<400> 30
gatctttagt ttgttctacc atgtttttat cacctaaaag tttaccacta atttttgttt 60
attatatcat aaacggtgaa gcaataatgg aggaatgggt gacttcaaaa caaataaatt 120
atataatgac ctttgtgtga aatggagccg ctgagctacc acagattgtg aaaggagagg 180
ttaac 185

<210> 31
<211> 186

10 <212> ADN
<213> *Bacillus subtilis*
<400> 31
gatctttagt ttgttctacc atgtttttat cacctaaaag tttaccacta atttttgttt 60
attatatcat aaacggtgaa gcaataatgg aggaatgggt gacttcaaaa caaataaatt 120
atataatgac ctttgtgtga aataaaggag gaattcaaaa tggaagttac tgacgtaaga 180
ttacgg 186

<210> 32

15 <211> 143
<212> ADN
<213> *Bacillus subtilis*
<400> 32
gatctttagt ttgttctacc atgtttttat cacctaaaag tttaccacta atttttgttt 60
attatatcat aaacggtgaa gcaataatgg aggaatgggt gacttcaaaa caaataaatt 120
atataatgac ctttgtgtga aat 143

20 <210> 33
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> cebador

<400> 33

gtgtcaaaac gcataccatt ttgaacgagt tggcacagtg aaagccg 47

<210> 34

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 34

10 ctattccttt gtcggttttg ccg 23

<210> 35

<211> 49

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> cebador

<400> 35

gatctcgacc tgcagcccaa gcgaaataaa cttacaattt gagaaaaac 49

<210> 36

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

25 <400> 36

acatatccc gttatgcatc g 21

<210> 37

<211> 22

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 37

gcttgggctg caggtcgaga tc 22

35 <210> 38

<211> 26

<212> ADN

ES 2 570 962 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 38
 5 gttcaaaatg gtagcggtt tgacac 26
 <210> 39
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 39
 taaaaat ttt acaaaaagggt attgactttc cctacagggt gtgtaataat ttaattgacg 60
 gtaaataaca aaagagg 77
 <210> 40
 15 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 40
 caataccttt ttgtaaaatt tttagaaata aactacaat ttgagaaaaa c 51
 <210> 41
 <211> 79
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 41
 cagagtagac ttacttaaaa gactattctg caatctttat tcatttgccc ttataattaa 60
 attattacac accctgtag 79
 30 <210> 42
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 570 962 T3

<223> cebador
<400> 42
tttaagtaa gtctactctg aatttttta gacggtaaataaacaaaagag ggg 53
<210> 43
5 <211> 87
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
10 <400> 43
gtgtaaggag aaggacaggt gctgcccttc gataaaatca atctttattc attgtcctt 60
ataattaaat tattacacac cctgtag 87
<210> 44
<211> 61
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 44
cctgtccttc tccttacct ttgagggagg tgaacacaga cggtaaataa caaaagaggg 60
g 61
20 <210> 45
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
25 <223> cebador
<400> 45
atacatcggc gagttgata gagga 25
<210> 46
<211> 50
30 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 46

ES 2 570 962 T3

aacatggtag aacaaactaa agatccaaaa catcacctt cgatccgaaa 50

<210> 47

<211> 50

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 47

agggaaaagg tgggaaacta ctgtggaaga gtattatag aagctggcct 50

10 <210> 48

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 48

gatcttagt ttgtctacc atgttt 27

<210> 49

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 49

25 cacagtagt caccacctt tcc 23

<210> 50

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 50

tgaaataaag gaggaattca aatggaaga gtattatag aagctggcct 50

<210> 51

35 <211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 51

catttgaat tcctcctta ttc 24

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de una vitamina con un microorganismo, en el que dicho microorganismo se incubaba en un medio acuoso en condiciones que permiten la producción de dicha vitamina a partir de una fuente de carbono, y en el que opcionalmente se aísla la vitamina, en el que dicho microorganismo se altera genéticamente mediante introducción de un polinucleótido que conduce a un rendimiento y/o eficiencia mejorados de la producción de la vitamina producida por dicho microorganismo, seleccionándose dicho polinucleótido del grupo que consiste en:
- 5 (a) polinucleótidos que comprenden la secuencia nucleotídica según SEC ID NO:2;
- (b) y polinucleótidos que son al menos 95% idénticos a un polinucleótido como se define en (a) y que tiene la actividad de un elemento estabilizador del ARNm, o la hebra complementaria de tal polinucleótido.
- 10 2. Un procedimiento para la producción de ARNm con estabilidad incrementada transcrito a partir de un gen implicado en la ruta biosintética de una vitamina en un microorganismo, comprendiendo dicho microorganismo un polinucleótido usado en el procedimiento según la reivindicación 1 que se introduce en dirección 3' del comienzo de la transcripción del gen o genes respectivos.
- 15 3. Un procedimiento para la producción de un microorganismo capaz de producir una vitamina, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de alterar dicho microorganismo mediante introducción de un polinucleótido usado en el procedimiento según la reivindicación 1 en dirección 3' del comienzo de la transcripción del gen o genes respectivos implicados en la ruta biosintética de la vitamina respectiva, de manera que el microorganismo produce un ARNm estabilizado que conduce a un rendimiento y/o eficiencia mejorados de la producción de la vitamina producida por dicho microorganismo.
- 20 4. Un procedimiento para la producción de un microorganismo en el que se incrementa la estabilidad del ARNm transcrito a partir de un gen endógeno implicado en la ruta biosintética de una vitamina, que comprende la etapa de alterar dicho microorganismo mediante introducción de un polinucleótido usado en el procedimiento según la reivindicación 1 en dirección 3' del comienzo de la transcripción del gen endógeno respectivo.
- 25 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la vitamina se selecciona del grupo que consiste en riboflavina, biotina, ácido pantoténico, ácido fólico, tiamina, y piridoxina.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia*, *Gluconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptomyces*.
- 30 7. Un microorganismo producido mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 6.
8. Un microorganismo manipulado genéticamente con un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) polinucleótidos que comprenden la secuencia nucleotídica según SEC ID NO:2;
- (b) y polinucleótidos que son al menos 95% idénticos a un polinucleótido como se define en (a) y que tiene la actividad de un elemento estabilizador del ARNm, o la hebra complementaria de tal polinucleótido,
- 35 en el que dicho polinucleótido se introduce en dirección 3' del comienzo de la transcripción del gen o genes respectivos implicados en la ruta biosintética de una vitamina.
9. El microorganismo según la reivindicación 8, alterándose genéticamente dicho microorganismo de tal manera que conduce a un rendimiento y/o eficiencia mejorados de la producción de una vitamina producida por dicho microorganismo.
- 40 10. El microorganismo según la reivindicación 8, que produce un transcrito de ARNm con estabilidad incrementada y/o mejorada.
11. El microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que se selecciona del grupo que consiste en *Escherichia*, *Gluconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptomyces*.
- 45 12. El microorganismo según la reivindicación 9, en el que la vitamina se selecciona del grupo que consiste en riboflavina, biotina, ácido pantoténico, ácido fólico, tiamina, y piridoxina.
13. Uso de un polinucleótido para la producción de una vitamina a partir de una fuente de carbono en condiciones adecuadas, en el que dicho polinucleótido se introduce en un microorganismo capaz de producir dicha vitamina que conduce a un rendimiento y/o eficiencia mejorados de la producción de la vitamina por dicho microorganismo, introduciéndose dicho polinucleótido en dirección 3' del comienzo de la transcripción del gen o genes respectivos
- 50

implicados en la ruta biosintética de una vitamina y seleccionándose del grupo que consiste en:

(a) polinucleótidos que comprenden la secuencia nucleotídica según SEC ID NO:2;

(b) y polinucleótidos que son al menos 95% idénticos a un polinucleótido como se define en (a) y que tiene la actividad de un elemento estabilizador del ARNm, o la hebra complementaria de tal polinucleótido.

Figura 1: Sustitución del promotor nativo por un promotor fuerte usando LFH-PCR

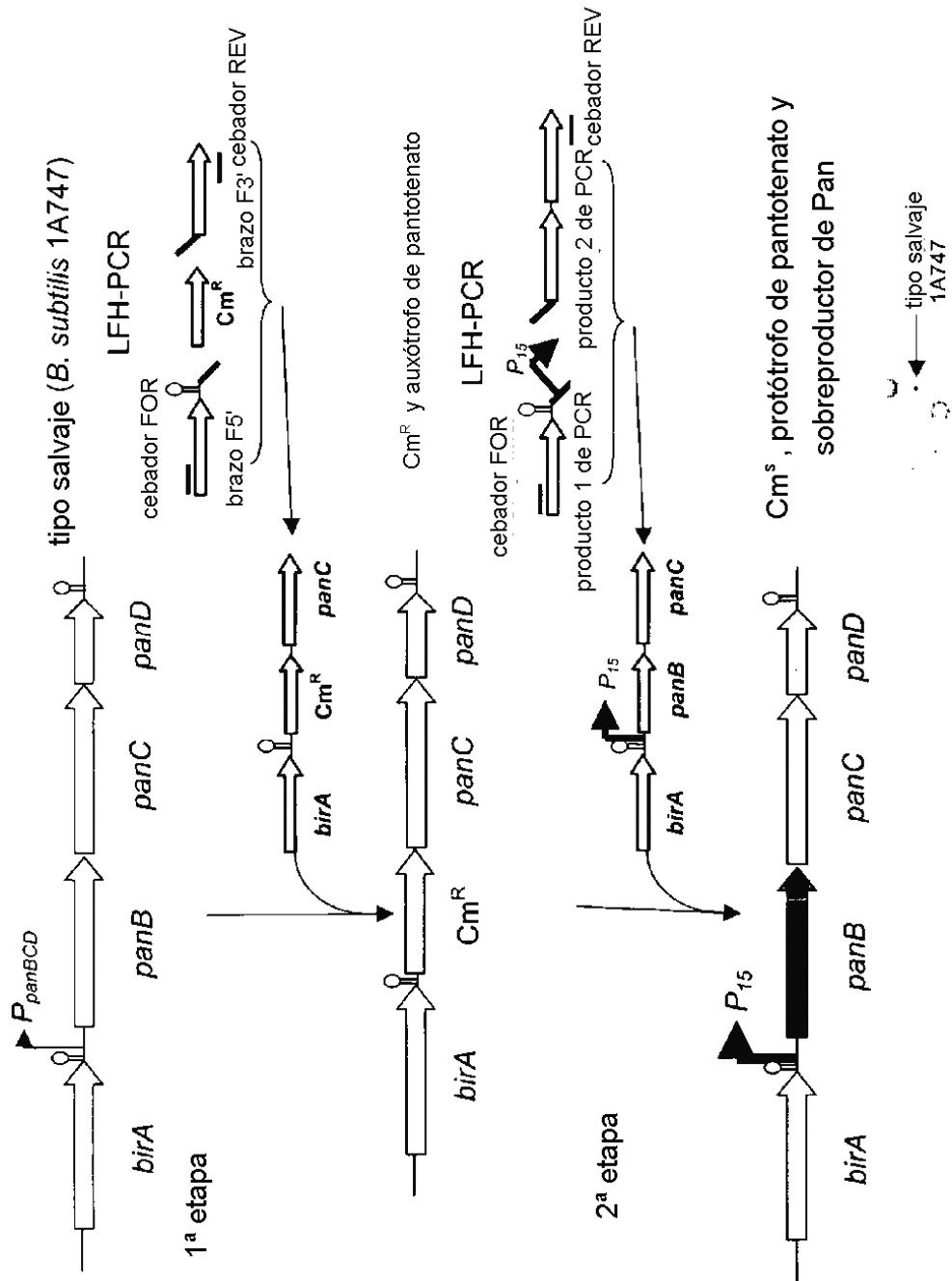


Figura 1 (cont)

Intrudcción de elementos estabilizadores del ARNm (St)

