

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 926**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 9/02</b>	(2006.01)
<b>C12P 13/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/77</b>	(2006.01)
<b>C12P 13/06</b>	(2006.01)
<b>C12P 13/08</b>	(2006.01)
<b>C12P 13/10</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/15</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/00</b>	(2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/EP2012/062046**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13000827**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12728293 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2726615**

54 Título: **Variantes del promotor del gen gap que codifica la glicerinaldehído-3-fosfato-deshidrogenasa**

30 Prioridad:

**28.06.2011 DE 102011118019**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.07.2017**

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)  
Rellinghauser Strasse 1-11  
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**RETH, ALEXANDER;  
BATHE, BRIGITTE;  
HANS, STEPHAN y  
CLAES, WILFRIED**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 624 926 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

Variantes del promotor del gen gap que codifica la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa

5 Es objeto del invento un procedimiento para la preparación de productos químicos finos mediante utilización de microorganismos modificados por tecnología genética, en los que unas variantes del promotor del gen gap, que codifica la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, hacen posible la sobreexpresión de diferentes genes.

### Estado de la técnica

Los productos químicos finos con se entienden en particular aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, nucleósidos y nucleótidos, encuentran aplicación en la medicina humana, en la industria farmacéutica, en la cosmética, en la industria alimentaria y en la nutrición de animales.

10 Numerosos de estos compuestos se preparan por fermentación de cepas de bacterias corineformes, en particular *Corynebacterium glutamicum*. A causa de la gran importancia de ellos, se está trabajando constantemente en el mejoramiento de los procedimientos de preparación. Unos mejoramientos de los procedimientos pueden concernir a medidas técnicas de fermentación tales como por ejemplo agitación y abastecimiento con oxígeno, o a la composición de los medios nutritivos tales como por ejemplo la concentración de azúcares durante la fermentación,  
15 o a la elaboración a la forma del producto mediante por ejemplo una cromatografía por intercambio de iones o a las propiedades intrínsecas de rendimiento del microorganismo propiamente dicho.

Para el mejoramiento de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos se aplican unos métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. De esta manera se obtienen unas cepas, que son resistentes contra unos antimetabolitos tales como p.ej. el compuesto análogo a lisina S-(2-aminoetil)-cisteína o el compuesto análogo  
20 a valina 2-tiazol-alanina y unos compuestos químicos, por ejemplo unos L-aminoácidos tales como L-lisina o L-valina.

Desde hace algunos años se están empleando asimismo unos métodos de tecnología de ADN recombinante para el mejoramiento de cepas de *Corynebacterium glutamicum* productoras de L-aminoácidos, en los que se refuerzan o debilitan por ejemplo genes individuales de la biosíntesis de aminoácidos y se investiga la repercusión sobre la  
25 producción del compuesto químico.

Unas exposiciones recopilativas acerca de la biología, genética y biotecnología de *Corynebacterium glutamicum* se pueden encontrar en el manual "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*" (Coordinadores de edición: L. Eggeling y M. Bott, CRC Press, Taylor & Francis, 2005), en la edición especial del Journal of Biotechnology (Coordinador Jefe: A. Pühler) con el título "A New Era in *Corynebacterium glutamicum* Biotechnology" (Journal of Biotechnology 104/1-3,  
30 (2003)) y en el libro de T. Scheper (Editor gerente) "Microbial Production of L-Amino Acids" (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 79, Editorial Springer, Berlin, Alemania, 2003)

La secuencia de nucleótidos del genoma de *Corynebacterium glutamicum* se describe en la referencia de Ikeda y Nakagawa (Applied Microbiology and Biotechnology 62, 99-109 (2003)), en el documento de patente europea EP 1 108 790 y en la referencia de Kalinowski y colaboradores (Journal of Biotechnology 104/1-3, (2003))

35 Las secuencias de nucleótidos del genoma de *Corynebacterium glutamicum* están disponibles asimismo en el Banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.), en el banco de datos de ADN "DNA Data Bank of Japan" (DDBJ, Mishima, Japón) o en el banco de datos de secuencias de nucleótidos de los European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania o respectivamente Cambridge, Reino Unido).

40 El promotor natural del gen gap que codifica la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Corynebacterium glutamicum* fue descrito y analizado por Patek y colaboradores (Journal of Biotechnology 104, 311-323 (2003)).

En el documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2008/0050786 se representa en SEQ ID NO:20 una molécula de ADN que tiene una longitud de 484 pb y designada como seqP-RBS\_20, que comprende el promotor del gen gap e incluye el sitio de fijación a ribosomas. Este promotor se puede aprovechar de manera ventajosa para  
45 la expresión de diferentes genes tales como por ejemplo el gen lysC que codifica la aspartato cinasa. Para la mejor claridad se reproduce la secuencia bajo la SEQ ID NO:1.

### Misión del invento

El invento se basó en la misión de poner a disposición unas variantes del promotor y/o de la unidad de expresión del gen gap que codifica la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, bajo cuyo control se pueden expresar de manera  
50 ventajosa diferentes genes, tales como por ejemplo el gen lys C que codifica la aspartato cinasa.

Descripción del invento

En los trabajos realizados para desarrollar el presente invento se comprobó que, después de un intercambio de la nucleobase guanina en la posición 362 del promotor del gen gap de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, representado en SEQ ID NO:2, por la nucleobase adenina se aumenta la actividad del promotor.

- 5 Un aumento adicional de la actividad del promotor se comprobó después de un intercambio adicional de las nucleobases  
 citosina en la posición 265 por timina,  
 guanina en la posición 269 por citosina,  
 adenina en la posición 290 por timina así como  
 10 guanina en la posición 292 por adenina  
 en el promotor del gen gap de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, representado en SEQ ID NO:2.

Es objeto del invento, por lo tanto, un polinucleótido aislado con actividad de promotor que comprende un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34.

- 15 La solicitud divulga también un polinucleótido aislado con actividad de promotor, que consiste esencialmente en un nucleótido con la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34. El concepto "esencialmente" significa en este contexto que junto al extremo 5' del polinucleótido según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 está unido un polinucleótido con una longitud de como máximo ( $\leq$ ) 1.000, como máximo ( $\leq$ ) 800, como máximo ( $\leq$ ) 700, como máximo ( $\leq$ ) 600, como máximo ( $\leq$ ) 500 o como máximo ( $\leq$ ) 400 nucleótidos y junto al extremo 3' está unido un polinucleótido con una longitud de como máximo ( $\leq$ ) 15.000, como máximo ( $\leq$ ) 10.000,  
 20 como máximo ( $\leq$ ) 7.500, como máximo ( $\leq$ ) 5.000, como máximo ( $\leq$ ) 2.500, como máximo ( $\leq$ ) 1.000, como máximo ( $\leq$ ) 800, como máximo ( $\leq$ ) 700, como máximo ( $\leq$ ) 600, como máximo ( $\leq$ ) 500 o como máximo ( $\leq$ ) 400 nucleótidos.

Es conforme al invento en tal caso cualquier conveniente combinación de las características de las dos listas.

- Como "combinación conveniente" se entiende, por ejemplo, una combinación de características que conduce a la realización de una combinación eficiente. La transferencia de una zona de ADN mediante una recombinación homóloga es facilitada en la realización experimental mediante la utilización de apéndices de la misma longitud que flanquean a la zona que ha de ser intercambiada. Para la recombinación eficiente entre moléculas de ADN de forma anular son ventajosas unas zonas de homología flanqueadoras más largas, pero la clonación del vector de intercambio es dificultada con un aumento de la longitud de los flancos (Wang y colaboradores, *Molecular Biotechnology* 32:43-53 (2006)). Por lo tanto se prefiere la combinación específica de apéndices de en cada caso  
 25 600 hasta como máximo ( $\leq$ ) 1.000 nucleótidos y se prefieren especialmente preferidos apéndices de en cada caso 750 hasta 850 nucleótidos.

Es objeto del invento además un polinucleótido aislado con actividad de promotor, que se compone de la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34.

- 35 Ciertos detalles acerca de la bioquímica o respectivamente de la estructura química de polinucleótidos, tal como los que se presentan en seres vivos, tales como por ejemplo microorganismos, se encuentran, entre otros, en el libro de texto "Biochemie" de Berg y colaboradores (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg-Berlin, Alemania, 2003; ISBN 3-8274-1303-6).

- Si el polinucleótido se compone de monómeros de desoxirribonucleótidos con las nucleobases o respectivamente bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracilo (U), entonces se habla de desoxirribo-polinucleótidos o de un ácido desoxirribonucleico (ADN). Si el polinucleótido se compone de monómeros de ribonucleótidos con las nucleobases o respectivamente bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y uracil (U) entonces se habla de ribo-polinucleótidos o de un ácido ribonucleico (ARN). En los mencionados polinucleótidos, los monómeros están unidos entre sí por enlaces covalentes mediante un enlace de 3'→ 5'-fosfodiéster.

- 45 Por el concepto de un "polinucleótido con actividad de promotor" o de un "promotor" se entiende un polinucleótido, preferiblemente un desoxirribo-polinucleótido, o respectivamente un ácido nucleico, preferiblemente un ácido desoxirribonucleico (ADN), que establece el punto de iniciación y la frecuencia de iniciación de la transcripción de este polinucleótido en combinación funcional con un polinucleótido que ha de ser transcrito con lo cual se puede influir sobre la fuerza de expresión del polinucleótido controlado.

- 50 A causa de la estructura de doble hebra del ADN, la hebra complementaria con la hebra del protocolo de secuencias complementarias en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 es asimismo un objeto del invento.

Por el concepto de "transcripción" se entiende el proceso, mediante el cual partiendo de una matriz de ADN se produce una molécula de ARN complementaria. En este proceso participan unas proteínas tales como la polimerasa de ARN, los denominados factores Sigma y unas proteínas reguladoras de la transcripción. El ARN sintetizado (ARN

mensajero, ARNm) sirve entonces como matriz en el proceso de la traducción, que conduce entonces al polipéptido o respectivamente a la proteína.

5 Un gen, considerado químicamente, es un polinucleótido. Un polinucleótido, que codifica una proteína / un polipéptido es usada aquí como sinónimo del concepto de "gen". Por consiguiente, los dos conceptos de "gen" y "región codificadora" se utilizan como sinónimos al igual que los dos conceptos "proteína" y "polipéptido".

Por el concepto de una "unión funcional" se entiende en este contexto la disposición en secuencia del polinucleótido con actividad de promotor conforme al invento con otro oligo- o polinucleótido, que conduce a una transcripción del otro polinucleótido.

10 Si en el caso del otro polinucleótido se trata de un polinucleótido designado a continuación como segundo polinucleótido, que codifica un polipéptido / una proteína, que se compone de la región codificadora para un polipéptido que comienza con un codón de iniciación, inclusive el codón de detención y eventualmente inclusive un terminados de la transcripción, entonces una "unión funcional" significa la disposición en secuencia del polinucleótido con actividad de promotor conforme al invento con el segundo polinucleótido, que conduce a una transcripción del segundo polinucleótido y a la traducción del ARN sintetizado.

15 El segundo polinucleótido codifica uno o varios polipéptido(s). Un polinucleótido que codifica una proteína / un polipéptido se compone esencialmente de un codón de iniciación, seleccionado entre el conjunto formado por ATG, GTG y TTG, de manera preferida ATG o GTG, de manera especialmente preferida ATG, de una secuencia codificadora de proteína y de uno o varios codones de iniciación seleccionados entre el conjunto formado por TAA, TAG y TGA.

20 Si el segundo polinucleótido codifica varias proteínas / polipéptidos, entonces delante de cada gen se puede encontrar un sitio de fijación a ribosoma. Detrás del último gen se encuentra eventualmente un terminador.

Preferiblemente el segundo polinucleótido codifica uno o varios polipéptido(s) o respectivamente proteínas de la ruta de biosíntesis de productos químicos finos, seleccionados preferiblemente entre el conjunto formado por aminoácidos proteinógenos, aminoácidos no proteinógenos, vitaminas, nucleósidos, nucleótidos y ácidos orgánicos.

25 El segundo polinucleótido se compone preferiblemente de uno o varios de los polinucleótidos registrados en la Tabla 1 del documento de patente europea EP 1 108 790 A2 que se incluye con ello por su referencia.

Preferiblemente, en este contexto el segundo polinucleótido se compone de uno o varios de los genes o respectivamente polinucleótidos, que codifican enzimas de la ruta del pentosafofosfato, seleccionados entre el conjunto formado por:

- 30 a) el polinucleótido (gen zwf), que codifica la subunidad Zwf de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (Zwf, N° DE EC: 1.1.1.49),
- b) el polinucleótido (gen opcA), que codifica la subunidad OpcA de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (OpcA, N° DE EC: 1.1.1.49),
- c) el polinucleótido (gen devB), que codifica una 6-fosfogluconolactonasa (DevB, N° DE EC: 3.1.1.31),
- 35 d) el polinucleótido (gen tkt), que codifica una transcetolasa (Tkt, N° DE EC: 2.2.1.1),
- e) el polinucleótido (gen tal), que codifica una transaldolasa (Tal, N° DE EC: 2.2.1.2),
- f) el polinucleótido (gen gnd), que codifica una 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd, N° DE EC: 1.1.1.44),
- g) el polinucleótido (gen rpe), que codifica una ribulosa-fosfato-3-epimerasa (Rpe, N° DE EC: 5.1.3.1), y
- h) el polinucleótido (gen rpi), que codifica una ribosa-5-fosfato isomerasa B (Rpi, N° DE EC: 5.3.1.6),

40 siendo preferidos especialmente los genes zwf y opcA.

De modo aún más preferido el segundo nucleótido se compone de uno o varios de los genes o respectivamente polinucleótidos, que codifican enzimas de la anaplerosis y de la gluconeogénesis, seleccionados entre el conjunto formado por:

## ES 2 624 926 T3

- i) el polinucleótido (gen ppc), que codifica una fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc, N° DE EC: 4.1.1.31),
- j) el polinucleótido (gen fbp), que codifica una fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbp, N° DE EC: 3.1.3.11), y
- k) el polinucleótido (gen pyc), que codifica una piruvato-carboxilasa (Pyc, N° DE EC: 6.4.1.1),

siendo especialmente preferido el gen pyc.

5 En conexión con la preparación de L-lisina, el segundo polinucleótido se compone preferiblemente de uno o varios de los genes o respectivamente polinucleótidos, que codifican enzimas de la biosíntesis de L-lisina, seleccionados entre el conjunto formado por:

- l) el polinucleótido (gen dapA), que codifica una dihidrodipicolinato sintasa (DapA, N° de EC: 4.2.1.52),
- 10 m) el polinucleótido (gen asd), que codifica una aspartatosemialdehído deshidrogenasa (Asd, N° de EC: 1.2.1.11),
- n) el polinucleótido (gen ddh), que codifica una meso-diaminopimelato deshidrogenasa (Ddh, N° de EC: 1.4.1.16),
- o) el polinucleótido, (gen lysA), que codifica una diaminopimelat-descarboxilasa (LysA, N° de EC: 4.1.1.20),
- 15 p) el polinucleótido (gen Aat), que codifica una aspartato-aminotransferasa (Aat, N° de EC: 2.6.1.1),
- q) el polinucleótido (gen lysE), que codifica un polipéptido con actividad exportadora de L-lisina (LysE, lisina eflujo permeasa),
- r) el polinucleótido (gen dapB), que codifica una dihidrodipicolinato reductasa (DapB, N° de EC: 1.3.1.26),
- s) el polinucleótido (gen lysC), que codifica una aspartatocinasa (LysC, N° DE EC: 2.7.2.4),
- 20 t) el polinucleótido (gen dapC), que codifica una succinildiaminopimelato aminotransferasa, AT clase I (DapC, N° de EC: 2.6.1.17),
- u) el polinucleótido (gen dapD), que codifica una tetrahydrodipicolinato succinilasa (DapD, N° DE EC: 2.3.1.117),
- 25 v) el polinucleótido (gen dapE), que codifica una succinildiaminopimelato desuccinilasa (DapE, N° DE EC: 3.5.1.18), y
- w) el polinucleótido (gen dapF), que codifica una diaminopimelato epimerasa (DapF, N° DE EC: 5.1.1.7),

siendo especialmente preferidos los genes dapA, asd, ddh, lysA, lysE, dapB y lysC y siendo muy especialmente preferidos los genes asd y lysC, puesto que particularmente con los dos mencionados en último término se consigue un refuerzo de la producción adicional especial de L-lisina.

30 En conexión con la preparación de L-valina, L-isoleucina, ácido  $\alpha$ -cetoisovaleriánico, ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvaleriánico o ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico, el segundo polinucleótido se compone preferiblemente de uno o varios de los genes o respectivamente polinucleótidos, que codifican enzimas de la biosíntesis de L-valina, L-isoleucina, ácido  $\alpha$ -cetoisovaleriánico, ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvaleriánico o ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico, seleccionados entre el conjunto formado por

- 35 x) los polinucleótidos (gen ilvB y gen ilvN), que codifican las subunidades de una acetolactato sintasa (IlvBN, N° de EC: 4.1.3.18),
- y) el polinucleótido (gen ilvC), que codifica una isómerorreductasa (IlvC, N° de EC: 1.1.1.86),
- z) el polinucleótido (gen ilvD), que codifica una dihidroxi-ácido deshidratasa (IlvD, N° de EC: 4.2.1.9),

- aa) el polinucleótido (gen *ilvE*), que codifica una transaminasa (*IlvE*, N° de EC: 2.6.1.42),
- bb) el polinucleótido (gen *ilvA*) que codifica una treoninadeshidratasa (*IlvA*, N° de EC: 4.3.1.19),
- cc) el polinucleótido (gen *hom*) que codifica una homoserinadeshidrogenasa (*Hom*, N° de EC: 1.2.1.11)
- dd) el polinucleótido (gen *thrB*), que codifica una homoserinacinasasa (*ThrB*, N° de EC: 2.7.1.39)
- 5 ee) el polinucleótido (gen *thrC*), que codifica una treoninasintasa (*ThrC*, N° de EC: 4.2.3.1)
- ff) el polinucleótido (gen *leuA*), que codifica una isopropilmalatosintasa (*LeuA*, N° de EC: 2.3.3.13)
- gg) el polinucleótido (gen *leuB*), que codifica una isopropilmalatodeshidrogenasa (*LeuB*, N° de EC: 1.1.1.85)
- hh) el polinucleótido (gen *leuC*), que codifica la subunidad grande de una isopropilmalatoisomerasa (*LeuC*, N° de EC: 4.2.1.33)
- 10 ii) el polinucleótido (gen *leuD*), que codifica la subunidad pequeña de una isopropilmalatoisomerasa (*LeuD*, N° de EC: 4.2.1.33),

siendo especialmente preferidos los genes *ilvBN*, *hom*, *ilvA*, *ilvC*, *ilvD* y *ilvE* para isoleucina y valina, siendo especialmente preferidos los genes *ilvBN*, *ilvC* y *ilvD* para ácido  $\alpha$ -cetovaleriánico (KIV) y ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvaleriánico (KMV) y siendo especialmente preferidos los genes *ilvBN*, *ilvC*, *ilvD*, *leuA*, *leuB*, *leuC* y *leuD* para ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico (KIC).

En conexión con la preparación de L-ornitina el segundo polinucleótido se compone preferiblemente de uno o varios de los genes o respectivamente polinucleótidos, que codifican enzimas de la biosíntesis de L-ornitina, seleccionados entre el conjunto formado por:

- 20 jj) el polinucleótido (gen *lysE*), que codifica un transportador de lisina/ornitina (número de solicitud DE 102010003419.3)
- kk) el polinucleótido (gen *argB*), que codifica una N-acetilglutamatoquinasasa (*ArgB*, N° de EC: 2.7.2.8)
- ll) el polinucleótido (gen *gdh*), que codifica una glutamato deshidrogenasa (*Gdh*, N° de EC: 1.4.1.3),
- mm) el polinucleótido (gen *argJ*), que codifica una glutamato N-acetiltransferasa (*ArgJ*, N° de EC: 2.3.1.35 y N° de EC: 2.3.1.1),
- 25 nn) el polinucleótido (gen *argC*), que codifica una N-acetil-gamma-glutamilo-fosfato reductasa (*ArgC*, N° de EC: 1.2.1.38), y
- oo) el polinucleótido (gen *argD*), que codifica una acetil-ornitina aminotransferasa (*ArgD*, N° de EC: 2.6.1.11),

siendo especialmente preferidos los genes *lysE* y *argB*.

El promotor conforme al invento se puede utilizar por consiguiente en cada uno de los casos para (sobre)expresar el segundo polinucleótido en *Corynebacterium glutamicum*.

El segundo polinucleótido es colocado detrás del promotor conforme al invento, es decir junto al extremo 3', de manera tal que los dos polinucleótidos están unidos funcionalmente entre sí directamente o por medio de un oligonucleótido de puente o un polinucleótido de puente. Preferiblemente, ambos polinucleótidos están unidos funcionalmente entre sí directamente o por medio de un oligonucleótido de puente o un polinucleótido de puente.

35 Este oligonucleótido de puente o polinucleótido de puente se compone de desoxirribonucleótidos.

La expresión "unidos funcionalmente entre sí directamente" significa en este contexto que el nucleótido con el nucleótido adenosina en la posición 461 junto al extremo 3' de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 está unido directamente con el primer nucleótido del codón de iniciación de una región codificadora. A partir de esto resultan los

denominados ARNm "sin líder", que comienza directamente con el codón de iniciación AUG terminal en 5' y por consiguiente no tienen ninguna otra señal de iniciación de la traducción.

5 La expresión "unidos funcionalmente entre sí por medio de un oligonucleótido de puente" significa en este contexto que el nucleótido con el nucleótido adenosina en la posición 461 junto al extremo 3' de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 está unido mediante un oligonucleótido con una longitud de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos con el primer nucleótido del codón de iniciación de una región codificadora.

10 La expresión "unidos funcionalmente entre sí por medio de un polinucleótido de puente" significa en este contexto que el nucleótido con el nucleótido adenosina en la posición 461 junto al extremo 3' de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 está unido mediante un polinucleótido con una longitud de 6 hasta como máximo ( $\leq$ ) 600 nucleótidos con el primer nucleótido del codón de iniciación de una región codificadora.

La expresión "unidos funcionalmente entre sí" significa en este contexto que el segundo polinucleótido está unido al polinucleótido con actividad de promotor conforme al invento de tal manera que se garantiza la transcripción del segundo polinucleótido y la traducción del ARN sintetizado.

15 Según sea el requisito técnico, el polinucleótido de puente tiene una longitud de  
6 - 600, 6 - 500, 6 - 400, 6 - 300, 6 - 200, 6 - 180, 6 - 160, 6 - 140, 6 - 120, 6 - 100, 6 - 80, 6 - 60, 6 - 50, 6 - 40, 6 - 30, 6 - 28, 6 - 27, 6 - 26, 6 - 25 o

8 - 600, 8 - 500, 8 - 400, 8 - 300, 8 - 200, 8 - 180, 8 - 160, 8 - 140, 8 - 120, 8 - 100, 8 - 80, 8 - 60, 8 - 50, 8 - 40, 8 - 30, 8 - 28, 8 - 27, 8 - 26, 8 - 25 o

20 10 - 600, 10 - 500, 10 - 400, 10 - 300, 10 - 200, 10 - 180, 10 - 160, 10 - 140, 10 - 120, 10 - 100, 10 - 80, 10 - 60, 10 - 50, 10 - 40, 10 - 30, 10 - 28, 10 - 27, 10 - 26, 10 - 25 o

12 - 600, 12 - 500, 12 - 400, 12 - 300, 12 - 200, 12 - 180, 12 - 160, 12 - 140, 12 - 120, 12 - 100, 12 - 80, 12 - 60, 12 - 50, 12 - 40, 12 - 30, 12 - 28, 12 - 27, 12 - 26, 12 - 25 o

14 - 600, 14 - 500, 14 - 400, 14 - 300, 14 - 200, 14 - 180, 14 - 160, 14 - 140, 14 - 120, 14 - 100, 14 - 80, 14 - 60, 14 - 50, 14 - 40, 14 - 30, 14 - 28, 14 - 27, 14 - 26, 14 - 25 o

25 16 - 600, 16 - 500, 16 - 400, 16 - 300, 16 - 200, 16 - 180, 16 - 160, 16 - 140, 16 - 120, 16 - 100, 16 - 80, 16 - 60, 16 - 50, 16 - 40, 16 - 30, 16 - 28, 16 - 27, 16 - 26, 16 - 25 o

18 - 600, 18 - 500, 18 - 400, 18 - 300, 18 - 200, 18 - 180, 18 - 160, 18 - 140, 18 - 120, 18 - 100, 18 - 80, 18 - 60, 18 - 50, 18 - 40, 18 - 30, 18 - 28, 18 - 27, 18 - 26, 18 - 25 o

30 20 - 600, 20 - 500, 20 - 400, 20 - 300, 20 - 200, 20 - 180, 20 - 160, 20 - 140, 20 - 120, 20 - 100, 20 - 80, 20 - 60, 20 - 50, 20 - 40, 20 - 30, 20 - 28, 20 - 27, 20 - 26, 20 - 25 nucleótidos.

En una forma de realización especialmente preferida, el polinucleótido de puente tiene una longitud de 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos, resultando en el presente contexto preferiblemente unas construcciones artificiales funcionales, como se puede reconocer también en los Ejemplos 3 hasta 5.

35 En el caso del polinucleótido de puente se trata preferiblemente de un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que garantiza la traducción de los ARN sintetizados. Una tal secuencia se designará por los expertos también como sitio de fijación a ribosomas (RBS) o también como secuencia de Shine Dalgarno.

40 Otro objeto del invento es correspondientemente un polinucleótido aislado que se compone de un polinucleótido según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34, que con el nucleótido adenosina en la posición 461 está unido funcionalmente junto al extremo 3' con un segundo polinucleótido, que contiene junto al extremo 5' un codón de iniciación ATG o GTG y codifica uno o varios polipéptido(s), directamente o por medio de un polinucleótido de puente, que garantiza la traducción de ARN. Preferiblemente ambos polinucleótidos están unidos entre sí funcionalmente por medio de un polinucleótido de puente

45 Otro objeto del invento es también un polinucleótido aislado, que se compone de un polinucleótido según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34, que con el nucleótido adenosina en la posición 461 está unido funcionalmente junto al extremo 3' con un oligonucleótido de puente.

Otro objeto del invento es además un polinucleótido aislado, que se compone de un polinucleótido según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34, que con el nucleótido adenosina en la posición 461 está unido funcionalmente junto al extremo 3' con un polinucleótido de puente, que garantiza la traducción de ARN.

5 Los sitios de fijación a ribosomas del género *Corynebacterium*, preferiblemente de la especie *Corynebacterium glutamicum*, están bien descritos. Por Amador y colaboradores (*Microbiology*, 145, 915-924 (1999)) se determinó la anti-Shine-Dalgarno de ARNr 16S de *Corynebacterium glutamicum*; ella se representa en SEQ ID NO:4. La secuencia indicada por Martin y colaboradores (*Journal of Biotechnology* 104, 41-53 (2003)) se reproduce en SEQ ID NO:5

Otros ejemplos de apropiados sitios de fijación a ribosomas son, entre otros

10 el sitio de fijación a ribosomas del gen *ppc* de *C. glutamicum* ATCC13032 (O'Regan y colaboradores, *Gene* 77, 237-251 (1989)), representado en SEQ ID NO:6;

15 el sitio de fijación a ribosomas del gen *aceA* de *C. glutamicum* ATCC13032 (Reinscheid y colaboradores, *Journal of Bacteriology* 176 (12), 3474-3483 (1994)), representado en SEQ ID NO:7;

el sitio de fijación a ribosomas del gen *thiX* de *C. glutamicum* ATCC13032 (Reinscheid y colaboradores, *Journal of Bacteriology* 176 (12), 3474-3483 (1994)), representado en SEQ ID NO:8;

20 el sitio de fijación a ribosomas del gen *sod* de *C. glutamicum* ATCC13032 (documento de solicitud de patente internacional WO2005/059144), representado en SEQ ID NO:9;

el sitio de fijación a ribosomas del gen *tuf* de *C. glutamicum* ATCC13032 (documento WO2005/059093), representado en SEQ ID NO:10;

25 el sitio de fijación a ribosomas según SEQ ID NO:44 del documento EP 1918378, representado en SEQ ID NO:11;

el sitio de fijación a ribosomas del gen *fbp* de *C. glutamicum* ATCC13032, representado en SEQ ID NO:12;

el sitio de fijación a ribosomas del gen *gap* de *C. glutamicum* ATCC13032 (Eikmanns, *Journal of Bacteriology* 174 (19), 6076-6086 (1992)) representado en SEQ ID NO:13.

30 Preferiblemente, el polinucleótido de puente contiene el sitio de fijación a ribosomas del gen *gap* representado en SEQ ID NO:13 o del gen *fbp* representado en SEQ ID NO:12.

Unas formas de realización especialmente preferidas del polinucleótido de puente, que contienen el sitio de fijación a ribosomas del gen *gap* están representadas en SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17.

35 Una forma realización especialmente preferida del polinucleótido de puente, que contiene el sitio de fijación a ribosomas del gen *fbp* se representa en SEQ ID NO:18,.

Estas formas de realización especialmente preferidas del polinucleótido de puente garantizan la traducción de ARN de manera ventajosa.

40 Para facilitar la unión química entre el polinucleótido conforme al invento que tiene la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34, el polinucleótido de puente, que garantiza la traducción de ARN y el segundo polinucleótido, que codifica uno o varios polipéptido(s), que junto al extremo 5' tiene un codón de iniciación ATG o GTG, se pueden incorporar en estos polinucleótidos junto a sus extremos 5' y 3' unas secuencias de nucleótidos funcionales necesarias para la clonación, que también pueden permanecer por lo menos parcialmente conservadas también después de la clonación.

45 El concepto de "secuencia de nucleótidos funcional necesaria para la clonación" representa en el presente contexto cualquier arbitrario sitio de corte de REII (endonucleasa de restricción del tipo II) presente, cuya secuencia se compone por regla general de 4 hasta 8 nucleótidos.

50 Complementariamente se mencionará en este lugar que por medio de una mutagénesis específica de un sitio mediante unos cebadores de la mutagénesis o en el caso de una síntesis génica de novo (p.ej. por la entidad GENEART AG (Regensburg, Alemania) de las secuencias de nucleótidos para la eliminación de sitios de corte para endonucleasas de restricción se pueden introducir unas mutaciones silenciosas dentro de la secuencia, para que estos sitios de corte se puedan utilizar ventajosamente para posteriores etapas de clonación.

El polinucleótido, que resulta mediante la unión funcional del promotor conforme al invento con el polinucleótido de puente, que garantiza la traducción de ARN, es designado en lo sucesivo también como unidad de expresión.

Es objeto del invento además la utilización del promotor conforme al invento o de la unidad de expresión conforme al invento para la expresión de genes o respectivamente polinucleótidos deseados en microorganismos. El promotor conforme al invento o la unidad de expresión conforme al invento garantiza la transcripción y la traducción del ARN, preferiblemente ARNm, sintetizado, para dar un polipéptido.

La expresión se lleva a cabo de manera preferida en microorganismos del género *Corynebacterium*. Dentro del género *Corynebacterium* se prefieren las cepas que se basan en las siguientes especies: *Corynebacterium efficiens*, habiendo sido depositada la cepa tipo como DSM44549, *Corynebacterium glutamicum*, habiendo sido depositada la cepa tipo como ATCC13032, y *Corynebacterium ammoniagenes*, habiendo sido depositada la cepa tipo como ATCC6871. Se prefiere muy especialmente la especie *Corynebacterium glutamicum*.

De esta manera se pueden llevar a expresión unos polinucleótidos, que codifican unos polipéptidos con una propiedad, preferiblemente una actividad enzimática, que no están presentes o no son detectables en el correspondiente anfitrión. Así, Yukawa y colaboradores describen por ejemplo la expresión de genes procedentes de *Escherichia coli* para el aprovechamiento de D-xilosa en *Corynebacterium glutamicum* R cajo el control del promotor constitutivo *P<sub>trc</sub>* (*Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 691-699 (2008)).

El promotor conforme al invento o la unidad de la expresión conforme al invento se utiliza además para sobreexpresar unos deseados genes o respectivamente polinucleótidos en microorganismos (sobreexpresión).

Por el concepto de sobreexpresión se entiende por lo general una elevación de la concentración o actividad intracelular de un ácido ribonucleico, de una proteína (un polipéptido) o de una enzima en comparación con la cepa de partida (cepa progenitora) o cepa de tipo silvestre, cuando ésta es la cepa de partida. Por una cepa de partida (cepa progenitora) se entiende la cepa en la que se habían llevado a cabo las medidas técnicas que conducen a la sobreexpresión.

En el caso de la sobreexpresión se prefieren los métodos de sobreexpresión recombinante. Dentro de este concepto se recopilan todos los métodos en los cuales un microorganismo se produce mediante utilización de una molécula de ADN puesta a disposición *in vitro*. Tales moléculas de ADN abarcan por ejemplo promotores, casetes de expresión, genes, alelos, regiones de codificación, etc. Éstas son transformadas mediante métodos de transformación, conjugación, traducción o similares en el deseado microorganismo.

En el caso del presente invento, al referirse a los promotores se trata preferiblemente de un polinucleótido según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 y en el caso de las casetes de expresión se trata preferiblemente de un polinucleótido según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34, que está unido funcionalmente con el nucleótido adenosina en la posición 461 junto al extremo 3' con un polinucleótido de puente, que garantiza la traducción de ARN.

Mediante las medidas técnicas de sobreexpresión mediante utilización del promotor conforme al invento o de la unidad de expresión conforme al invento se aumenta la actividad o la concentración del correspondiente polipéptido en general en por lo menos 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, de manera preferida como máximo hasta 1.000 %, 2.000 %, 4.000 %, 10.000 % o 20.000 % referido a la actividad o concentración del polipéptido en la cepa antes de la medida técnica que conduce a la sobreexpresión.

El grado de la expresión o respectivamente sobreexpresión se puede comprobar mediante medición de la cantidad del ARNm que ha sido transcrito por el gen, mediante determinación de la cantidad del polipéptido y mediante determinación de la actividad enzimática.

Para la determinación de la cantidad de ARNm se puede utilizar, entre otros, el método de "transferencia Northern" y de PCR RT cuantitativa. En el caso de la PCR RT cuantitativa, delante de la reacción en cadena de polimerasa se conecta una transcripción inversa. Para esto se puede utilizar el sistema LightCycler™ de la entidad Roche Diagnostics (Boehringer Mannheim GmbH, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania), tal como ha sido descrito por ejemplo en la referencia de Jungwirth y colaboradores (*FEMS Microbiology Letters* 281, 190-197 (2008)). La concentración de la proteína se puede determinar por medio de una separación de proteínas y una subsiguiente identificación óptica en 1 y 2 dimensiones de la concentración de proteínas con un correspondiente programa lógico de evaluación en el gel. Un método habitual para la producción de los geles proteínicos en el caso de bacterias corineformes y para la identificación de las proteínas es el modo de proceder descrito por Hermann y colaboradores (*Electrophoresis*, 22:1712-23 (2001)). La concentración de proteínas puede ser determinada asimismo mediante una hibridación por transferencia Western con un anticuerpo específico para la proteína que ha de ser detectada (Sambrook y colaboradores, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) y una subsiguiente evaluación óptica con un correspondiente programa lógico para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1998) *Biospektrum* 5:32-39; Lottspeich,

Angewandte Chemie 321: 2630-2647 (1999)). La significancia estadística de los datos resultantes se determina mediante un ensayo T (Gosset ,Biometrika 6(1): 1-25 (1908)).

La medida técnica para la sobreexpresión de genes deseados mediante utilización del promotor conforme al invento se puede combinar de un modo apropiado con otras medidas técnicas para la sobreexpresión.

- 5 Para la consecución de una sobreexpresión están a disposición en el estado de la técnica un gran número de métodos. A éstos pertenece, junto a la modificación de las secuencias de nucleótidos que regulan o respectivamente controlan la expresión del gen, también la elevación del número de copias.

10 La elevación del número de copias puede efectuarse mediante unos plásmidos que se replican en el citoplasma del microorganismo. Para esto se han descrito en el estado de la técnica una plétora de plásmidos para los más diferentes grupos de microorganismos, con los cuales se puede ajustar la deseada elevación del número de copias del gen. Unos apropiados plásmidos para el género *Corynebacterium* se han descrito por ejemplo en la referencia de Tauch y colaboradores (Journal of Biotechnology 104 (1-3), 27-40, (2003)) o en la referencia de Stansen y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 71, 5920-5928 (2005)).

15 La elevación del número de copias en por lo menos una (1) copia puede efectuarse por lo demás mediante inserción de otras copias en el cromosoma del microorganismo. Unos métodos apropiados para el género *Corynebacterium* se describen por ejemplo en los documentos de solicitudes de patente internacionales WO 03/014330, WO 03/040373 y WO 04/069996.

20 La elevación de la expresión génica puede efectuarse además colocando o respectivamente uniendo funcionalmente varios promotores delante del gen deseado o respectivamente uniéndolos funcionalmente con el gen que se ha de expresar y de esta manera se llega a una expresión aumentada. Ejemplos de ellos se describen en el documento WO 2006/069711.

25 La transcripción de un gen es controlada eventualmente mediante unas proteínas que reprimen (proteínas de represión) o favorecen (proteínas activadoras) la transcripción. Para la consecución de una sobreexpresión es por lo tanto asimismo posible aumentar la expresión de proteínas activadoras o disminuir o excluir la expresión de proteínas represoras o también eliminar los sitios de fijación de las proteínas represoras.

30 La velocidad de la elongación es influenciada mediante la utilización de codones, mediante el uso de codones para ARN's t (transferencia) que se presentan frecuentemente en la cepa de partida, se puede reforzar la traducción. Por lo demás, el intercambio de un codón de iniciación con el codón ATG presente con la mayor frecuencia en muchos microorganismos (77 % en *Escherichia coli*) se puede mejorar considerablemente la traducción, puesto que en el plano del ARN el codón AUG es dos o tres veces más efectivo que por ejemplo los codones GUG y UUG (Khudyakov y colaboradores, FEBS Letters 232(2):369-71 (1988); Reddy y colaboradores, Proceedings of the National Academy of Sciences of the EE.UU. 82(17):5656-60 (1985)). También el entorno de secuencia del codón de iniciación puede ser optimizado, puesto que se han descrito efectos cooperadores entre el codón de partida y las zonas flanqueadoras (Stenstrom y colaboradores, Gene 273(2):259-65 (2001); Hui y colaboradores, EMBO Journal 3(3):623-9 (1984)).

Unas instrucciones para el trato con ADN, la digestión y la ligación de ADN, la transformación y la selección de transformantes se pueden encontrar, entre otros, en el conocido manual de Sambrook y colaboradores "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)..

Son objeto del invento también unos vectores que contienen el polinucleótido conforme al invento.

- 40 Kirchner y Tauch (Journal of Biotechnology 104:287-299 (2003)) describen una selección de los vectores que se han de usar en *Corynebacterium glutamicum*.

45 La recombinación homóloga permite, mediante utilización de los vectores conforme al invento, el intercambio de segmentos de ADN en el cromosoma por polinucleótidos conformes al invento, que son transportados a la célula mediante el vector. Para la recombinación eficiente entre la molécula de ADN de forma anular del vector y del ADN diana en el cromosoma la zona de ADN que ha de ser intercambiada es provista con el polinucleótido conforme al invento junto a los extremos con unas secuencias de nucleótidos que son homólogas con respecto al sitio diana, éstas determinan el sitio de la integración del vector o respectivamente del intercambio del ADN.

Así, el polinucleótido conforme al invento con actividad de promotor

- 50 1. se puede intercambiar en el cromosoma con el promotor nativo en el sitio génico nativo del segundo polinucleótido o 2. se puede integrar con el segundo polinucleótido junto a su sitio génico nativo o se puede integrar en otro sitio génico.

Mediante "intercambio del promotor nativo en el sitio génico nativo del segundo polinucleótido" se entiende la circunstancia de que es intercambiado el promotor presente en la naturaleza de aquel gen que se presenta en la naturaleza en una copia junto a su sitio génico en el correspondiente tipo silvestre o en el correspondiente organismo de partida en forma de su secuencia de nucleótidos.

5 Por el concepto de "otro sitio génico" se entiende un sitio génico cuya secuencia de nucleótidos es diferente de la secuencia del segundo polinucleótido. Este otro sitio génico, o respectivamente la secuencia de nucleótidos presente en el otro sitio génico, está situado preferiblemente en el cromosoma y por lo general no es esencial para el crecimiento ni para la producción de los productos químicos deseados. Por lo demás se pueden utilizar unas zonas intergénicas en el cromosoma, es decir unas secuencias de nucleótidos sin función codificadora.

10 La expresión o sobreexpresión se lleva a cabo preferiblemente en unos microorganismos del género del género *Corynebacterium*. Dentro del género *Corynebacterium* se prefieren las cepas que se basan en las siguientes especies: *Corynebacterium efficiens*, habiendo sido depositada la cepa tipo como DSM44549, *Corynebacterium glutamicum*, habiendo sido depositada la cepa tipo como ATCC13032, y *Corynebacterium ammoniagenes*, habiendo sido depositada la cepa tipo como ATCC6871. Se prefiere muy especialmente la especie *Corynebacterium glutamicum*.

15 Algunos representantes de la especie *Corynebacterium glutamicum* son conocidos en el estado de la técnica también con otras denominaciones. A éstas pertenecen por ejemplo: la cepa ATCC13870, que se designó como *Corynebacterium acetoacidophilum*, la cepa DSM20137, que se designó como *Corynebacterium lilium*, la cepa ATCC17965, que se designó como *Corynebacterium melassecola*, la cepa ATCC14067, que se designó como *Brevibacterium flavum*, la cepa ATCC13869, que se designó como *Brevibacterium lactofermentum*, y la cepa ATCC14020, que se designó como *Brevibacterium divaricatum*.

20 El concepto de "*Micrococcus glutamicus*" para *Corynebacterium glutamicum* es asimismo habitual. Algunos representantes de la especie *Corynebacterium efficiens* se designaron en el estado de la técnica también como *Corynebacterium thermoaminogenes*, como por ejemplo la cepa FERM BP-1539.

25 Los microorganismos o respectivamente las cepas (cepas de partida) que se emplean para las medidas técnicas conformes al invento de la expresión o sobreexpresión poseen preferentemente ya la capacidad de segregar un deseado producto químico fino en el medio nutritivo que les rodea y acumularlo allí. Para esto se utiliza a continuación también la expresión "producir". Particularmente las cepas empleadas para las medidas técnicas de la sobreexpresión poseen la capacidad de enriquecer o respectivamente acumular en la célula o en el medio nutritivo  $\geq$  (por lo menos)  $\geq 0,10$  g/l,  $\geq 0,25$  g/l,  $\geq 0,5$  g/l,  $\geq 1,0$  g/l,  $\geq 1,5$  g/l,  $\geq 2,0$  g/l,  $\geq 4$  g/l o  $\geq 10$  g/l del deseado producto químico fino  $\leq$  (como máximo) 120 horas,  $\leq 96$  horas, 48 horas,  $\leq 36$  horas,  $\leq 24$  horas o  $\leq 12$  horas. En el caso de las cepas de partida se trata preferiblemente de unas cepas que se habían producido por mutagénesis y selección, mediante técnicas de ADN recombinante o mediante una combinación de ambos métodos.

30 Es comprensible para un experto el hecho de que se puede llegar a un microorganismo apropiado para las medidas técnicas del invento también mediante el recurso de que en una cepa silvestre tal como por ejemplo en la cepa tipo ATCC 13032 o en la cepa ATCC 14067 de *Corynebacterium glutamicum*, se emplea en primer lugar el promotor conforme al invento según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 para la sobreexpresión de los genes deseados y a continuación mediante otras medidas técnicas genéticas descritas en el estado de la técnica se provoca que el microorganismo produzca el o los deseado(s) producto(s) químico(s) fino(s).

35 Por el concepto de "productos químicos finos" se entienden para las medidas técnicas del invento aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, nucleósidos y nucleótidos. Se prefieren especialmente aminoácidos proteinógenos, aminoácidos no proteinógenos y ácidos orgánicos.

40 Por el concepto de "aminoácidos proteinógenos" se entienden los aminoácidos que se presentan en proteínas naturales, es decir en proteínas de microorganismos, plantas, animales o seres humanos. Ellos sirven como unidades estructurales para proteínas, dentro de las que ellos están unidos entre sí a través de enlaces peptídicos.

45 Los conceptos de proteína y polipéptido son recíprocamente intercambiables.

Si en lo sucesivo se menciona L-aminoácidos proteinógenos se piensa con este concepto en uno o varios de los aminoácidos inclusive sus sales, seleccionados entre el conjunto formado por ácido L-aspártico, L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-ácido glutámico, L-glutamina, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-arginina, L-prolina y eventualmente L-selenocisteína y L-pirrolisina. Son especialmente preferidos los L-aminoácidos L-lisina, L-triptófano, L-metionina, L-valina, L-isoleucina y L-prolina. Se prefieren muy especialmente L-lisina y L-valina.

Si en lo sucesivo se menciona L-lisina o lisina, con este concepto se piensa no solamente en las bases sino también en las sales tales como p.ej. el monohidrocloreto de lisina o el sulfato de lisina.

A los aminoácidos no proteinógenos, pertenecen, entre otros, L-ornitina y L-homoserina.

5 A los ácidos orgánicos pertenecen, entre otros, unos  $\alpha$ -cetoácidos. Son especialmente preferidos ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico (KIC), ácido  $\alpha$ -cetovaleriánico (KIV) y ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metilvaleriánico (KMV).

Unas cepas de la especie *Corynebacterium glutamicum* que segregan o respectivamente producen L-lisina son por ejemplo:

*Corynebacterium glutamicum* MH20-22B (= DSM16835) descrita en Menkel y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 55(3), 684-688 (1989)) y depositada como DSM16835,

10 *Corynebacterium glutamicum* DM1729 descrita bei Georgi y colaboradores (Metabolic Engineering 7, 291-301 (2005)) y en EP 1 717 616 a2 y depositada como DSM17576,

*Corynebacterium glutamicum* DSM13994 descrita en el documento US 6.783.967, y

*Corynebacterium glutamicum* DM1933 descrita en la referencia de Blombach y colaboradores (Appl Environ Microbiol. Ene de 2009;75(2):419-27).

15 Una cepa de la especie *Corynebacterium efficiens*, que segrega o respectivamente produce L-lisina es por ejemplo:

*Corynebacterium thermoaminogenes* AJ12521 (= FERM BP-3304) descrita en el documento US 5.250.423.

Los microorganismos productores de L-lisina poseen típicamente una aspartato cinasa resistente o respectivamente desensibilizada a la "feed back" [retroalimentación]. Como aspartato cinasas resistentes a la "feed back" [retroalimentación] se entienden unas aspartato cinasas (LysC) que, en comparación con la forma silvestre (tipo silvestre) poseen una más pequeña sensibilidad frente a la inhibición por mezclas de lisina y treonina o por mezclas de AEC (aminoetilcisteína) y treonina o lisina a solas o AEC a solas. Los genes o respectivamente alelos, que codifican estas aspartato cinasas desensibilizadas en comparación con el tipo silvestre, se designan también como alelos lysC<sup>FBR</sup>. En el caso de las aspartato cinasas de la especie *Corynebacterium glutamicum* el tipo silvestre apropiado es la cepa ATCC13032. En el estado de la técnica se han descrito numerosos alelos lysC<sup>FBR</sup> que codifican variantes de aspartato cinasas, que poseen unos intercambios de aminoácidos en comparación con la proteína de tipo silvestre. En el caso de bacterias del género *Corynebacterium* el gen lys se designa también como gen ask. En el caso de enterobacteriáceas la aspartato cinasa codificada por el gen lys se designará también como aspartato cinasa III.

Una lista detallada con datos de qué intercambios de aminoácidos en la proteína aspartato cinasa de *Corynebacterium glutamicum* conducen a una desensibilización está contenida entre otros en el documento WO2009141330A1 (desde página 10, línea 21 hasta página 13, línea 17), que se incluye en la presente por su referencia. Preferentemente se seleccionan unas variantes de aspartato cinasas que llevan los siguientes intercambios de aminoácidos seleccionados entre el conjunto formado por: en la posición 380 de la secuencia de aminoácidos L-isoleucina en lugar de L-treonina y eventualmente en la posición 381 L-fenilalanina en lugar de L-serina, en la posición 311 L-isoleucina en lugar de L-treonina y en la posición 279 L-treonina en lugar de L-alanina.

Una cepa de la especie *Corynebacterium glutamicum* que segrega o respectivamente produce L-metionina es por ejemplo

*Corynebacterium glutamicum* M1179 (= DSM 17322) descrita en el documento WO 2007/011939

40 Unos representantes conocidos de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-triptófano son por ejemplo:

*Corynebacterium glutamicum* K76 (= Ferm BP-1847) descrita en el documento US 5.563.052,

*Corynebacterium glutamicum* BPS13 (= Ferm BP-1777) descrita en el documento US 5.605.818, y

*Corynebacterium glutamicum* Ferm BP-3055 descrita en el documento US 5.235.940.

Unos representantes conocidos de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-valina son por ejemplo:

Brevibacterium lactofermentum FERM BP-1763 descrita en el documento US 5.188.948,

Brevibacterium lactofermentum FERM BP-3007 descrita en el documento US 5.521.074,

5 Corynebacterium glutamicum FERM BP-3006 descrita en el documento US 5.521.074, y

Corynebacterium glutamicum FERM BP-1764 descrita en el documento US 5.188.948.

Los microorganismos productores de L-valina poseen típicamente una acetolactato sintasa (AHAS, EC 4.1.3.18), resistente o respectivamente desensibilizada para la "feed-back" (retroalimentación), que es la primera enzima de la ruta paralela de metabolismo para la sintasa de isoleucina, valina y leucina (Umbarger, H. E. 1987. Biosynthesis of the branched-chain amino acids, p. 352-367. en F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, y H.E. Umbarger (coordinadores de edición), Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.). La holoenzima se compone siempre de 2 subunidades grandes y 2 subunidades pequeñas. La subunidad grande de AHAS forma los dominios catalíticos y es codificada por ilvB, la subunidad pequeña que funciona como dominio regulador, es codificada por ilvN. Por 15 "acetolactato sintasas resistentes a la "feed-back" (retroalimentación) se entienden unas acetolactato sintasas, que en comparación con la forma silvestre (tipo silvestre) tienen una sensibilidad más pequeña frente a la inhibición por los aminoácidos de cadenas ramificadas valina, leucina e isoleucina o respectivamente por mezclas de éstos. En el caso de las acetolactato sintasas de la especie Corynebacterium glutamicum la cepa ATCC13032 es el tipo silvestre apropiado y dentro de la especie Brevibacterium flavum la cepa ATCC14067 es el tipo silvestre apropiado.

20 Los genes ilvBN, que codifican una acetolactato sintasa en Corynebacterium glutamicum han sido descritos por ejemplo por Keilhauer y colaboradores (Journal of Bacteriology 175(17):5595-603 (1993)) o en el documento EP1108790. El número de acceso L09232 representa la secuencia de los genes.

Unas variantes enzimáticas de la AHAS, que ya no están sujetas a la inhibición de la retroalimentación por los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, valina, isoleucina) han sido descritas por ejemplo en las referencias Mendel y colaboradores (Journal of Molecular Biology 325, 275-284 (2003)), Elisakova y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 71, 207-213 (2005)), Wada y colaboradores (Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 72 (11), 2959-2965, (2008)) y en el documento EP1491634 . Se prefieren unas variantes de una acetolactato sintasa resistente a la "retroalimentación", que llevan uno o varios de los siguientes intercambios de aminoácidos en las subunidad pequeña *codificada* por ilvN, seleccionados entre el conjunto de: en la posición 20 de la secuencia de aminoácidos L-ácido aspártico en lugar de glicina, en la posición 21 de la secuencia de aminoácidos L-ácido aspártico en lugar de L-isoleucina, en la posición 22 de la secuencia de aminoácidos L-fenilalanina en lugar de L-isoleucina, en la posición 42 cualquier aminoácido proteínógeno excluyendo a la L-alanina, preferiblemente L-valina, L-isoleucina y L-leucina, de manera especialmente preferida L-valina y eventualmente en la posición 47 L-leucina en lugar de L-histidina.

35 Unos representantes conocidos de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-isoleucina son por ejemplo:

Brevibacterium flavum FERM BP-760 descrita en el documento US 4.656.135,

Brevibacterium flavum FERM BP-2215 descrita en el documento US 5.294.547, y

Corynebacterium glutamicum FERM BP-758 descrita en el documento US 4.656.135.

40 Unos representantes conocidos de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-homoserina son por ejemplo:

Micrococcus glutamicus ATCC 14296 descrita en el documento US 3.189.526 y

Micrococcus glutamicus ATCC 14297 descrita en el documento US 3.189.526.

45 Unos representantes conocidos de cepas de bacterias corineformes que producen o respectivamente segregan L-oritina son por ejemplo:

Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 2344 descrita en el documento US 5.188.947 y

Corynebacterium glutamicum FERM-BP 2345 descrita en el documento US 5.188.947.

Unas cepas que segregan o respectivamente producen un  $\alpha$ -cetoácido se basan por ejemplo en:

Corynebacterium glutamicum, cepa ATCC13032,

5 Brevibacterium flavum, cepa ATCC 14067 y

Brevibacterium lactofermentum, cepa ATCC 13869.

El presente invento pone a disposición un microorganismo que produce un producto químico fino, teniendo el microorganismo, mediante la utilización del promotor conforme al invento según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 una expresión aumentada de uno o varios genes en comparación con la respectiva cepa de partida.

10 Además, el presente invento pone a disposición un procedimiento para la producción por fermentación de un producto químico fino, que comprende las etapas:

a) cultivar el microorganismo más arriba descrito de acuerdo con el presente invento en un medio apropiado, obteniéndose un caldo de fermentación,

15 b) enriquecer el producto químico fino en el caldo de fermentación procedente de a) y/o en las células del microorganismo.

En este caso, es preferido que a partir del caldo de fermentación que contiene un producto químico fino se recupere el producto fino líquido o un producto que contenga el producto químico fino líquido o sólido.

20 Los microorganismos producidos pueden ser cultivados de un modo continuo – tal como se describe por ejemplo en el documento WO 05/021772 – o de modo discontinuo en el procedimiento batch (cultivación por tandas o respectivamente procedimiento de tandas) o en el procedimiento fed batch (procedimiento de afluencia) o repeated fed batch (procedimiento de afluencia repetitiva) con el fin de producir el deseado compuesto químico orgánico. Una recopilación de tipo general acerca de conocidos métodos de cultivación está disponible en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocesos 1. Introducción en la técnica de los bioprocesos] (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

25 El medio de cultivo o respectivamente el medio de fermentación que se ha de utilizar debe satisfacer de manera apropiada los requisitos de las respectivas cepas. Unas descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos están contenidos en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" [Manual de métodos para la bacteriología general] de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981). Los conceptos de medio de cultivo y medio de fermentación o respectivamente el medio son intercambiables recíprocamente.

30 Como fuente de carbono se pueden utilizar azúcares e hidratos de carbono tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, soluciones que contienen sacarosa procedentes de la elaboración de remolacha azucarera o de caña de azúcar, almidones, un material hidrolizado de almidón y celulosa, aceites y grasas, tales como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, tales como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como por ejemplo glicerol, metanol y etanol y ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido láctico.

35 Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar unos compuestos nitrogenados orgánicos tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta, agua de maceración de maíz, harina de soja y urea o unos compuestos orgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

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

45 El medio de cultivo debe contener además sales, por ejemplo en forma de cloruros o sulfatos de metales tales como por ejemplo sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro tales como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro,

que son necesarias para el crecimiento. Finalmente se pueden utilizar hormonas del crecimiento esenciales tales como aminoácidos, por ejemplo homoserina y vitaminas, por ejemplo tiamina, biotina o ácido pantoténico adicionalmente a las sustancias más arriba mencionadas.

5 Las sustancias empleadas mencionadas se pueden añadir al cultivo en forma de una única tanda o se pueden alimentar de manera apropiada durante la cultivación.

Para el control del pH del cultivo se emplean compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o respectivamente agua amoniacal o compuestos de carácter ácido tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico de una manera apropiada. El pH es ajustado por lo general a un valor de 6,0 hasta 8,5 de manera preferida de 6,5 hasta 8. Para el control del desarrollo de espuma se pueden agentes antiespumantes tales como por ejemplo ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos se puede añadir al medio unas apropiadas sustancias que actúan selectivamente tales como por ejemplo antibióticos. La fermentación es llevada a cabo preferiblemente en condiciones aerobias. Con el fin de mantener éstas, se incorporan en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire. La utilización de unos líquidos que están enriquecidos con peróxido de hidrógeno es asimismo posible. Eventualmente la fermentación se realiza con una sobrepresión, por ejemplo con una sobrepresión de 0,03 a 0,2 MPa. La temperatura del cultivo está situada normalmente en 20°C hasta 45°C y preferiblemente en 25°C hasta 40°C, de manera especialmente preferida a 30° hasta 37°C. En los procedimientos discontinuos o discontinuos de afluencia la cultivación se prolonga durante tanto tiempo hasta que se haya formado una cantidad suficiente para la medida técnica de la recuperación del deseado compuesto químico orgánico. Esta meta se alcanza normalmente en el transcurso de 10 horas hasta 160 horas. En el caso de procedimientos continuos son posibles unos tiempos de cultivación más largos. Mediante la actividad de los microorganismos se llega a un enriquecimiento (una acumulación) del compuesto químico orgánico en el medio de fermentación y/o en las células de los microorganismos.

25 Ejemplos de apropiados medios de fermentación se encuentran, entre otros, en los documentos de patentes 5.770.409, US 5.990.350, US 5.275.940. WO 2007/012078, US 5.827.698, WO 2009/043803, US 5.756.345 o US 7.138.266.

30 El análisis de L-aminoácidos para la determinación de la concentración en uno o varios momento(s) en el transcurso de la fermentación se puede efectuar por separación de los L-aminoácidos mediante una cromatografía de intercambio de iones, preferiblemente una cromatografía de intercambio de cationes con subsiguiente derivatización en columna posterior mediando utilización de ninhidrina, tal como se ha descrito en la referencia de Spackman y colaboradores (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)). En lugar de ninhidrina se puede emplear también ortofalodialdehído para la derivatización en columna posterior. Un artículo recopilativo acerca de la cromatografía con intercambio de iones se encuentra en la referencia de Pickering (LC·GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)).

35 Asimismo es posible una derivatización en columna preliminar por ejemplo mediando utilización de ortofalodialdehído o isotiocianato de fenilo y separar los derivados de aminoácidos resultantes mediante una cromatografía en fase inversa (RP), preferiblemente en forma de una cromatografía de líquido de alto rendimiento (HPLC). Un tal método ha sido descrito por ejemplo en la referencia de Lindroth y colaboradores (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

40 La detección se efectúa fotométricamente (por absorción, fluorescencia).

Una representación recopilativa acerca del análisis de aminoácidos se encuentra, entre otros, en el libro de texto "Bioanalytik" de Lottspeich y Zorbach (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania 1998).

45 El análisis de  $\alpha$ -cetoácidos para la determinación de la concentración en uno o varios momento(s) en el transcurso de la fermentación separación de los cetoácidos y otros productos de separación mediante una cromatografía por intercambio de iones, preferiblemente una cromatografía por intercambio de cationes en un polímero de estireno y divinilbenceno sulfonado en la forma H<sup>+</sup>, p.ej. mediante ácido sulfúrico 0,025 N con subsiguiente detección por UV a 215 nm (alternativamente también a 230 o 275 nm). Preferiblemente se puede emplear una columna REZEX RFQ - Fast Fruit H<sup>+</sup> (Phenomenex), otros suministradores para la fase de separación (p.ej. Aminex de BioRad) son posibles. Unas separaciones análogas se han descrito en correspondientes ejemplos de aplicación de los suministradores.

55 El rendimiento de los procedimientos o respectivamente procesos de fermentación en los cuales se presenta la variante de promotor conforme al invento en lo que se refiere a uno o varios parámetros seleccionados entre el conjunto de la concentración (compuesto formado por volumen), del rendimiento (compuesto formado por fuente de carbono consumida), la formación (compuesto formado por volumen y tiempo) y de la formación específica (compuesto formado por masa seca de células o respectivamente biomasa seca y tiempo o compuesto formado por

5 proteína celular en tiempo) o también otros parámetros de procesos y combinaciones de los mismos, se aumenta en por lo menos 0,5 %, por lo menos 1 %, por lo menos 1,5 % o por lo menos 2 % en comparación con unos procedimientos o respectivamente procesos de fermentación con microorganismos, en los cuales no se presenta la variante de promotor conforme al invento. Esto ha de ser considerado como muy valioso en el marco de un proceso realizado a gran escala técnica.

Mediante las medidas técnicas de la fermentación se obtiene un caldo de fermentación, que contiene los productos químicos finos deseados, preferiblemente un aminoácido o un ácido orgánico.

A continuación se efectúa la puesta a disposición o respectivamente la producción o recuperación de un producto que contiene el producto químico fino en una forma líquida o sólida.

10 Por el concepto de un caldo de fermentación se entiende un medio de fermentación o respectivamente un medio nutritivo, en el que un microorganismo había sido cultivado durante un cierto tiempo y a una cierta temperatura. El medio de fermentación o respectivamente los medios empleados durante la fermentación contiene/contienen todas las sustancias o respectivamente todos los componentes que aseguran una producción del deseado compuesto y asegurar típicamente la reproducción o respectivamente la viabilidad.

15 Al terminarse la fermentación, el caldo de fermentación resultante contiene correspondientemente

- a) la biomasa (masa celular) del microorganismo, que ha resultado como consecuencia de la reproducción de las células del microorganismo,
- b) el deseado producto químico fino formado en el transcurso de la fermentación,
- c) los productos secundarios orgánicos eventualmente formados en el transcurso de la fermentación, y

20 d) los componentes del medio de fermentación empleado que no se han consumido por la fermentación o respectivamente las sustancias empleadas tales como por ejemplo unas vitaminas tales como biotina o unas sales tales como sulfato de magnesio.

A los productos secundarios orgánicos pertenecen unas sustancias que son producidas por los microorganismos empleados al realizar la fermentación junto al respectivo compuesto deseado, y que eventualmente son segregadas.

25 El caldo de fermentación es sacado del recipiente de cultivo o respectivamente del recipiente de fermentación, eventualmente es recogido y utilizado para poner a disposición un producto que contiene el producto químico fino en una forma líquida o sólida. Para ello se utiliza también la expresión "recuperar el producto que contiene el producto químico fino". En el caso más sencillo, el propio caldo de fermentación que contiene un producto químico finosacado del recipiente de fermentación, constituye el producto obtenido.

30 Mediante una o varias de las medidas técnicas escogidas entre el conjunto de

- a) retirada desde parcial (> 0 % hasta < 80 %) hasta completa (100 %) o casi completa ( $\geq 80 \%$ ,  $\geq 90 \%$ ,  $\geq 95 \%$ ,  $\geq 96 \%$ ,  $\geq 97 \%$ ,  $\geq 98 \%$ ,  $\geq 99 \%$ ) del agua,
- b) retirada desde parcial (> 0 % hasta < 80 %) hasta completa (100 %) o casi completa ( $\geq 80 \%$ ,  $\geq 90 \%$ ,  $\geq 95 \%$ ,  $\geq 96 \%$ ,  $\geq 97 \%$ ,  $\geq 98 \%$ ,  $\geq 99 \%$ ) de la biomasa, siendo desactivada ésta eventualmente antes de la retirada,

35 c) retirada desde parcial (> 0 % hasta < 80 %) hasta completa (100 %) o casi completa ( $\geq 80 \%$ ,  $\geq 90 \%$ ,  $\geq 95 \%$ ,  $\geq 96 \%$ ,  $\geq 97 \%$ ,  $\geq 98 \%$ ,  $\geq 99 \%$ ,  $\geq 99,3 \%$ ,  $\geq 99,7 \%$ ) de los productos secundarios formados en el transcurso de la fermentación, y

40 d) retirada desde parcial (> 0 %) hasta completa (100 %) o casi completa ( $\geq 80 \%$ ,  $\geq 90 \%$ ,  $\geq 95 \%$ ,  $\geq 96 \%$ ,  $\geq 97 \%$ ,  $\geq 98 \%$ ,  $\geq 99 \%$ ,  $\geq 99,3 \%$ ,  $\geq 99,7 \%$ ) de los componentes del medio de fermentación o respectivamente de las sustancias empleadas, que no han sido consumidos por la fermentación,

a partir del caldo de fermentación se consigue una concentración o respectivamente purificación del compuesto químico orgánico deseado. De esta manera se aíslan unos productos que tienen un deseado contenido en cuanto al compuesto.

La retirada del agua parcial (> 0 % hasta < 80 %) hasta completa (100 %) o casi completa ( $\geq 80$  % hasta < 100 %) (medida técnica a)) se designará también como desecación.

5 En una variante del procedimiento, mediante una retirada completa o casi completa del agua, de la biomasa, de los productos secundarios orgánicos y de los componentes no consumidos del medio de fermentación empleado se llega a unas formas de productos puras ( $\geq 80$  % en peso,  $\geq 90$  % en peso) o muy puras ( $\geq 95$  % en peso,  $\geq 97$  % en peso,  $\geq 99$  % en peso) del deseado compuesto químico orgánico, preferiblemente de L-aminoácidos. Para las medidas técnicas según a), b), c) o d) están disponibles en el estado de la técnica una plétora de instrucciones técnicas.

10 En el caso del aminoácido L-lisina se conocen en el estado de la técnica esencialmente cuatro diferentes formas de productos.

15 Un conjunto de productos que contiene L-lisina comprende soluciones alcalinas, acuosas y concentradas de L-lisina purificada (documento EP-B-0534865). Otro conjunto, tal como se describe por ejemplo en los documentos US 6.340.486 y US 6.465.025), comprende unos concentrados acuosos, de carácter ácido, de caldos de fermentación que contienen L-lisina, que contienen una biomasa,. El conjunto más conocido de productos sólidos comprende unas formas pulverulentas o cristalinas de L-lisina purificada o respectivamente pura, que típicamente se presenta en forma de una sal tal como por ejemplo el monohidrocloreto de L-lisina. Otro conjunto de formas de productos sólidas se describe por ejemplo en el documento EP-B-0533039. La forma de producto que se ha descrito allí contiene, junto a L-lisina, la mayor parte de las sustancias empleadas utilizadas y no consumidas durante la producción por fermentación y eventualmente la biomasa del microorganismo empleado con una proporción de > 0% - 100 %.

20 Correspondiendo a las diferentes formas de productos, se conocen los más diferentes procedimientos, en los que a partir del caldo de fermentación se produce el producto que contiene L-lisina o la L-lisina purificada.

25 Para la preparación de L-lisina pura y sólida se usan esencialmente unos métodos de cromatografía por intercambio de iones eventualmente mediando utilización de carbón activo y unos métodos de cristalización. De esta manera se obtiene la correspondiente base o una sal correspondiente tal como por ejemplo el monohidrocloreto (Lys-HCl) o el sulfato de lisina (Lys<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

30 En el documento EP-B-0534865 se describe un procedimiento para la producción de soluciones acuosas de carácter básico que contienen L-lisina a base de caldos de fermentación. En el caso del procedimiento que allí se describe, la biomasa es separada del caldo de fermentación y desechada. Mediante una base, tal como por ejemplo hidróxido de sodio, potasio o amonio, se ajusta un valor de pH comprendido entre 9 y 11. Los componentes minerales (sales inorgánicas) se separan, después de una concentración y un enfriamiento, por cristalización a partir del caldo y o bien se utilizan como fertilizantes o se desechan.

35 En el caso de procedimientos para la preparación de lisina mediante utilización de bacterias del género Corynebacterium se prefieren aquellos procedimientos, en los que se obtienen unos productos, que contienen componentes del caldo de fermentación. Éstos son utilizados particularmente como aditivos para piensos de animales.

40 Según sea el requisito, la biomasa puede ser retirada total o parcialmente, mediante unos métodos de separación tales como p.ej. los de centrifugación, de filtración, de decantación o una combinación de ellos, del caldo de fermentación o ser dejada completamente en éste. Eventualmente la biomasa o respectivamente el caldo de fermentación que contiene la biomasa es desactivado durante una etapa de procedimiento apropiada, por ejemplo mediante un tratamiento térmico (calentamiento) o mediante adición de ácidos.

45 En un modo de procedimiento la biomasa es retirada completamente o casi completamente, de manera tal que no queda nada (0 %) o queda a lo sumo 30 %, a lo sumo 20 %, a lo sumo 10 %, a lo sumo 5 %, a lo sumo 1 % o a lo sumo 0,1 % de biomasa en el producto producido. En otro modo de procedimiento la biomasa no es retirada o es retirada solamente en insignificantes proporciones, de manera tal que queda en el producto producido toda la biomasa (100%) o más de 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o 99,9% de la biomasa. En un procedimiento conforme al invento se retira correspondientemente la biomasa en unas proporciones de  $\geq 0$  % hasta  $\leq 100$  %.

50 Finalmente, el caldo de fermentación obtenido después de la fermentación, antes o después de la retirada total o parcial de la biomasa con un ácido inorgánico, tal como por ejemplo ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico, o con un ácido orgánico, tal como por ejemplo ácido propiónico, para el mejoramiento de las propiedades de manipulación del producto final, es ajustado a un valor ácido del pH (documento de patente británica GB 1.439.728 o EP 1 331 220)). Igualmente es posible acidificar el caldo de fermentación con la biomasa contenida completamente. Finalmente, el caldo puede ser estabilizado también por adición de bisulfito de sodio (NaHSO<sub>3</sub>,

documento GB 1.439.728) o de otra sal, por ejemplo la sal de amonio, de un metal alcalino o de un metal alcalino-térreo del ácido sulfuroso.

5 En el caso de la separación de la biomasa se retiran parcial o completamente los materiales sólidos orgánicos o inorgánicos eventualmente contenidos en el caldo de fermentación. Los productos secundarios orgánicos disueltos en el caldo de fermentación y los componentes disueltos no consumidos del caldo de fermentación (sustancias empleadas) permanecen por lo menos parcialmente ( $> 0\%$ ), preferiblemente en por lo menos  $25\%$ , de manera especialmente preferida en por lo menos  $50\%$  y de manera muy especialmente preferida en por lo menos  $75\%$  en el producto. Eventualmente, éstos permanecen en el producto también completamente ( $100\%$ ) o casi completamente (es decir  $> 95\%$  o  $> 98\%$  o mayor que  $99\%$ ). Si un producto contiene en este sentido por lo menos 10 una parte de los componentes del caldo de fermentación, esto está circunscrito también con el concepto "producto sobre la base del caldo de fermentación".

15 A continuación se substraen agua del caldo con métodos conocidos tales como p.ej. con ayuda de un evaporador rotatorio, de un evaporador de capa delgada, de un evaporador de película descendente, mediante ósmosis inversa o mediante nanofiltración, o respectivamente éste se espesa o se concentra. Este caldo de fermentación aumentado de concentración puede ser elaborado a continuación por métodos de liofilización, de desecación por atomización, de granulación por atomización o por procedimientos de otros tipos, tal como por ejemplo en la capa turbulenta circulante según el documento PCT/EP2004/006655, para dar productos capaces de corrimiento, en particular para dar un polvo finamente dividido o preferiblemente un granulado de grano grueso. Eventualmente a partir del granulado obtenido se aísla por tamizado o separación del polvo fino un producto deseado.

20 Asimismo es posible secar el caldo de fermentación directamente, es decir sin un precedente aumento de la concentración, mediante desecación por atomización o granulación por atomización.

Por el concepto de "capaz de corrimiento" se entienden unos polvos que salen sin obstáculos desde una serie de recipientes de vidrio de derrame con orificios de salida de diferentes tamaños, por lo menos a partir del recipiente con el orificio de  $5\text{ mm}$  (milímetros) (Klein: Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

25 Con el concepto de "finamente dividido" se entiende un polvo con una proporción predominante ( $> 50\%$ ) de un tamaño de granos con un diámetro de  $20$  a  $200\text{ }\mu\text{m}$ .

Con el concepto de "grano grueso" se entiende un producto con una proporción predominante ( $> 50\%$ ) con un tamaño de granos con un diámetro de  $200$  a  $2.000\text{ }\mu\text{m}$ .

30 La determinación de los tamaños de granos se puede llevar a cabo con métodos de espectrometría por difracción de rayos láser. Los correspondientes métodos han sido descritos en el libro de texto "Medición de los tamaños de partículas en la práctica de laboratorio" de R. H. Müller y R. Schuhmann, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1996) o en el libro de texto "Introduction to Particle Technology" de M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998)

35 El polvo finamente dividido, capaz de corrimiento puede ser transformado de nuevo, mediante apropiados procedimientos de compactación y granulación, en un producto de grano grueso, bien capaz de corrimiento, almacenable y ampliamente exento de polvo.

El concepto "exento de polvo" significa que el producto contiene solamente pequeñas proporciones ( $< 5\%$ ) de tamaños de granos con un diámetro situado por debajo de  $100\text{ }\mu\text{m}$ .

40 El concepto "almacenable", en el sentido de este invento, significa un producto que puede ser almacenado por lo menos durante un (1) año o durante un tiempo más largo, preferiblemente por lo menos durante  $1,5$  años o durante un tiempo más largo, de manera especialmente preferida durante dos (2) años o durante un tiempo más largo en un entorno seco y frío sin que aparezca una pérdida esencial del respectivo aminoácido. Por el concepto de "pérdida esencial" se entiende una pérdida de  $> 5\%$ .

45 Otro objeto del invento es un procedimiento que en sus rasgos esenciales está descrito en el documento WO 2007/042363 A1. Para ello, mediante utilización del caldo de fermentación obtenido conforme al invento, a partir del cual se había separado eventualmente de un modo total o parcial la biomasa, se lleva a cabo un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

50 a) disminuir el valor del pH, por adición de ácido sulfúrico, a  $4,0$  hasta  $5,2$ , particularmente a  $4,9$  hasta  $5,1$ , y ajustar en el caldo una relación molar de sulfato/L-lisina de  $0,85$  hasta  $1,2$ , de manera preferida de  $0,9$  hasta  $1,0$ , de manera especialmente preferida de  $> 0,9$  hasta  $< 0,95$ , eventualmente por adición de otro o varios compuestos que contienen sulfato y

b) aumentar la concentración de la mezcla así obtenida por substracción de agua y eventualmente granular,

llevándose a cabo eventualmente antes de la etapa a) una o ambas de las siguientes medidas técnicas:

- c) medir la relación molar de sulfato/L-lisina con el fin de determinar la cantidad necesaria de compuestos que contienen sulfato,
- d) añadir un compuesto que contiene sulfato seleccionado entre el conjunto formado por sulfato de amonio, hidrógeno-sulfato de amonio y ácido sulfúrico en unas correspondientes relaciones.

Eventualmente se añade a esto además antes de la etapa b) una sal del ácido sulfuroso, preferentemente un hidrógenosulfito de metal alcalino, de manera especialmente preferida hidrógenosulfito de sodio, en una concentración de 0,01 hasta 0,5 % en peso, de manera preferida de 0,1 hasta 0,3 % en peso, de manera especialmente preferida de 0,1 hasta 0,2 % en peso, referida al caldo de fermentación.

- 10 Como preferidos compuestos que contienen sulfato en el sentido de las etapas de procedimiento más arriba mencionadas, se han de mencionar en particular sulfato de amonio y/o hidrógenosulfato de amonio o correspondientes mezclas de amoniaco y ácido sulfúrico, y el ácido sulfúrico propiamente dicho.

La relación molar de sulfato/L-lisina  $V$  se calcula de acuerdo con la fórmula  $V = 2 \times [\text{SO}_4^{2-}] / [\text{L-lisina}]$ . Esta fórmula toma en consideración el hecho de que el anión  $\text{SO}_4^{2-}$  o respectivamente el ácido sulfúrico es bivalente. Una relación  $V = 1$  significa que se presenta un  $\text{Lys}_2\text{-H}_2\text{SO}_4$  compuesto estequiométricamente, mientras que en el caso de una relación  $V = 0,9$  se encuentra un déficit de sulfato de 10 % y en el caso de una relación  $V = 1,1$  se encuentra un exceso de sulfato de 10 %.

- 20 Es ventajoso en el caso de la granulación o compactación el empleo de usuales sustancias auxiliares orgánicas o inorgánicas o respectivamente soportes, tales como almidones, gelatinas, derivados de celulosa o sustancias similares tal como ellas encuentran utilización usualmente en la elaboración de alimentos o piensos como agentes aglutinantes, gelificantes o espesantes, o de otras sustancias, tales como por ejemplo ácidos silícicos, silicatos (documento EP0743016A) y estearatos.

- 25 Por lo demás, es ventajoso tratar la superficie de los granulados obtenidos con aceites o grasas, de la manera que se ha descrito en el documento WO 04/054381. Como aceites se pueden utilizar aceites minerales, aceites vegetales o mezclas de aceites vegetales. Ejemplos de tales aceites son aceite de soja, aceite de oliva, mezclas de aceite de soja y lecitina. De igual manera son apropiados también aceites de siliconas, poli(etilenglicoles) o una hidroxietil-celulosa. Mediante el tratamiento de las superficies con los aceites mencionados, se consigue una aumentada resistencia a la abrasión del producto y una disminución de la proporción de polvo fino. El contenido de aceite en el producto es de 0,02 hasta 2,0 % en peso, de manera preferida de 0,02 hasta 1,0 % en peso, y de manera muy especialmente preferida de 0,2 hasta 1,0 % en peso, referido a la cantidad total del aditivo para piensos.

- 35 Se prefieren unos productos con una proporción de  $\geq 97$  % en peso con un tamaño de granos de 100 hasta 1.800  $\mu\text{m}$  o una proporción de  $\geq 95$  % en peso de un tamaño de granos con un diámetro de 300 hasta 1.800  $\mu\text{m}$ . La proporción de polvo fino, es decir de partículas con un tamaño de granos  $< 100 \mu\text{m}$ , está situada preferentemente en  $> 0$  hasta 1 % en peso, de manera especialmente preferida en como máximo 0,5 % en peso.

- 40 Alternativamente, el producto se puede extender también sobre una sustancia de soporte orgánica o inorgánica conocida en la elaboración de piensos y usual, tal como por ejemplo ácidos silícicos, silicatos, granos triturados, salvados, harinas, almidones, azúcares ácidos silícicos, silicatos, granos triturados, salvados, harinas, almidones, azúcares u otras y/o mezclar con usuales agentes espesantes o aglutinantes y estabilizar. Ejemplos de aplicación y procedimientos acerca de ello se describen en la bibliografía (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, página 817).

- 45 Finalmente, el producto se puede llevar también, mediante unos procedimientos de revestimiento (en inglés "Coating") con agentes formadores de películas tales como por ejemplo carbonatos metálicos, ácidos silícicos, silicatos, alginatos, estearatos, almidones, gomas y éteres celulósicos tal como se describen en el documento DE-C-4100920, a un estado en el que él es estable frente a la digestión por estómagos de animales, en particular el estómago de rumiantes.

- 50 Para el ajuste de una deseada concentración de L-lisina en el producto, según sea el requisito, la L-lisina puede ser añadida durante el proceso en forma de un concentrado o eventualmente de una sustancia ampliamente pura o respectivamente una de sus sales en forma líquida o sólida. Éstas se pueden añadir individualmente o en forma de mezclas al caldo de fermentación obtenido o aumentado de concentración, o también durante el proceso de desecación o granulación.

La solicitud divulga una combinación con un procedimiento para la producción de un producto sólido que contiene lisina, que se describe en sus rasgos esenciales en el documento US 20050220933. En este caso mediante utilización del caldo de fermentación obtenido conforme al invento se lleva a cabo un procedimiento, que comprende las siguientes etapas:

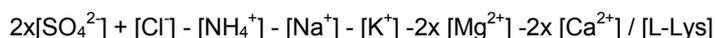
- 5 a) filtrar el caldo de fermentación, preferentemente con un filtro de membrana, de manera tal que se obtienen un lodo que contiene biomasa y un material filtrado,
- b) aumentar la concentración del material filtrado, preferentemente de manera tal que se obtenga un contenido de materiales sólidos de 48 a 52 % en peso,
- c) granular el concentrado obtenido en la etapa b), preferentemente a una temperatura de 50°C hasta 62°C, y
- 10 d) revestir el granulado obtenido en c) con uno o varios de los agentes de revestimiento (en inglés coating agent(s))

Para el revestimiento en la etapa d) se utilizan preferentemente unos agentes de revestimiento, que se seleccionan entre el conjunto que se compone de

- d1) la biomasa obtenida en la etapa a),
- 15 d2) un compuesto que contiene L-lisina, seleccionado entre el conjunto formado por hidrocloreuro de L-lisina o sulfato de L-lisina,
- d3) una sustancia esencialmente exenta de L-lisina con un contenido de L-lisina < 1 % en peso, de manera preferida < 0,5 % en peso, seleccionado preferentemente entre el conjunto formado por almidones, carragenano, agar, ácidos silícicos, silicatos, granos triturados, salvados y harinas, y
- 20 d4) una sustancia repelente de agua, seleccionada preferentemente entre el conjunto formado por aceites, poli(etilenglicoles) y parafinas líquidas.

Mediante las medidas técnicas correspondientes a las etapas d1) hasta d4), particularmente d1) hasta d3), el contenido de L-lisina se ajusta a un valor deseado.

- 25 En el caso de la producción de productos que contienen L-lisina, la relación de los iones se ajusta preferentemente de tal manera que se establezca la relación iónica molar correspondiente a la siguiente fórmula



de 0,68 hasta 0,95, de manera preferida de 0,68 hasta 0,90, de manera especialmente preferida de 0,68 hasta 0,86, tal como se describió por Kushiki y colaboradores en el documento US 20030152633.

- 30 En el caso de la L-lisina, el producto sólido constituido sobre la base de un caldo de fermentación, producido de esta manera, tiene un contenido de lisina (como base de lisina) de 10 % en peso hasta 70 % en peso o de 20 % en peso hasta 70 % en peso, de manera preferida de 30 % en peso hasta 70 % en peso y de manera muy especialmente preferida de 40 % en peso hasta 70 % en peso referido a la masa seca del producto. Son asimismo posibles unos contenidos máximos de la base de lisina de 71 % en peso, 72 % en peso o 73 % en peso.

- 35 El contenido de agua del producto sólido que contiene L-lisina es hasta de 5 % en peso, preferentemente hasta de 4 % en peso, y de manera especialmente preferida de menos que 3 % en peso.

#### Ejemplo 1

#### **Secuenciación de la zona de promotor del gen gap procedente de DM1547**

- 40 La cepa DM1547 de *Corynebacterium glutamicum* se produjo por mutagénesis no dirigida múltiple, selección y elección de mutantes de *C. glutamicum* ATCC13032. La cepa es resistente contra el compuesto análogo a lisina S-(2-aminoetil)-L-cisteína.

Un cultivo puro de la cepa DM1547 se depositó en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) el 16 de Enero de 2001 según el Convenio de Budapest como DSM 13994. La cepa DSM 13994 se expone en el documento EP 1 239 040.

La secuencia de nucleótidos del genoma de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 se ha descrito en la referencia de Ikeda y Nakagawa (Applied Microbiology and Biotechnology 62, 99-109 (2003)), en el documento EP 1 108 790 y en la referencia de Kalinowski y colaboradores (Journal of Biotechnology 104(1-3), (2003)). La secuencia de nucleótidos del genoma de *Corynebacterium glutamicum* R se ha descrito en la referencia de Yukawa y colaboradores (Microbiology 153(4):1042-1058 (2007)).

La secuencia de nucleótidos del genoma de *Corynebacterium efficiens* se ha descrito en la referencia de Nishio y colaboradores (Genome Research. 13 (7), 1572-1579 (2003)).

Las secuencias de nucleótidos del genoma de *Corynebacterium glutamicum* y *Corynebacterium efficiens* están disponibles asimismo en el Banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.), en el Banco de datos de ADN de Japón (DDBJ, Mishima, Japón) o en el Banco de datos de secuencias de nucleótidos European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania o respectivamente Cambridge, Reino Unido).

A partir de la cepa DM1547 se aisló el ADN cromosomal con el método de Eikmanns y colaboradores (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)). Con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificó un segmento de ADN, que contiene la zona situada secuencia arriba del gen gap. Sobre la base de la secuencia del gen gap conocida para *C. glutamicum* se utilizaron como cebadores los siguientes oligonucleótidos:

Pgap3-1 (SEQ ID NO:31):  
5' cgtttgggtcaatgtccat 3'

Pgap3-2 (SEQ ID NO:32):  
5' cccagtcagggtctttg 3'

Los cebadores representados fueron sintetizados por la entidad MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). Ellos hacen posible la amplificación de un tramo de ADN con una longitud de 529 pb. El cebador Pgap3-2 se fija a la región correspondiente a las posiciones 742 hasta 759 de la hebra complementaria para SEQ ID NO:30 (y SEQ ID NO:33). El cebador Pgap3-1 se fija a la región correspondiente a las posiciones 231 hasta 250 de la hebra según SEQ ID NO:30 (y SEQ ID NO:33).

La reacción de PCR se llevó a cabo con la polimerasa Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania). La tanda de reacción se formuló de acuerdo con los datos del fabricante y en un volumen total de 50 µl contenía 10 µl del tampón 5 x Phusion HF conjuntamente suministrado, desoxinucleósido trifosfatos en una concentración de en cada caso 200 µM, cebadores en una concentración de 0,5 µM, aproximadamente 50 ng de ADN de molde y 2 unidades de la polimerasa Phusion. Por adición de H<sub>2</sub>O el volumen se ajustó a 50 µl.

La tanda de PCR se sometió primeramente a una desnaturalización introductoria a 98°C durante 30 segundos. A ella le siguieron repitiéndose 35 veces una etapa de desnaturalización a 98°C durante 20 segundos, una etapa para la fijación de los cebadores al ADN previamente dispuesto a 60°C durante 20 segundos y la etapa de extensión para la prolongación de los cebadores a 72°C durante 60 segundos. Después de la etapa de extensión final durante 5 minutos a 72°C, la tanda de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa (agarosa al 0,8 %). Se identificó un fragmento de ADN con una longitud de aproximadamente 0,53 kb, se aisló a partir del gel y se purificó mediante utilización del QIAquick Gel Extraction Kit de la entidad Qiagen, (Hilden, Alemania).

La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN o respectivamente del producto de PCR amplificado fue determinada por la entidad Agowa (Berlin, Alemania).

La secuencia de nucleótidos de la zona de promotor del gen gap procedente de la cepa DM1547 contiene en la posición 379 die nucleobase adenina (véase la SEQ ID NO:33). La zona de promotor del tipo silvestre (véase la SEQ ID NO:30) contiene en esta posición la nucleobase guanina. Esta mutación se designará en lo sucesivo como Pgap3.

## Ejemplo 2

### **Construcción del vector pK18mobsacB-IBcg0054**

Para la caracterización de la mutación conforme al invento se utilizó una zona situada secuencia arriba del gen gap, que contiene el promotor, para el refuerzo de un operón sintetizado. El operón sintetizado se compone en este caso de una aspartato cinasa desensibilizada de *Corynebacterium glutamicum*, codificada por un alelo del gen lysC, que en posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada posee la nucleobase isoleucina en lugar de la nucleobase

5 treonina de tipo silvestre (véanse los documentos WO 00/63388 y US 6.893.848) y una aspartato semialdehído deshidrogenasa de *Corynebacterium glutamicum*, codificada por el gen *asd*. La integración del operón sintético se efectúa a través de una recombinación homóloga en una zona intergénica en el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum*, de manera tal que la inserción da como resultado una elevación del número de copias de los genes *lysC* y *asd*. Una secuencia de ADN homóloga, que hace posible la incorporación del operón sintético, fue sintetizada por la entidad Geneart AG (Regensburg, Alemania). Esta secuencia de ADN se representa en la SEQ ID NO:35 y lleva la denominación IBcg0054. La secuencia de ADN contiene una zona intergénica que abarca 383 pb flanqueada por una zona de 595 pb (gen *cg0055* que codifica una proteína membranal putativa y una parte del gen *cg0057* que codifica una serina/treonina-proteínacinas) así como una zona de 663 pb (parte del gen *cg0054* que codifica una proteína de absorción de hierro).

Adicionalmente a los sitios de corte por restricción de las enzimas *AvrII* y *NsiI* centralmente dentro de la zona intergénica para la inserción de diferentes secuencias de ADN se construyeron unos sitios de corte que flanquean a las endonucleasas de restricción *MunI* y *HindIII* para transclonaciones del fragmento total.

15 El fragmento Geneart con una longitud de 1.660 pb (SEQ IDNO:35) se digirió con las enzimas de restricción *MunI* y *HindIII* y a continuación se transclonó al vector *pK18mobsacB* movilizable, que ha sido descrito por Schäfer y colaboradores (Gene, 145, 69-73 (1994)). Para ello el *pK18mobsacB* se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El vector preparado previamente se mezcló con el fragmento IBcg0054 y la tanda se trató con el estuche Ready-To-Go T4 DNA Ligasa Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania).

20 A continuación, la cepa de *E.coli* S17-1 (Simon y colaboradores, Bio/Technologie 1: 784-791, 1993) se transformó con la tanda de ligación (Hanahan, In. DNA cloning. a practical approach. Vol.1. ILR-Press, Cold Spring Habor, New York, 1989). La selección en cuanto a células portadoras del plásmido se efectuó por siembra en placas de la tanda de transformación sobre un agar LB (Sambrock y colaboradores, Molecular Cloning: a laboratory manual. 2ª Ed. Cold Spring Habor, New York, 1989), que había sido suplementado con 50 mg/l de kanamicina.

25 El ADN plasmídico se aisló a partir de un transformante con ayuda del estuche QIAprep Spin Miniprep Kit de la entidad Qiagen, y se examinó mediante desdoblamiento por restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, así como por subsiguiente electroforesis en gel de agarosa. El plásmido lleva la denominación *pK18mobsacB\_IBcg0054*.

### Ejemplo 3

#### **Construcción de los vectores de intercambio**

30 ***pK18mobsacB\_PgapWT\_lysCT311I\_asd*,  
*pK18mobsacB\_Pgap3\_lysCT311I\_asd* y  
*pK18mobsacB\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd***

35 La caracterización de la mutación en la zona situada secuencia arriba del gen *gap* se efectúa con ayuda de una casete de ADN, que contiene un operón sintético de los genes *lysC* y *asd*, bajo el control de los respectivos promotores de *PgapWT*, *Pgap3* o respectivamente *Pg3N3*, que se inserta en la zona intergénica que ha sido descrita en el Ejemplo 2. Los operones sintéticos fueron sintetizados por la entidad Geneart AG (Regensburg, Alemania) y llevan las denominaciones *PgapWT\_lysCT311I\_asd*, *Pgap3\_lysCT311I\_asd* o respectivamente *Pg3N3\_lysCT311I\_asd*. Las secuencias de ADN se representan en Seq ID No:36 para *PgapWT\_lysCT311I\_asd*, en Seq ID No:37 para *Pgap3\_lysCT311I\_asd* o respectivamente en Seq ID No:38 para *Pg3N3\_lysCT311I\_asd*.

40 La zona de promotor del gen *gap* abarca las posiciones 9 hasta 469, correspondiendo la secuencia de la construcción artificial en esta zona en cada caso a las secuencias representadas en Seq ID No:2 (para *PgapWT*), en Seq ID No:3 (para *Pgap3*) o respectivamente Seq ID No:34 (para *Pg3N3*). Secuencia abajo le sigue la secuencia codificadora de una aspartato cinasa desensibilizada procedente de *Corynebacterium glutamicum*, codificada por un alelo del gen *lysC*, que en la posición 311 de la proteína aspartato cinasa codificada posee la nucleobase isoleucina en lugar de la nucleobase treonina de tipo silvestre. Adicionalmente la nucleobase guanina se intercambió por la nucleobase adenina dentro del codón de iniciación de *lysC*. A continuación de esto sigue de nuevo secuencia abajo la secuencia codificadora de la aspartato semialdehído deshidrogenasa procedente de *Corynebacterium glutamicum*, que codifica el gen *asd*. Secuencia arriba de los dos genes *lysC* y *asd* se encuentra en cada caso el sitio de fijación a ribosomas del gen *gap* (delante de *lysC* en forma de la Seq ID No:16, delante de *asd* en forma de la Seq ID No:26) así como secuencia abajo de *asd* se encuentra el terminador del gen *gap*.

50 Para unas transclonaciones se construyeron sitios de corte por restricción de las enzimas *AvrII* y *NsiI* flanqueando al operón sintético.

Los fragmentos se disociaron con las enzimas de restricción *AvrII* y *NsiI*, y a continuación se transclonaron en el vector movilizable *pK18mobsacB\_IBcg0054* que se ha descrito en el Ejemplo 2. Para esto el *pK18mobsacB\_IBcg0054* se digirió con las enzimas de restricción *AvrII* y *NsiI*, el vector así preparado previamente

se mezcló con los fragmentos PgapWT\_lysCT311I\_asd, Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente Pg3N3\_lysCT311I\_asd, y la tanda se trató con el estuche Ready-To-Go T4 DNA Ligase Kit (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania).

5 A continuación la cepa S17-1 de E.coli (Simon y colaboradores, Bio/Technologie 1: 784-791, 1993), se transformó con la tanda de ligación (Hanahan, In. DNA cloning. a practical approach. Vol.1. ILR-Press, Cold Spring Habor, New York, 1989). La selección en cuanto a células portadoras de plásmidos se efectuó por siembra en placas de la tanda de transformación sobre un agar LB (Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Habor, New York, 1989), que había sido suplementado con 50 mg/l de kanamicina.

10 El ADN de plásmido se aisló a partir de un transformante con ayuda QIAprep Spin Miniprep Kit de la entidad Qiagen y se examinó mediante disociación por restricción con las enzimas AvrII y NsiI, así como por una subsiguiente electroforesis en gel de agarosa. Los plásmidos, según sea el alelo del promotor de gap llevan la denominación pK18mobsacB\_PgapWT\_lysCT311I\_asd, pK18mobsacB\_Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente pK18mobsacB\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd. A modo de ejemplo el pK18mobsacB\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd se representa en la Figura 1.

#### 15 **Ejemplo 4**

##### **Producción de las cepas de C.glutamicum DM1729\_PgapWT\_lysCT311I\_asd, DM1729\_Pgap3\_lysCT311I\_asd y DM1729\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd**

20 Las mutaciones PgapWT\_lysCT311I\_asd, Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente Pg3N3\_lysCT311I\_asd deben ser introducidas en la cepa Corynebacterium glutamicum DM1729. La cepa DM1729 es una mutante resistente a aminoetilcisteína de Corynebacterium glutamicum ATCC13032 y se describe en la solicitud de patente EP 1 717 616 A2 y por Georgi y colaboradores (Metabolic Engineering 7, 291-301 (2005)). Ella ha sido depositada bajo la denominación DSM17576 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen y Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania).

25 Los vectores pK18mobsacB\_PgapWT\_lysCT311I\_asd, pK18mobsacB\_Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente pK18mobsacB\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd descritos en el Ejemplo 3 se transfirieron según el protocolo de Schäfer y colaboradores (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)) a la cepa DM1729 C. glutamicum por conjugación. El vector no se puede replicar en DM1729 espontáneamente y se retiene en la célula solamente cuando él, como consecuencia de un suceso de recombinación, se presenta integrado en el cromosoma. La selección de transconjugantes, es decir de clones con pK18mobsacB\_PgapWT\_lysCT311I\_asd, pK18mobsacB\_Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente pK18mobsacB\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd integrado, se efectuó por siembra en placas de la tanda de conjugación sobre un agar LB, que había sido suplementado con 30 25 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de ácido nalidíxico. Unos transconjugantes resistentes a kanamicina fueron extendidos seguidamente sobre placas de agar LB suplementadas con kanamicina (25 mg/l) e incubadas durante 24 horas a 33°C. Para la selección de mutantes, en cuyos casos como consecuencia de un segundo suceso de recombinación había tenido lugar la escisión del plásmido, los clones fueron cultivados durante 30 horas de manera no selectiva en un medio líquido LB, extendidos seguidamente sobre un agar LB, que había sido suplementado con 35 10 % de sacarosa e incubados durante 24 horas a 33°C.

40 Los plásmidos pK18mobsacB\_PgapWT\_lysCT311I\_asd, pK18mobsacB\_Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente pK18mobsacB\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd contienen, al igual que el plásmido de partida pK18mobsacB, junto al gen de resistencia a kanamicina una copia del gen sacB que codifica la levanoo sucraza procedente de Bacillus subtilis. La expresión del gen sacB inducible por sacarosa conduce a la formación de la levanoo sucraza, que cataliza la síntesis del producto levano tóxico para C. glutamicum. Sobre un agar LB suplementado con sacarosa crecen por lo tanto 45 solamente aquellos clones, en los cuales se ha escindido el pK18mobsacB\_PgapWT\_lysCT311I\_asd, pK18mobsacB\_Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente pK18mobsacB\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd integrado, como consecuencia de un segundo suceso de recombinación. En dependencia de la posición del segundo suceso de recombinación en relación con el sitio de mutación, tiene lugar en el caso de la escisión el intercambio de alelos o respectivamente la introducción de la mutación o la copia original permanece en el cromosoma del anfitrión.

50 Seguidamente se buscó en cada caso un clon, en el que se había efectuado el intercambio deseado, la incorporación de la casete PgapWT\_lysCT311I\_asd, Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente Pg3N3\_lysCT311I\_asd en la zona intergénica.

55 Para esto se examinaron en cada caso 20 clones con el fenotipo "crecimiento en presencia de sacarosa" y "no crecimiento en presencia de kanamicina" sobre integración de la casete PgapWT\_lysCT311I\_asd, Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente Pg3N3\_lysCT311I\_asd mediando uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

60 Con este objeto se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos (cebadores):

Cebador cg0054\_9.p (SEQ ID No.39):

5' CCACCCATCACCCCTCACTTC 3'

Cebador cg0054\_10.p (SEQ ID No.40):

5' GCACTCTCGTTTGGCAGTTC 3'

5 Cebador QlysC\_WT\_P2 (SEQ ID No.41):

5'AAGTGCCGGGATCATTACTA 3'

Los cebadores expuestos fueron sintetizados por la entidad MWG Biotech (Ebersberg, Alemania). Los cebadores cg0054\_9.p y cg0054\_10.p hacen posible la amplificación de un fragmento de ADN con un tamaño de 1.032 pb en el caso de presentarse la disposición de tipo silvestre en la zona intergénica. Por medio de la utilización de otro cebador (QlysC\_WT\_P2) en la misma tanda de reacción, que se puede adicionar al gen *lysC*, se la amplificación hacen posible la amplificación de un fragmento de ADN con un tamaño de 1.330 pb, con lo que se detecta específicamente la integración del operón sintético PgapWT\_lysCT311I\_asd, Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente Pg3N3\_lysCT311I\_asd en la zona intergénica IBcg0054. La combinación del cebador cg0054\_9.p y cg0054\_10.p no proporciona ningún material amplificado en el caso de la integración en la zona intergénica en las condiciones escogidas para la reacción de PCR. Con ayuda de sus reacciones de detección, se identifican además de ello unas reacciones de PCR, que por motivos técnicos no han proporcionado ningún material amplificado.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el estuche Taq PCR Core Kit de Quiagen (Hilden, Alemania), que contiene la Taq ADN Polimerasa procedente de *Thermus aquaticus*, en un Mastercycler de la entidad Eppendorf (Hamburg, Alemania). Las condiciones en la tanda de reacción se ajustaron según los datos del fabricante. La tanda de PCR se sometió en primer lugar a una desnaturalización introductoria a 94°C durante 2 minutos. A esta le siguieron repitiéndose 35 veces una etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, una etapa para la fijación del cebador al ADN a 57°C durante 30 segundos y la etapa de extensión para la prolongación del cebador a 72°C durante 60 s. Después de la etapa de extensión final durante 5 min a 72°C los productos amplificados de esta manera se ensayaron por electroforesis en un gel de agarosa.

De este modo se identificaron unos mutantes, que tienen presente la casete PgapWT\_lysCT311I\_asd, Pgap3\_lysCT311I\_asd o respectivamente Pg3N3\_lysCT311I\_asd en forma de una integración, habiéndose mencionado en cada caso una de las cepas DM1729\_PgapWT\_lysCT311I\_asd, DM1729\_Pgap3\_lysCT311I\_asd y DM1729\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd de *C. glutamicum* obtenidas.

## **Ejemplo 5**

### **Producción de L-lisina**

Las cepas DM1729\_PgapWT\_lysCT311I\_asd, DM1729\_Pgap3\_lysCT311I\_asd y DM1729\_Pg3N3\_lysCT311I\_asd de *C. glutamicum* obtenidas en el Ejemplo 4 y la cepa de partida DM1729 se cultivaron en un medio nutritivo apropiado para la producción de lisina y se determinó el contenido de lisina en el material sobrenadante de cultivo.

Para esto los clones fueron reproducidos primeramente sobre unas placas de agar de corazón y cerebro (Merck, Darmstadt, Alemania) durante 24 horas a 33°C. Partiendo de estos cultivos en placas de agar se inoculó en cada caso un cultivo preliminar (10 ml de medio en el matraz Erlenmeyer con una capacidad de 100 ml). Como medio para el cultivo preliminar se utilizó el medio MM. El cultivo preliminar se incubó durante 24 horas a 33°C y 240 rpm sobre un dispositivo sacudidor. De este cultivo preliminar se inoculó un cultivo principal, de manera que la D.O. inicial (a 660 nm) del cultivo principal fue de 0,1 DO. Para el cultivo principal se utilizó asimismo el medio MM.

45

Medio MM	
CSL	5 g/l
MOPS	20 g/l
Glucosa (autoclavada por separado)	50 g/l
Sales:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0mg/l
Biotina (filtrada en condiciones estériles)	0,3 mg/l
Tiamina * HCl (filtrada en condiciones estériles)	0,2 mg/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

5 El CSL (acrónimo de Corn Steep Liquor = líquido de maceración de maíz), el MOPS (abreviatura para ácido morfolinopropanosulfónico) y la solución de sales se ajustaron con agua amoniacal a un pH de 7 y se autoclavaron. Seguidamente se añadieron las soluciones estériles de substrato y vitaminas así como el CaCO<sub>3</sub> autoclavado en seco.

10 La cultivación se efectuó en volúmenes de 10 ml, que estaban contenidos en matraces Erlenmeyer con obstáculos que tenían una capacidad de 100 ml. La temperatura fue de 33°C, el número de revoluciones era de 250 rpm y la humedad del aire fue de 80 %.

15 Después de 24 horas se determinó la densidad óptica (OD) a una longitud de onda de medición de 660 nm con el instrumento Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) bestimmt. La cantidad de lisina formada se determinó con un aparato analizador de aminoácidos de la entidad Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Alemania) por cromatografía con intercambio de iones y derivatización en columna posterior con detección mediante ninhidrina.

En la Tabla 1 se representa el resultado del ensayo.

**Tabla 1:** Preparación de L-lisina

Cepa	L-lisina HCl (g/l)	DO (a 660nm)
DM1729 (cepa de partida)	9,9	14,9
DM1729_PgapWT_lysCT311I_asd	12,5	13,9
DM1729_Pgap3_lysCT311I_asd	12,8	13,2
DM1729_Pg3N3_lysCT311I_asd	13,2	12,9

20 Todos los valores son valores medios de 3 experimentos independientes con las cepas mencionadas.

El resultado muestra el efecto positivo sobre la formación del deseado producto (L-lisina) por utilización de las variantes de promotor Pgap3 y Pg3N3 conformes al invento en relación con las cepas de partida precedentemente mencionadas.

25 **Ejemplo 6**

**Construcción del vector de intercambio pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB**

30 Partiendo de la secuencia genómica de Corynebacterium glutamicum ATCC13032 se sintetizó un fragmento grande de ADN con un tamaño de 2.722 pb en la entidad GeneArt (Regensburg, Alemania) (Seq ID: 29) que lleva el promotor Pgap3 y los genes argJ (que codifica una glutamato-N-acetiltransferasa) y argB (que codifica una acetilglutamato-cinasa) trägt. La zona de promotor del gen gap abarca las posiciones 10 hasta 470, correspondiendo la secuencia de la construcción artificial en esta zona a la secuencia representada en Seq ID No:3 (para Pgap3). Secuencia abajo siguen las secuencias codificadoras de una glutamato-N-acetiltransferasa y eine acetilglutamato-cinasa procedente de Corynebacterium glutamicum. El fragmento fue cortado a través de los sitios de  
 35 corte de SphI y BlnI introducidos terminalmente por disociación con SphI y BlnI y seguidamente en el vector

pK18mobsacB\_IBcg0054 asimismo cortado con SphI/BlnI (del Ejemplo 2) cloniert. El plásmido lleva la denominación pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB.

### Ejemplo 7

#### **Producción de la cepa de *C. glutamicum* Corynebacterium glutamicum ATCC13032-DargFRGH-Pg3-argJB**

El vector pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB mencionado en el Ejemplo 6 fue transferido análogamente al Ejemplo 4 mediante conjugación según un protocolo de Schäfer y colaboradores (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)) a la cepa de Corynebacterium glutamicum Corynebacterium glutamicum ATCC13032\_DargFRGH (de la solicitud de patente DE102010003419.3).

Para esto el vector fue previamente transformado en la cepa S17-1 de E.coli (Simon y colaboradores, Biotechnology 1:784-791). El vector pK18mobsacB o respectivamente pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB no puede replicarse espontáneamente en C.glutamicum ATCC13032 y se retiene en la célula solamente cuando él, como consecuencia de un suceso de recombinación, se ha integrado en el cromosoma. Die selección de clones con pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB integrado se efectúa por siembra en placas de la tanda de conjugación sobre un agar LB (Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, New York, 1989), que ha sido suplementado con 15 mg/l de kanamicina y 50 mg/ml de ácido nalidíxico. 15 clones crecidos son extendidos sobre placas de agar LB con 25 mg/l de kanamicina e incubadas durante 16 horas a 33°C. Para la selección de unos mutantes, en los cuales, como consecuencia de un segundo suceso de recombinación, ha tenido lugar la escisión del plásmido, los clones son cultivados durante 20 horas 20 de una manera no selectiva en un medio líquido LB, seguidamente extendidos sobre un agar LB con 10 % de sacarosa e incubados durante 24 horas. El plásmido pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB contiene, al igual que el plásmido de partida pK18mobsacB, junto al gen de resistencia a kanamicina, una copia del gen sacB que codifica la levano sucraza de Bacillus subtilis. La expresión inducible por sacarosa conduce a la formación de la levano sucraza, que cataliza la síntesis del producto levano tóxico para *C. glutamicum*. Sobre un agar LB con sacarosa crecen por lo tanto solamente aquellos clones, en los cuales se ha escindido de nuevo el pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB integrado. En el caso de la escisión, juntamente con el plásmido, puede escindirarse o bien la casete IBcg0054\_Pg3\_argJB completa, o la zona intergénica cromosomal IBcg0054. Aproximadamente 40 hasta 50 colonias fueron examinadas en cuanto al fenotipo "crecimiento en presencia de sacarosa" y "no crecimiento en presencia de kanamicina". Con el fin de detectar que la casete IBcg0054\_Pg3\_argJB ha permanecido en el cromosoma, fueron examinadas aproximadamente 20 colonias, que tienen el fenotipo 5 "crecimiento en presencia de sacarosa" y "no crecimiento en presencia de kanamicina", de acuerdo con el método de PCR patrón de Innis y colaboradores (PCR Protocols. a Guide to Methods and applications, 1990, Academic Press) con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa. En el presente caso, a partir del ADN cromosomal de las colonias se amplificó un fragmento de ADN, que lleva la zona circundante a la zona intergénica IBcg0054 y una parte del gen arg insertado. Se escogieron los siguientes oligonucleótidos cebadores para la PCR.

argA-E1: TGTCGCGGAAGTGCTGCAAC

cg0054\_10.p: GCACTCTCGTTTGGCAGTTC

La detección de los clones correctos se efectuó por producción de un fragmento de ADN de 1.949 pb, que se detectó en el gel de agarosa.

### Ejemplo 8

#### **Producción de L-ornitina con *Corynebacterium glutamicum***

Para la investigación de su capacidad para producir L-ornitina se cultivaron previamente en cada caso tres clones de la cepa de *C. glutamicum* ATCC13032\_DargFRGH\_Pg3\_argJB y tres clones de la cepa ATCC 13032\_Delta\_argFRGH en cada caso en 10 ml de un medio de ensayo durante 16 h a 33°C. Para el ensayo de producción se inocularon con el cultivo preliminar obtenido en cada caso 10 ml de un medio de ensayo de tal manera que la DO<sub>600</sub> (densidad óptica bei 600 nm) de partida fuese de 0,1. Cada clon fue ensayado en tres matraces de sacudimiento, de tal manera que cada cepa está representada por en total nueve matraces de sacudimiento.

El medio de ensayo era idéntico al medio CgXII descrito en la referencia de Keilhauer y colaboradores (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603), però contenía adicionalmente 7,5 g/l de un extracto de levadura (Difco), 25 µg/ml de kanamicina, 1 mM de IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) y 40 g/l de sacarosa en lugar de glucosa. Por motivos de sencillez, la composición del medio de ensayo se recopila en la subsiguiente Tabla 2.

Tabla 2

Componente	Contenido por l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 g
Urea	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,25 g
Ácido 3-morfolinopropanosulfónico (MOPS)	42 g
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,01 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,001 g
CuSO <sub>4</sub>	0,0002 g
NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,00002 g
Biotina	0,0002 g
Ácido protocatecuico	0,03 g
Sacarosa	40 g
Extracto de levadura	7,5 g
pH (con NaOH)	7

5 La cultivación se efectuó a 33°C y 200 rpm en matraces de sacudimiento que tienen una capacidad de 100 ml. La desviación del sacudidor era de 5 cm. Después de 24 y 48 horas se tomaron muestras de los cultivos y se determinaron la densidad óptica, el contenido de sacarosa y el contenido de L-ornitina y las células se centrifugaron brevemente (centrifugadora de mesa tipo 5415D (de Eppendorf) a 13.000 rpm, durante 10 min, a la temperatura ambiente).

10 La determinación de la densidad óptica se efectuó a una longitud de onda de 660 nm con un fotómetro de placas de microtitulación GENios (Tecan, Reading, Reino Unido). Las muestras se diluyeron a 1:100 con agua desmineralizada, antes de la medición.

15 La determinación de la sacarosa se efectuó con un sistema de ensayo (Nº de cat. 10 716 251 035) de la entidad R-Biopharm AG (Darmstadt, Alemania). En el presente caso se invierte sacarosa y la glucosa formada se detecta con un ensayo enzimático acoplado (hexocinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) a través de la formación de NADH.

20 La determinación cuantitativa de las concentraciones extracelulares de aminoácidos a partir del material sobrenadante de cultivo se efectuó mediante una HPLC de fase inversa (Lindroth y colaboradores, Analytical chemistry (1979) 51: 1167-1174). Se utilizó un aparato de HPLC de la serie HP1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) con un detector de fluorescencia (G1321A) conectado; la regulación del sistema y la evaluación de los datos se efectuaron con un puesto HP-Chem-Station (de Hewlett-Packard). 1 µL de la solución de aminoácidos que se había de analizar se mezcló en una derivatización en columna preliminar automática con 20 µl de un reactivo acabado de orto-ftalaldehído/2-mercaptoetanol (de Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Países Bajos). Los isoindoles sustituidos con tio, fluorescentes, resultantes en tal caso (Jones y colaboradores, Journal of Chromatography (1983) 266: 471-482) fueron separados a través de una columna preliminar combinada (Hypersil DOS 540x4 mm) y de una columna principal (Hypersil ODS 5, ambas columnas son de la entidad CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Alemania) con un programa de gradientes con una fase (de metanol) crecientemente no polar. El eluyente polar era acetato de sodio (0,1 M; pH 7,2); el caudal era de 0,8 ml por minuto. La detección por fluorescencia de los aminoácidos derivatizados se efectuó a una longitud de onda de excitación de 230 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. Las concentraciones de L-ornitina o respectivamente del hidrocloreto de L-ornitina se calcularon por una comparación con un patrón externo y L-asparagina como patrón interno adicional.

30 El peso molecular del hidrocloreto de L-ornitina es de 168,6 g x mol<sup>-1</sup> y el de la L-ornitina es de 132,1 g x mol<sup>-1</sup>.

35 Para el cálculo del rendimiento, la cantidad de L-ornitina formada (medida como hidrocloreto de L-ornitina) se dividió por la cantidad de sacarosa consumida.

Los resultados se representan en la Tabla 3.

Tabla 3: Formación de L-ornitina después de incubación durante 24 horas (Tabla 3A) y 48 horas (Tabla 3B).  
Abreviaturas: Orn-HCl: hidrocloreuro de L-ornitina.

**Tabla 3A:**

Tiempo	24 horas		
Cepa	Orn-HCl g/l	Rendimiento g/g	DO
ATCC 13032 _Delta_argFRGH	9,85 ± 0,10	0,39 ± 0,01	10,83 ± 0,25
ATCC13032_Darg FRGH_Pg3_argJB	10,53 ± 0,16	0,42 ± 0,01	10,50 ± 0,45

5

**Tabla 3B:**

Tiempo	48 horas		
Cepa	Orn-HCl g/l	Rendimiento g/g	DO
ATCC 13032 _Delta_argFRGH	15,10 ± 0,65	0,35 ± 0,01	11,59 ± 1,20
ATCC13032_Darg FRGH_Pg3_argJB	16,28 ± 0, 41	0,38 ± 0,01	10, 88 ± 0,43

### Ejemplo 9

#### **Producción de las construcciones artificiales de intercambio pK18mobsacB\_homUP\_Pg3\_hom, pK18mobsacB\_ilvAUP\_Pg3\_ilvA y pK18mobsacB\_pycUP\_Pg3\_pyc**

10

#### **Construcción del vector de intercambio pK18mobsacB\_homUP\_Pg3\_hom**

Partiendo de la secuencia genómica de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 se sintetizó en la entidad GeneArt (Regensburg, Alemania) un fragmento de ADN grande con un tamaño de 2.549 pb (SEQ ID No. 42) que lleva una parte de la región génica que se encuentra secuencia arriba del gen hom, el promotor Pgap3 y una parte del gen hom. El fragmento se cortó a través de los sitios de corte de BamHI y XbaI introducidos terminalmente por disociación con BamHI y XbaI y seguidamente se clonó en el vector pK18mobsacB asimismo cortado con BamHI/XbaI.

15

El plásmido lleva la denominación pK18mobsacB\_homUP\_Pg3\_hom.

20

#### **Construcción del vector de intercambio pK18mobsacB-ilvAUP-Pg3\_ilvA**

De una manera análoga se sintetizó en la entidad GeneArt un fragmento de ADN grande con un tamaño de 2.442 pb (SEQ ID No. 43) que lleva una parte de la región génica que se encuentra secuencia arriba del gen ilvA, el promotor Pgap3 y una parte del gen ilvA. El fragmento se cortó a través de los sitios de corte de BamHI y XbaI introducidos terminalmente por disociación con BamHI y XbaI y seguidamente se clonó en el vector pK18mobsacB asimismo cortado con BamHI/XbaI.

25

El plásmido lleva la denominación pK18mobsacB\_ilvAUP\_Pg3\_ilvA.

#### **Construcción del vector de intercambio pK18mobsacB\_pycUP\_Pg3\_pyc**

De una manera análoga se sintetizó en la entidad GeneArt un fragmento de ADN grande con un tamaño de 2.072 pb (SEQ ID No. 44) que que lleva una parte de la región génica que se encuentra secuencia arriba del gen pyc, el promotor Pgap3 y una parte del gen pyc. El fragmento se cortó a través de los sitios de corte de BamHI y HindIII introducidos terminalmente por disociación con BamHI y HindIII y seguidamente se clonó en el vector pK18mobsacB asimismo cortado con BamHI/HindIII.

30

El plásmido lleva la denominación pK18mobsacB\_pycUP\_Pg3\_pyc.

35

### Ejemplo 10

#### **Producción de las cepas de *C. glutamicum* ATCC14310\_homUP\_Pg3\_hom, ATCC14310\_ilvAUP\_Pg3\_ilvA y ATCC14310\_pycUP\_Pg3\_pyc**

40

Los vectores pK18mobsacB\_homUP\_Pg3\_hom, pK18mobsacB\_ilvAUP\_Pg3\_ilvA y pK18mobsacB\_pycUP\_Pg3\_pyc, mencionados en el Ejemplo 9, fueron transferidos mediante conjugación según un protocolo de Schäfer y colaboradores (Journal of Microbiology 172: 1663-1666 (1990)) en cada caso

individualmente por conjugación en la cepa **C. glutamicum ATCC14310** de *Corynebacterium glutamicum* (de una manera análoga a la del Ejemplo 4).

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos cebadores para la PCR de detección de las cepas.

5 **Cebadores para la detección de homUP Pg3 hom en ATCC14310:**

Hom\_XI-A1 GATCTAGACGTCCAGGAGTTCCTCTACG (SEQ ID No. 45)

LC-hom2 TGGCGTCCAAGATGAAGTTG (SEQ ID No. 46)

La detección de los clones correctos se efectuó por producción de un fragmento de ADN con un tamaño de 1.502 pb, que se detectó en el gel de agarosa y seguidamente se confirmó por secuenciación.

10 **Cebadores para la detección de ilvAUP Pg3 ilvA en ATCC14310:**

Pgap3\_1.p CGAGTACTATGCATTGAAGCCTAAAAACGACCG (SEQ ID No. 47)

ilvA-int-rev2 ACCGCGGATCTTGAGGAAC (SEQ ID No. 48)

La detección de los clones correctos se efectuó por producción de un fragmento de ADN con un tamaño de 712 pb, que se detectó en el gel de agarosa y seguidamente se confirmó por secuenciación.

15 **Cebadores para la detección de pycUP Pg3 pyc en ATCC14310:**

pycUP\_3.p AGCACGTCAGCTGGTTCA (SEQ ID No. 49)

2xpyc-1 AGGTACGCCTTGACTGGTGA (SEQ ID No. 50)

La detección de los clones correctos se efectuó por producción de un fragmento de ADN con un tamaño de 1.004 pb, que se detectó en el gel de agarosa y seguidamente se confirmó por secuenciación.

20 **Ejemplo 11**

**Preparación de isoleucina**

Cada vez 10 ml de un caldo de cultivo Caso-Bouillon con 0.5 % glucosa se inocularon en un matraz Erlenmeyer con obstáculos (volumen 100 ml) con 100 µl un cultivo de bacterias del Ejemplo 10 (derivados de ATCC 14310) y como cultivo preliminar se sacudieron a 33°C durante 16 h a 200 rpm (matraces Erlenmeyer amplitud 5 cm). A partir del cultivo preliminar se inocularon 10 ml de un cultivo principal en cada caso en tres matraces Erlenmeyer con obstáculos que tenían una capacidad de 100 ml con un volumen de inoculación de 1 %. Para el cultivo principal sirvió un medio, que contenía 40 g de glucosa, 20 g de sulfato de amonio, 0,5 g de dihidrógenofosfato de potasio, 0,5 g de hidrógenofosfato de dipotasio, 20 g de carbonato de calcio, 0,25 g de sulfato de magnesio (heptahidato), 10 mg de sulfato de hierro (heptahidato), 10 mg de sulfato de manganeso (x 4 H<sub>2</sub>O), 1 mg de sulfato de zinc (heptahidato), 0,2 mg de sulfato de cobre y 300 mg/l de L-leucina. El cultivo principal se incubó durante 48 h a 33°C y con una velocidad de sacudimiento de 200 rpm (amplitud 5 cm). El líquido de cultivo obtenido se separó por centrifugación y seguidamente se determinó la concentración de isoleucina en el material sobrenadante. Los resultados se representan en la Tabla 4.

35 **Tabla 4:** Formación de L-isoleucina después de incubación durante 48 horas.

Cepa	Conc. de isoleucina (g/l) después de 48 h		
	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3
<b>ATCC14310</b>	3,51	3,43	3,48
<b>ATCC14310_homUP_Pg3_hom</b>	3,91	3,95	3,97
<b>ATCC14310_ilvAUP_Pg3_ilvA</b>	4,1	4,02	4,05
<b>ATCC14310_pycUP_Pg3_pyc</b>	3,75	3,81	3,84

Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacB\_Pgap3\_lysCT3111\_asd

Figura 2: Mapa del plásmido pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB

Figura 3: Mapa del plásmido pK18mobsacB\_homUP\_Pg3\_hom

Figura 4: Mapa del plásmido pK18mobsacB\_ilvAUP\_Pg3\_ilvA

5 Figura 5: Mapa del plásmido pK18mobsacB\_pycUP\_Pg3\_pyc

Las abreviaturas y denominaciones utilizadas tienen los siguientes significados.

10	oriV:	Origen de pMB1 similar a ColE1
	sacB	El gen sacB que codifica la proteína levanosucrosa
	RP4mob:	Sitio de movilización de RP4
15	Kan:	Gen de resistencia a kanamicina
	'cg0057:	Parte del gen cg0057 que codifica una seria/treonina-proteínacinas
20	cg0055:	Gen cg0055 que codifica una proteína de membrana putativa
	'cg0054:	Parte del gen cg0054 que codifica una proteína de absorción de hierro
	gap Terminator:	Terminador del gen gap
25	promotor:	Promotor del gen gap correspondiente a SEQ ID NO 3 (también Pgap3)
	gap RBS:	Sitio de fijación a ribosomas del gen gap
30	lysC:	Alelo del gen lysC, que codifica una aspartato-cinasa desensibilizada
	asd:	Gen asd, que codifica una aspartatosemialdehído deshidrogenasa
	argJ:	Gen argJ, que codifica una glutamato-N-acetiltransferasa
35	argB:	Gen argB, que codifica una acetilglutamatocinasa
	homUP:	Parte de la región génica que se encuentra secuencia arriba del gen hom
40	hom':	Parte del gen hom, que codifica una homoserina deshidrogenasa
	ilvAUP:	Parte de la región génica que se encuentra secuencia arriba del gen ilvA
	ilva':	Parte del gen ilvA, que codifica una treonina-deshidratasa
45	pycUP:	Parte de la región génica que se encuentra secuencia arriba del gen pyc
	pyc':	Parte del gen pyc, que codifica una piruvato carboxilasa
50	HindIII:	Sitio de corte de la enzima de restricción HindIII
	BamHI:	Sitio de corte de la enzima de restricción BamHI
	XbaI:	Sitio de corte de la enzima de restricción XbaI
55	AvrII:	Sitio de corte de la enzima de restricción AvrII
	NsiI:	Sitio de corte de la enzima de restricción NsiI
60	SphI:	Sitio de corte de la enzima de restricción SphI

BlnI: Sitio de corte de la enzima de restricción BlnI

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> Evonik Degussa GmbH
- <120> Variantes del promotor Pgap
- <130> 2010E00462
- 5 <160> 50
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- < 211> 484
- < 212> ADN
- 10 < 213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032
- <220>
- < 221> misc\_feature
- < 222> (1)..(484)
- < 223> SEQ ID NO: 20 del documento US 2008/0050786
- 15 <220>
- < 221> misc\_feature
- < 222> (247)..(346)
- < 223> secuencia del promotor P-gap según Patek y colaboradores (Journal of Biotechnology 104, 311-323 (2003))
- 20 <220>
- < 221> misc\_feature
- < 222> (289).. (294)
- < 223> - 10 Región del promotor P-gap según Patek y colaboradores
- 25 <220>
- < 221> misc\_feature
- < 222> (301)..(301)
- < 223> comienzo de la transcripción
- 30 <220>
- < 221> misc\_feature
- < 222> (363)..(363)
- < 223> nucleobase guanina
- 35 <220>
- < 221> RBS
- < 222> (473)..(478)
- < 223> sitio de fijación a ribosomas
- <400>
- ttgaagccta aaaacgaccg agcctattgg gattaccatt gaagccagtg tgagttgcat 60
- cacattggct tcaaatctga gactttaatt tgtggattca cgggggtgta atgtagttca 120
- taattaaccc cattcggggg agcagatcgt agtgcgaacg atttcaggtt cgttccctgc 180
- aaaaactatt tagcgcgaagt gttggaaatg cccccgtttg gggccaatgt ccatttttga 240
- atgtgtctgt atgattttgc atctgctcgc aaatctttgt ttccccgcta aagttgagga 300
- caggttgaca cggagttgac tcgacgaatt atccaatgtg agtaggtttg gtgcgtgagt 360
- tggaaaaaatt cgccatactc gcccttgggt tctgtcagct caagaattct tgagtgaccg 420

ES 2 624 926 T3

atgctctgat tgacctact gcttgacaca ttgcatttcc tacaatcttt agaggagaca 480

caac 484

5 <210> 2  
 < 211> 461  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<220>  
 < 221> promotor  
 < 222> (1)..(461)

10 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (362)..(362)  
 < 223> nucleobase guanina (g)

<400> 2

tgaagcctaa aaacgaccga gcctattggg attaccattg aagccagtgt gagttgcatc 60

acattggctt caaatctgag actttaattt gtggattcac gggggtgtaa tgtagttcat 120

aattaacccc attcggggga gcagatcgta gtgcgaacga tttcagggtc gttccctgca 180

aaaactattt agcgcagtgt ttggaaatgc ccccgtttgg ggtcaatgtc catttttgaa 240

tgtgtctgta tgattttgca tctgctgcga aatctttggt tccccgctaa agttgaggac 300

aggttgacac ggagttgact cgacgaatta tccaatgtga gtaggtttgg tgcgtgagtt 360

ggaaaaattc gccatactcg cccttggggt ctgtcagctc aagaattctt gagtgaccga 420

15 tgctctgatt gacctactg cttgacacat tgcatttctt a 461

<210> 3  
 < 211> 461  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

20 <220>  
 < 221> promotor  
 < 222> (1)..(461)

<220>  
 < 221> mutación  
 < 222> (362)..(362)  
 < 223> nucleobase adenina (a)

25 <400> 3

tgaagcctaa aaacgaccga gcctattggg attaccattg aagccagtgt gagttgcatc 60

acattggctt caaatctgag actttaattt gtggattcac gggggtgtaa tgtagttcat 120

aattaacccc attcggggga gcagatcgta gtgcgaacga tttcagggtc gttccctgca 180

aaaactattt agcgcagtgt ttggaaatgc ccccgtttgg ggtcaatgtc catttttgaa 240

# ES 2 624 926 T3

```

tgtgtctgta tgattttgca totgctgoga aatctttggt tccccgctaa agttgaggac      300
aggttgacac ggagttgact cgacgaatta tccaatgtga gtaggtttgg tgcgtgagtt      360
gaaaaaatc gccatactcg cccttgggtt ctgtcagctc aagaattctt gagtgaccga      420
tgctctgatt gacctaactg cttgacacat tgcatttctt a                          461

<210> 4
< 211> 10
5 < 212> ADN
  < 213> Corynebacterium glutamicum

<220>
< 221> RBS
< 222> (1)..(10)
10 < 223> secuencia de Shine-Dalgarno según Amador y colaboradores (Microbiology, 145, 915-924 (1999))

<400> 4
agaaggagg      10

<210> 5
< 211> 9
15 < 212> ADN
  < 213> Corynebacterium glutamicum

<220>
< 221> RBS
< 222> (1)..(9)
20 < 223> secuencia de Shine-Dalgarno según Martin y colaboradores (Journal of Biotechnology 104, 41 - 53 (2003))

<400> 5
gaaaggagg      9

<210> 6
< 211> 9
25 < 212> ADN
  < 213> Corynebacterium glutamicum

<220>
< 221> RBS
< 222> (1)..(9)
30 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen ppc según O'Regan y colaboradores (gene 77, 237-251 (1989))

<400> 6
gaaagagtg      9

<210> 7
< 211> 7
35 < 212> ADN
  < 213> Corynebacterium glutamicum

<220>
< 221> RBS
< 222> (1)..(7)
40 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen aceA según Reinscheid y colaboradores (Journal of Bacteriology 176
(12), 3474-3483 (1994))

<400> 7
aaggaag      7

```

# ES 2 624 926 T3

- <210> 8  
< 211> 7  
< 212> ADN  
< 213> Corynebacterium glutamicum
- 5 <220>  
< 221> RBS  
< 222> (1)..(7)  
< 223> sitio de fijación a ribosomas del gen thiX según Reinscheid y colaboradores (Journal of Bacteriology 176 (12), 3474-3483 (1994))
- 10 <400> 7  
gaaagga 7 8
- <210> 9  
< 211> 7  
< 212> ADN  
15 < 213> Corynebacterium glutamicum
- <220>  
< 221> RBS  
< 222> (1)..(7)  
< 223> sitio de fijación a ribosomas del gen sod según WO2005/059144
- 20 <400> 9  
gaaagga 7
- <210> 10  
< 211> 7  
< 212> ADN  
25 < 213> Corynebacterium glutamicum
- <220>  
< 221> RBS  
< 222> (1)..(7)  
< 223> sitio de fijación a ribosomas del gen tuf según WO2005/059093
- 30 <400> 10  
aggagga 7
- <210> 11  
< 211> 7  
< 212> ADN  
35 < 213> Corynebacterium glutamicum
- <220>  
< 221> RBS  
< 222> (1)..(7)  
< 223> sitio de fijación a ribosomas según SEQ ID NO:44 de EP 1 918 378 a1
- 40 <400> 11  
gaaagga 7
- <210> 12  
< 211> 7  
< 212> ADN  
45 < 213> Corynebacterium glutamicum
- <220>  
< 221> RBS

- < 222> (1)..(7)  
 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen fbp
- <400> 12  
 gaggagg 7
- 5 <210> 13  
 < 211> 6  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum
- 10 <220>  
 < 221> RBS  
 < 222> (1)..(6)  
 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen gap según Eikmanns (Journal of Bacteriology 174 (19), 6076-6086 (1992))
- 15 <400> 13  
 aggaga 6
- <210> 14  
 < 211> 22  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum
- 20 <220>  
 < 221> RBS  
 < 222> (11)..(16)  
 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen gap
- 25 <400> 14  
 caatctttag aggagacaca ac 22
- <210> 15  
 < 211> 22  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum
- 30 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (2)..(7)  
 < 223> sitio de corte de Sspl
- 35 <220>  
 < 221> RBS  
 < 222> (11)..(16)  
 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen gap
- <400> 15  
 caatatttag aggagacaca ac 22
- 40 <210> 16  
 < 211> 21  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum
- 45 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (4)..(8)  
 < 223> zona del sitio de corte de Nrul

- <220>  
 < 221> mutación  
 < 222> (7)..(7)  
 < 223> supresión del nucleótido citosina (c)
- 5 <220>  
 < 221> RBS  
 < 222> (10)..(15)  
 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen gap
- 10 <400> 16  
 caatcggaga ggagacaca c 21
- <210> 17  
 < 211> 22  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum
- 15 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (4)..(9)  
 < 223> sitio de corte de Nrul
- 20 <220>  
 < 221> RBS  
 < 222> (11)..(16)  
 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen gap
- <400> 17  
 caatcggag aggagacaca ac 22
- 25 <210> 18  
 < 211> 22  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum
- 30 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (4)..(9)  
 < 223> sitio de corte de Nrul
- 35 <220>  
 < 221> RBS  
 < 222> (8)..(14)  
 < 223> sitio de fijación a ribosomas del gen fbp
- <400> 18  
 caatcggag gaggccctc ag 22
- 40 <210> 19  
 < 211> 1266  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum
- 45 <220>  
 < 221> CDS  
 < 222> (1)..(1266)  
 < 223> región codificadora de lysC

ES 2 624 926 T3

<400> 19  
gtg gcc ctg gtc gta cag aaa tat ggc ggt tcc tcg ctt gag agt gcg 48  
Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
1 5 10 15

gaa cgc att aga aac gtc gct gaa cgg atc gtt gcc acc aag aag gct 96  
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
20 25 30

gga aat gat gtc gtg gtt gtc tgc tcc gca atg gga gac acc acg gat 144  
Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
35 40 45

gaa ctt cta gaa ctt gca gcg gca gtg aat ccc gtt ccg cca gct cgt 192  
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
50 55 60

gaa atg gat atg ctc ctg act gct ggt gag cgt att tct aac gct ctc 240  
Glu Met Asp Met Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
65 70 75 80

gtc gcc atg gct att gag tcc ctt ggc gca gaa gcc caa tct ttc acg 288  
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
85 90 95

ggc tct cag gct ggt gtg ctc acc acc gag cgc cac gga aac gca cgc 336  
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
100 105 110

att gtt gat gtc act cca ggt cgt gtg cgt gaa gca ctc gat gag ggc 384  
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
115 120 125

aag atc tgc att gtt gct ggt ttc cag ggt gtt aat aaa gaa acc cgc 432  
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
130 135 140

gat gtc acc acg ttg ggt cgt ggt ggt tct gac acc act gca gtt gcg 480  
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala

ES 2 624 926 T3

145		150		155		160	
ttg gca gct gct	ttg aac gct gat	gtg tgt gag att	tac tcg gac gtt				528
Leu Ala Ala Ala	Leu Asn Ala Asp	Val Cys Glu Ile	Tyr Ser Asp Val				
	165	170	175				
gac ggt gtg tat	acc gct gac ccg	cgc atc gtt cct	aat gca cag aag				576
Asp Gly Val Tyr	Thr Ala Asp Pro	Arg Ile Val Pro	Asn Ala Gln Lys				
	180	185	190				
ctg gaa aag ctc	agc ttc gaa gaa	atg ctg gaa ctt	gct gct gtt ggc				624
Leu Glu Lys Leu	Ser Phe Glu Glu	Met Leu Glu Leu	Ala Ala Val Gly				
	195	200	205				
tcc aag att ttg	gtg ctg cgc agt	ggt gaa tac gct	cgt gca ttc aat				672
Ser Lys Ile Leu	Val Leu Arg Ser	Val Glu Tyr Ala	Arg Ala Phe Asn				
	210	215	220				
gtg cca ctt cgc	gta cgc tcg tct	tat agt aat gat	ccc ggc act ttg				720
Val Pro Leu Arg	Val Arg Ser Ser	Tyr Ser Asn Asp	Pro Gly Thr Leu				
	225	230	235				
att gcc ggc tct	atg gag gat att	cct gtg gaa gaa	gca gtc ctt acc				768
Ile Ala Gly Ser	Met Glu Asp Ile	Pro Val Glu Glu	Ala Val Leu Thr				
	245	250	255				
ggt gtc gca acc	gac aag tcc gaa	gcc aaa gta acc	ggt ctg ggt att				816
Gly Val Ala Thr	Asp Lys Ser Glu	Ala Lys Val Thr	Val Leu Gly Ile				
	260	265	270				
tcc gat aag cca	ggc gag gct gcg	aag gtt ttc cgt	gcg ttg gct gat				864
Ser Asp Lys Pro	Gly Glu Ala Lys	Val Phe Arg Ala	Leu Ala Asp				
	275	280	285				
gca gaa atc aac	att gac atg gtt	ctg cag aac gtc	tct tct gta gaa				912
Ala Glu Ile Asn	Ile Asp Met Val	Leu Gln Asn Val	Ser Ser Val Glu				
	290	295	300				
gac ggc acc acc	gac atc acc ttc	acc tgc cct cgt	tcc gac ggc cgc				960
Asp Gly Thr Thr	Asp Ile Thr Phe	Thr Cys Pro Arg	Ser Asp Gly Arg				
	305	310	315				
cgc gcg atg gag	atc ttg aag aag	ctt cag gtt cag	ggc aac tgg acc				1008
Arg Ala Met Glu	Ile Leu Lys Lys	Leu Gln Val Gln	Gly Asn Trp Thr				
	325	330	335				
aat gtg ctt tac	gac gac cag gtc	ggc aaa gtc tcc	ctc gtg ggt gct				1056
Asn Val Leu Tyr	Asp Asp Gln Val	Gly Lys Val Ser	Leu Val Gly Ala				
	340	345	350				
ggc atg aag tct	cac cca ggt gtt	acc gca gag ttc	atg gaa gct ctg				1104
Gly Met Lys Ser	His Pro Gly Val	Thr Ala Glu Phe	Met Glu Ala Leu				
	355	360	365				
cgc gat gtc aac	gtg aac atc gaa	ttg att tcc acc	tct gag att cgt				1152
Arg Asp Val Asn	Val Asn Ile Glu	Leu Ile Ser Thr	Ser Glu Ile Arg				
	370	375	380				
att tcc gtg ctg	atc cgt gaa gat	gat ctg gat gct	gct gca cgt gca				1200
Ile Ser Val Leu	Ile Arg Glu Asp	Asp Asp Leu Asp	Ala Ala Arg Ala				
	385	390	395				
ttg cat gag cag	ttc cag ctg ggc	ggc gaa gac gaa	gcc gtc gtt tat				1248
Leu His Glu Gln	Phe Gln Leu Gly	Gly Glu Asp Glu	Ala Val Val Tyr				
	405	410	415				
gca ggc acc gga	cgc taa						1266
Ala Gly Thr Gly	Arg						
	420						

<210> 20  
<211> 421

< 212> PRT

< 213> *Corynebacterium glutamicum*

ES 2 624 926 T3

<400> 20

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
 20 25 30

Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60

Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80

Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
 130 135 140

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
 145 150 155 160

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
 165 170 175

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
 180 185 190

ES 2 624 926 T3

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
 195 200 205

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
 210 215 220

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr  
 245 250 255

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile  
 260 265 270

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp  
 275 280 285

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu  
 290 295 300

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg  
 305 310 315 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr  
 325 330 335

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala  
 340 345 350

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu  
 355 360 365

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg  
 370 375 380

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala  
 385 390 395 400

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr  
 405 410 415

Ala Gly Thr Gly Arg  
 420

<210> 21  
 < 211> 1266  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

5

<220>  
 < 221> CDS  
 < 222> (1)..(1266)  
 < 223> región codificadora de lysC

ES 2 624 926 T3

<220>  
 < 221> mutación  
 < 222> (932)..(932)  
 < 223> mutación T311I; nucleobase citosina (c) a timina (t)

5	<400> 21	
	gtg gcc ctg gtc gta cag aaa tat ggc ggt tcc tcg ctt gag agt gcg	48
	Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala	
	1 5 10 15	
	gaa cgc att aga aac gtc gct gaa cgg atc gtt gcc acc aag aag gct	96
	Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala	
	20 25 30	
	gga aat gat gtc gtg gtt gtc tgc tcc gca atg gga gac acc acg gat	144
	Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp	
	35 40 45	
	gaa ctt cta gaa ctt gca gcg gca gtg aat ccc gtt ccg cca gct cgt	192
	Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg	
	50 55 60	
	gaa atg gat atg ctc ctg act gct ggt gag cgt att tct aac gct ctc	240
	Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu	
	65 70 75 80	
	gtc gcc atg gct att gag tcc ctt ggc gca gaa gcc caa tct ttc acg	288
	Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr	
	85 90 95	
	ggc tct cag gct ggt gtg ctc acc acc gag cgc cac gga aac gca cgc	336
	Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg	
	100 105 110	
	att gtt gat gtc act cca ggt cgt gtg cgt gaa gca ctc gat gag ggc	384
	Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly	
	115 120 125	
	aag atc tgc att gtt gct ggt ttc cag ggt gtt aat aaa gaa acc cgc	432
	Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg	
	130 135 140	
	gat gtc acc acg ttg ggt cgt ggt ggt tct gac acc act gca gtt gcg	480
	Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala	
	145 150 155 160	
	ttg gca gct gct ttg aac gct gat gtg tgt gag att tac tcg gac gtt	528
	Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val	
	165 170 175	
	gac ggt gtg tat acc gct gac ccg cgc atc gtt cct aat gca cag aag	576
	Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys	
	180 185 190	
	ctg gaa aag ctc agc ttc gaa gaa atg ctg gaa ctt gct gct gtt ggc	624

ES 2 624 926 T3

Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly		
		195					200					205					
tcc	aag	att	ttg	gtg	ctg	cgc	agt	gtt	gaa	tac	gct	cgt	gca	ttc	aat		672
Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn		
	210					215					220						
gtg	cca	ott	cgc	gta	cgc	tcg	tct	tat	agt	aat	gat	ccc	ggc	act	ttg		720
Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu		
225					230					235					240		
att	gcc	ggc	tct	atg	gag	gat	att	cct	gtg	gaa	gaa	gca	gtc	ctt	acc		768
Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr		
				245				250						255			
ggg	gtc	gca	acc	gac	aag	tcc	gaa	gcc	aaa	gta	acc	ggt	ctg	ggg	att		816
Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile		
			260					265						270			
tcc	gat	aag	cca	ggc	gag	gct	gcg	aag	ggt	ttc	cgt	gcg	ttg	gct	gat		864
Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp		
		275						280						285			
gca	gaa	atc	aac	att	gac	atg	ggt	ctg	cag	aac	gtc	tct	tct	gta	gaa		912
Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu		
	290					295					300						
gac	ggc	acc	acc	gac	atc	atc	ttc	acc	tgc	cct	cgt	tcc	gac	ggc	cgc		960
Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Ile	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ser	Asp	Gly	Arg		
305					310					315					320		
cgc	gcg	atg	gag	atc	ttg	aag	aag	ctt	cag	ggt	cag	ggc	aac	tgg	acc		1008
Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr		
				325					330					335			
aat	gtg	ott	tac	gac	gac	cag	gtc	ggc	aaa	gtc	tcc	ctc	gtg	ggg	gct		1056
Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala		
			340					345						350			
ggc	atg	aag	tct	cac	cca	ggg	ggt	acc	gca	gag	ttc	atg	gaa	gct	ctg		1104
Gly	Met	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu		
		355					360					365					
cgc	gat	gtc	aac	gtg	aac	atc	gaa	ttg	att	tcc	acc	tct	gag	att	cgt		1152
Arg	Asp	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu	Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg		
	370					375					380						
att	tcc	gtg	ctg	atc	cgt	gaa	gat	gat	ctg	gat	gct	gct	gca	cgt	gca		1200
Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala		
	385				390					395					400		
ttg	cat	gag	cag	ttc	cag	ctg	ggc	ggc	gaa	gac	gaa	gcc	gtc	ggt	tat		1248
Leu	His	Glu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr		
				405					410					415			
gca	ggc	acc	gga	cgc	taa												1266
Ala	Gly	Thr	Gly	Arg													
			420														

<210> 22  
 <211> 421  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

ES 2 624 926 T3

<400> 22

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala  
 1 5 10 15

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala  
 20 25 30

Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp  
 35 40 45

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg  
 50 55 60

Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu  
 65 70 75 80

Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr  
 85 90 95

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg  
 100 105 110

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly  
 115 120 125

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg  
 130 135 140

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala  
 145 150 155 160

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val  
 165 170 175

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys  
 180 185 190

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly  
 195 200 205

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn  
 210 215 220

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu  
 225 230 235 240



ES 2 624 926 T3

<400> 23  
gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60  
aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120  
tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180  
ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggg agcgtatttc taacgctctc 240  
gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300  
ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggtcgt 360  
gtgctggaag cactcgatga gggcaagatc tgcattggtg ctggtttcca ggggtttaat 420  
aaagaaacc cgcgatgtcac cacggtgggt cgtggtggtt ctgacaccac tgcagttgcg 480  
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacggtga cgggtgtgtat 540  
accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatacga cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600  
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtgc tgcgcagtgt tgaatacgtc 660  
cgtgcattca atgtgccact tcgctacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720  
attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgcgcaacc 780  
gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840  
aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900  
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc atcttcacct gccctcgctc cgacggccgc 960  
cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020  
gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtggt 1080  
accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140  
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200  
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260  
cgctaaagtt ttaaaggagt agttttacaa tgaccacatc cgcagttggt ggtgcaaccg 1320  
gccaggtcgg ccaggttatg cgcacccttt tggaagagcg caatttccca gctgacactg 1380  
ttcgtttctt tgcttccca cgttccgcag gccgtaagat tgaattccgt ggcacggaaa 1440  
tcgaggtaga agacattact caggcaaccg aggagtcct caaggacatc gacgttgcgt 1500  
tgttctccgc tggaggcacc gcttccaagc agtacgctcc actgttcgct gctgcaggcg 1560  
cgactgttgt ggataactct tctgcttggc gcaaggacga cgaggttcca ctaatcgtct 1620  
ctgaggtgaa cccttccgac aaggattccc tggtaaggg cattattgcg aaccctaact 1680

ES 2 624 926 T3

gcaccaccat ggctgcatg ccagtgtga agccacttca cgatgccgct ggtcttgtaa 1740  
 agcttcacgt ttctcttac caggctgttt ccggttctgg tcttgcaggt gtggaaacct 1800  
 tggcaaagca ggttgctgca gttggagacc acaacgttga gttcgtccat gatggacagg 1860  
 ctgctgacgc aggcgatgtc ggaccttatg tttaccaat cgcttacaac gtgctgccat 1920  
 tcgccgaaa cctcgtcgat gacggcacct tcgaaaccga tgaagagcag aagctgcgca 1980  
 acgaatcccg caagattctc ggtctcccag acctcaaggt ctcaggcacc tgcgtccgcg 2040  
 tgcgggtttt caccggccac acgctgacca ttcacgccga attcgacaag gcaatcaccg 2100  
 tggaccaggc gcaggagatc ttgggtgccg cttcaggcgt caagcttctc gacgtcccaa 2160  
 ccccacttgc agctgccggc attgacgaat ccctcgttgg acgcatccgt caggactcca 2220  
 ctgtcgacga taaccgcggt ctggttctcg tcgtatctgg cgacaacctc cgcaagggtg 2280  
 ctgcgctaaa caccatccag atcgtgagc tgctggttaa gtaa 2324

<210> 24  
 < 211> 1266  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

5

<220>  
 < 221> mutación  
 < 222> (1)..(1)  
 < 223> nucleobase guanina (g) a adenina (a)

10

<220>  
 < 221> gen  
 < 222> (1)..(1266)  
 < 223> región codificadora de lysC

15

<220>  
 < 221> mutación  
 < 222> (932)..(932)  
 < 223> mutación T311I; nucleobase citosina (c) a timina (t)

20

<220>  
 < 221> mutación  
 < 222> (1265)..(1265)  
 < 223> nucleobase adenina (a) a guanina (g)

<400> 24  
 atggccctgg tcgtacagaa atatggcggc tcctcgttgg agagtgcgga acgcattaga 60  
 aacgtcgtg aacggatcgt tgccaccaag aaggctgga atgatgctgt ggttgtctgc 120  
 tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180  
 ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggt agcgtatttc taacgctctc 240  
 gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300  
 ggtgtgctca ccaccgagcg ccaccgaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggtcgt 360

ES 2 624 926 T3

gtgCGTgaag cactcGatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca gggTgttaat 420  
aaagaaaccc gCGatgtcac cacgTtgggt cgtggtggtt ctgacaccac tgcagTtgcg 480  
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgTtga cggTgtgtat 540  
accgctgacc cgcGcatcgt tCctaatgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600  
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggTgc tgcgcagTgt tgaatacGct 660  
cgtgcatTca atgtgccact tCGcgtacgc tCGtcttata gtaatgatcc cggcactTtg 720  
attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tCcttaccgg tgtcGcaacc 780  
gacaagtccg aagccaaagt aaccgTtctg ggtatttccg ataagccagg cGaggtgcg 840  
aaggTtttcc gtgcgTtggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacGtc 900  
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc atcttcaCct gccctcgttc cGacggccgc 960  
cgcgcgatgg agatcttGaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020  
gacgaccagg tCGgcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080  
accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140  
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200  
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tCGtttatgc aggcaccgga 1260  
cgctga 1266

- <210> 25
- <211> 2808
- 5 <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
  
- <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(6)
- 10 <223> zona del sitio de corte de Nsil
  
- <220>
- <221> promotor
- <222> (7)..(467)
- <223> promotor Pgap3 como SEQ ID NO 3
  
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (468)..(488)
- <223> RBS de gap como SEQ ID NO 16
  
- 20 <220>
- <221> gen
- <222> (489)..(1754)
- <223> región codificadora de lysC con mutación T3111, atg Start y tga Stopp como SEQ ID NO 24
  
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1755)..(1773)
- <223> RBS de gap como SEQ ID NO 26
  
- <220>
- <221> gen

# ES 2 624 926 T3

< 222> (1774)..(2808)

< 223> región codificadora de asd

<400> 25

atgcattgaa gcctaaaaac gaccgagcct attgggatta ccattgaagc cagtgtgagt	60
tgcatcacat tggcttcaaa tctgagactt taatttgtgg attcacgggg gtgtaatgta	120
gttcataatt aacccattc gggggagcag atcgtagtgc gaacgatttc aggttcgttc	180
cctgcaaaaa ctatttagcg caagtgttg aaatgcccc gtttggggtc aatgtccatt	240
tttgaatgtg tctgtatgat tttgcatctg ctgcgaaatc tttgtttccc cgctaaagtt	300
gaggacaggt tgacacggag ttgactcgac gaattatcca atgtgagtag gtttgggtgcg	360
tgagttgaaa aaattcgcca tactcgccct tgggttctgt cagctcaaga attcttgagt	420
gaccgatgct ctgattgacc taactgcttg acacattgca tttcctacaa tcggagagga	480
gacacaacat ggccttggtc gtacagaaat atggcggttc ctcgcttgag agtgcggaac	540
gcattagaaa cgtcgctgaa cggatcgttg ccaccaagaa ggctggaaat gatgtcgtgg	600
ttgtctgctc cgcaatggga gacaccacgg atgaacttct ggaacttgca gcggcagtga	660
atcccgttcc gccagctcgt gaaatggata tgctcctgac tgctgggtgag cgtatttcta	720
acgctctcgt cgccatggct attgagctcc ttggcgcaga agcccaatct ttcacgggct	780
ctcaggctgg tgtgctcacc accgagcgcc acgaaaocgc acgcattgtt gatgtcactc	840
caggctcgtg gcgtgaagca ctcgatgagg gcaagatctg cattgttgct ggtttccagg	900
gtgttaataa agaaaccgc gatgtcacca cgttgggtcg tgggtggttct gacaccactg	960
cagttcgtt ggcagctgct ttgaacgctg atgtgtgtga gatttactcg gacgttgacg	1020
gtgtgtatac cgctgacccg cgcacgttc ctaatgcaca gaagctggaa aagctcagct	1080
tcgaagaaat gctggaactt gctgctgttg gctccaagat tttgggtgctg cgcagtgttg	1140
aatacgctcg tgcatcfaat gtgccacttc gcgtacgctc gtcttatagt aatgatcccg	1200
gcactttgat tgccggctct atggaggata ttctgtgga agaagcagtc cttaccggtg	1260
tcgcaaccga caagtccgaa gccaaagtaa ccgttctggg tatttccgat aagccaggcg	1320
aggctgcgaa ggttttccgt gcgttggctg atgcagaaat caacattgac atggttctgc	1380
agaacgtctc ttctgtagaa gacggcacca ccgacatcat cttcacctgc cctcgttccg	1440
acggccgccg cgcgatggag atcttgaaga agcttcaggt tcagggcaac tggaccaatg	1500
tgctttacga cgaccaggtc ggcaaagtct ccctcgtggg tgctggcatg aagtctcacc	1560
caggtgttac cgcagagttc atggaagctc tgcgcgatgt caacgtgaac atcgaattga	1620
tttccacctc tgagattcgt atttccgtgc tgatccgtga agatgatctg gatgctgctg	1680

ES 2 624 926 T3

cacgtgcatt gcatgagcag ttccagctgg gcggcgaaga cgaagccgtc gtttatgcag 1740  
gcaccggacg ctgacgtcta gaggagacac aacatgacca ccatcgcagt tgttggtgca 1800  
accggccagg tccggccagg tatgcccacc cttttggaag agcgcgaattt cccagctgac 1860  
actgttcggt tctttgcttc cccacggtcc gcaggccgta agattgaatt ccgtaggcacg 1920  
gaaatcgagg tagaagacat tactcaggca accgaggagt ccctcaagga catcgacgtt 1980  
gcggtgttct cgcctggagg caccgcttcc aagcagtacg ctccactgtt cgctgctgca 2040  
ggcgcgactg ttgtggataa ctcttctgct tggcgcgaag acgacgaggt tcactaatac 2100  
gtctctgagg tgaaccttc cgacaaggat tccctgggtca agggcattat tgccaacct 2160  
aactgcacca ccatggctgc gatgccagtg ctgaagccac ttcacgatgc cgctggtctt 2220  
gtaaagcttc acgtttcctc ttaccaggct gtttccggtt ctggtcttgc aggtgtggaa 2280  
accttgcaaa agcagggtgc tgcagttgga gaccacaacg ttgagttcgt ccatgatgga 2340  
caggctgctg acgcaggcga tgtcggacct tatgtttcac caatcgctta caacgtgctg 2400  
ccattcgcog gaaacctcgt cgatgacggc accttcgaaa ccgatgaaga gcagaagctg 2460  
cgcaacgaat cccgcaagat tctcggcttc ccagacctca aggtotcagg cacctgcgtc 2520  
cgcgtgcggg ttttcaccgg ccacacgctg accattcacg ccgaattcga caaggcaatc 2580  
accgtggacc aggcgcagga gatcctgggt gccgcttcag gcgtcaagct tgtcgaatgc 2640  
ccaacccac ttgcagctgc cggcattgac gaatccctcg ttggacgcat ccgtaggac 2700  
tccactgtcg acgataaccg cggctctggt ctctcgtat ctggcgaaa cctccgcaag 2760  
ggtgctgcgc taaacacat ccagatcgt gagctgctgg ttaagtaa 2808

<210> 26  
< 211> 22  
5 < 212> ADN  
< 213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
< 221> misc\_feature  
10 < 222> (2)..(7)  
< 223> sitio de corte de AatII

<220>  
< 221> misc\_feature  
< 222> (6)..(11)  
< 223> sitio de corte de XbaI

15 <220>  
< 221> RBS  
< 222> (11)..(16)  
< 223> sitio de fijación a ribosomas del gen gap

20 <400> 26  
tgacgtctag aggagacaca ac 22

<210> 27  
< 211> 4496  
< 212> ADN  
< 213> Corynebacterium glutamicum

## ES 2 624 926 T3

- <220>  
< 221> misc\_feature  
< 222> (1)..(207)  
< 223> parte de la región codificadora de una serina/treonina-proteínacinasasa (cg0057)
- 5 <220>  
< 221> gen  
< 222> (322)..(594)  
< 223> región codificadora de una proteína putativa (proteína inhibidora de septación, cg0055)
- 10 <220>  
< 221> misc\_feature  
< 222> (812)..(817)  
< 223> zona del sitio de corte de Nsil
- 15 <220>  
< 221> promotor  
< 222> (818)..(1278)  
< 223> promotor Pgap3 como SEQ ID NO 3
- 20 <220>  
< 221> misc\_feature  
< 222> (1279)..(1299)  
< 223> RBS de gap como SEQ ID NO 16
- <220>  
< 221> gen  
< 222> (1300)..(2565)  
< 223> región codificadora de lysC con mutación T3111, atg Start y tga Stopp como SEQ ID NO 24
- 25 <220>  
< 221> misc\_feature  
< 222> (2566)..(2584)  
< 223> RBS de gap como SEQ ID NO 26
- 30 <220>  
< 221> gen  
< 222> (2585)..(3619)  
< 223> región codificadora de asd
- 35 <220>  
< 221> terminador  
< 222> (3623)..(3667)  
< 223> terminador de gap
- 40 <220>  
< 221> misc\_feature  
< 222> (3674)..(3679)  
< 223> zona del sitio de corte de AvrII
- <220>  
< 221> misc\_feature  
< 222> (3834)..(4496)  
< 223> parte de la región codificadora de una proteína utilizadora de quelador de hierro (cg0054)

ES 2 624 926 T3

<400> 27  
accgaacagg ccatcagtgc cctccgcgct gctggctgga cggccccaga tcaatccctg 60  
atcgtcggcg accccatcca caccgcagcc ctctgtggatc aaaacaaaat cggattccaa 120  
tccccaaacc ctgcaaccct ctcccgcaaa gacgcccgaag tgcaagtgcg actcttcgaa 180  
ttcgatctcg ctgcactcgt gcaatagcca acaaggaaac cgtcaaggta gctggcccgg 240  
caactgatac gttaagctca aacaagataa gtaccagttg ctggggtttt tccaagacaa 300  
taaattatga aggtgtgaac aatgccaaag gcaagagtaa ctaaaaacga gaccgcaccg 360  
gtttcaagca acccaagcgc aaaccgcacc ccggttaaga tcaattccgc cggaaaccca 420  
atgtgttaca aggtcatcat gtttgccctc atgatcgtcg gcctagcctg gttgatcatt 480  
aactacctcg tgggccaca gatcccattc atggctgatc ttggtgcatg gaactatggc 540  
atcggcttcg gtctgatgat catcggccta ctcatgacca tgggttggcg ttaatccttc 600  
aaaaaagtga ctgccgcagc acagcgttga ttcgttgtgc tgcggcagtt gttttgtgcg 660  
ggcggatcca gatttagccc ctcatgggca ctctcgtttg gcagttcggg gcaactcaaaa 720  
aggtaaaacc agactagcgt gcccaagaac tgaacttttt gccagccgtg ggcactcctg 780  
ttcggtttga gagccgagaa accagacagc catgcattga agcctaaaaa cgaccgagcc 840  
tattgggatt accattgaag ccagtgtgag ttgcatcaca ttggcttcaa atctgagact 900  
ttaatttgtg gattcacggg ggtgtaatgt agttcataat taacccatt cgggggagca 960  
gatcgtagtg cgaacgattt caggttcgtt ccctgcaaaa actathtagc gcaagtgttg 1020  
gaaatgccc cgtttggggc caatgtccat ttttgaatgt gtctgtatga ttttgcactc 1080  
gctgcgaaat ctttgtttcc ccgctaaagt tgaggacagg ttgacacgga gttgactcga 1140  
cgaattatcc aatgtgagta ggtttgggtc gtgagttgaa aaaattcgcc atactcgccc 1200  
ttgggttctg tcagctcaag aattcttgag tgaccgatgc tctgattgac ctaactgctt 1260  
gacacattgc atttcctaca atcggagagg agacacaaca tggccctggt cgtacagaaa 1320  
tatggcggtt cctcgcctga gagtgcgaa cgcattagaa acgtcgcctga acggatcgtt 1380  
gccaccaaga aggctggaaa tgatgtcgtg gttgtctgct ccgcaatggg agacaccacg 1440  
gatgaacttc tggaacttgc agcggcagtg aatcccgttc cgcagctcg tgaatggat 1500  
atgctcctga ctgctggtga gcgtatttct aacgctctcg tcgcatggc tattgagtcc 1560  
cttggcgcag aagcccaatc tttcacgggc tctcaggctg gtgtgctcac caccgagcgc 1620  
cacggaaacg cacgcattgt tgatgtcact ccaggtcgtg tgcgtgaagc actcgtgag 1680  
ggcaagatct gcattgttgc tggtttccag ggtgtaata aagaaaccg cgatgtcacc 1740

ES 2 624 926 T3

acgttgggtc gtggtggttc tgacaccact gcagttgcgt tggcagctgc tttgaacgct 1800  
 gatgtgtgtg agatttactc ggacgttgac ggtgtgtata ccgctgacct gcgcatcgtt 1860  
 cctaatagcac agaagctgga aaagctcagc ttcgaagaaa tgctggaact tgctgctggt 1920  
 ggctccaaga ttttgggtct gcgcagtggt gaatacgttc gtgcattcaa tgtgccactt 1980  
 cgcgtacgct cgtcttatag taatgatccc ggcactttga ttgccggctc tatggaggat 2040  
 attcctgtgg aagaagcagt ccttaccggt gtgcgaaccg acaagtccga agccaaagta 2100  
 accgttctgg gtatttccga taagccaggc gaggctgcga aggttttccg tgcgttggct 2160  
 gatgcagaaa tcaacattga catggttctg cagaacgtct cttctgtaga agacggcacc 2220  
 accgacatca tcttcacctg ccctcgttcc gacggccgcc gcgcgatgga gatcttgaag 2280  
 aagcttcagg ttcagggcaa ctggaccaat gtgctttacg acgaccaggc cggcaaagtc 2340  
 tccctcgtgg gtgctggcat gaagtctcac ccagggtgta ccgcagagtt catggaagct 2400  
 ctgcgcgatg tcaacgtgaa catcgaattg atttccacct ctgagattcg tatttccgtg 2460  
 ctgatccgtg aagatgatct ggatgctgct gcacgtgcat tgcattgaca gttccagctg 2520  
 ggcggcgaag acgaagccgt cgtttatgca ggcaccggac gctgacgtct agaggagaca 2580  
 caacatgacc accatcgcag ttgttggtgc aaccggccag gtccggccagg ttatgcccac 2640  
 ccttttggaa gagcgcgaatt tcccagctga cactgttctg ttctttgctt ccccacgttc 2700  
 cgcaggccgt aagattgaat tccgtggcac ggaaatcgag gtagaagaca ttactcaggc 2760  
 aaccgaggag tcctcaagg acatcgcagt tgcgttgttc tccgctggag gcaccgcttc 2820  
 caagcagtac gctccactgt tgcgtgctgc aggcgcgact gttgtggata actcttctgc 2880  
 ttggcgaag gacgacgagg ttccactaat cgtctctgag gtgaaccctt ccgacaagga 2940  
 ttccctggtc aagggcatta ttgcgaacct taactgcacc accatggctg cgatgccagt 3000  
 gctgaagcca cttcacgatg ccgctggtct tgtaaagctt cacgtttcct cttaccaggc 3060  
 tgtttccggt tctggtcttg cagggtggtg aaccttgca aagcaggttg ctgcagttgg 3120  
 agaccacaac gttgagttcg tccatgatgg acaggctgct gacgcaggcg atgtcggacc 3180  
 ttatgtttca ccaatcgctt acaacgtgct gccattcgcc ggaaacctcg tcgatgacgg 3240  
 caccttcgaa accgatgaag agcagaagct gcgcaacgaa tcccgcgaaga ttctcggctc 3300  
 cccagacctc aaggtctcag gcacctgcgt ccgcgtgccg gttttcaccg gccacacgct 3360  
 gaccattcac gccgaattcg acaaggcaat caccgtggac caggcgcagg agatcttggg 3420  
 tgccgcttca ggcgtcaagc ttgtcgatgt cccaacccca cttgcagctg ccggcattga 3480  
 cgaatccctc gttggacgca tccgtcagga ctccactgct gacgataacc gcggtctggt 3540  
 tctcgtcgtg tctggcgaca acctccgcaa ggtgctgctg ctaaacacca tccagatcgc 3600  
 tgagctgctg gttaagtaat attccaata gcccggggtg tgctcggcg caccccgggc 3660

ES 2 624 926 T3

```
tattttgata tcacctagga ctgaagacac gacatttggg cacgccagtc tggttcccc 3720
aaaatcagtc cacattcagc tccgaatccc aaaaatcatg ccctcccaga atcgcttcta 3780
agagctcatc agacgccaat caatgcaaac acccattcta aaaactcgac cccttaaate 3840
tccaatgaga ggtcgtcgaa gttttccagc tgtagccctt cagagagcat cttcatgtag 3900
ttttctttgc ggactgcatc gatctgagtg ttggtggtgt tgtatttcca gtaccxaaac 3960
acggccactg catctttttc caatcccacc tgcttgcgga agtgccctgag gatggatttt 4020
atttcatctc gctcgccggc tgcccacacc acgtaagttt ctgggttttc caggatcatat 4080
gcctgttggg caagtggctg aacagttgga tctgatcccg gcgcgagcag gttcagttcc 4140
agtcctgcga tgctgggtag ttcacgcaag gctgcgggat cgtcagtgac aaccatcct 4200
ttgccacgaa gatctgttgg ccattgatcc aaaatagcgg cgagagcggg gatggcggtg 4260
tcatcaagga agagtgtgc ttgttcgcct tcgggatga caaagtgtgg gcggggtccg 4320
gtgagcacga ggggtgctgt gatttttacg gtgtctgacc agcgcacatc ggggctttcg 4380
tgggtggtgt gaaccacatc caccacgatg ctttcagttg cggcatcaaa ggatcggagc 4440
gtgtagacgc ggggtggcgtc gtcgaattct tcgctgaggt aaagcctgat tgccac 4496
```

<210> 28

< 211> 2531

< 212> ADN

5 < 213> Corynebacterium glutamicum

<220>

< 221> misc\_feature

< 222> (1)..(1013)

< 223> zona situada secuencia arriba de la región codificadora de hom

10 <220>

< 221> misc\_feature

< 222> (1012)..(1017)

< 223> zona del sitio de corte de Nsil

15 <220>

< 221> promotor

< 222> (1018)..(1478)

< 223> promotor de Pgap3 como SEQ ID NO 3

20 <220>

< 221> misc\_feature

< 222> (1479)..(1500)

< 223> RBS de gap como SEQ ID NO 17

25 <220>

< 221> misc\_feature

< 222> (1482)..(1487)

< 223> zona del sitio de corte de Nrul

<220>

< 221> gen

< 222> (1501)..(2531)

< 223> región codificadora de hom

ES 2 624 926 T3

<400> 28  
ctgcagtcga ggcttcagag gttttattgc tcgacttcac gtgtgctgac ttcgcgtgct 60  
caacttctca tgaggcgaca tcagtcgaaa agccggcat tgtcgtatga agtctgcgca 120  
cgagaagttg agcgaagaa gtccggtgta agaagtcgac cgcgtgaagt cgcccttag 180  
gagaattctg actaactgga gccaaaactt gatccactcg agagctgtgc agtctctttt 240  
tccttcaatt ctgcctgctc gagctcgtag aagtagaggt ctacttcagt tggttcacct 300  
tgcacacaag catgaagtag tgggtaggtc gagttgtaa atgccgtgta gaaggggagt 360  
agttcgtcag caaaggttaa tttggagtcg ctgtactgcg gttctcggg tggagtattc 420  
ccggaggatt caaгааatct tgacgcatct ttgatgaggt atgtttgaa ttcgtcggca 480  
ccttcctcgc cggagaggta gtaggagttg tcgtaatttg gaaccagat ggcaaatcgt 540  
gcgttttoga ttgcgtccag gagttcctct acgttgatc tcgcaattgt tgcagcggaa 600  
gcgactcggg tgccgatgtc tccgatgca gtgagcgtgg cgtttccgag gggaaactga 660  
tcagaggaat acaccatgga gccgatgtca gaggcgactg cgggcagatc cttttgaagc 720  
tgtttcacaa tttctttgcc cagttcgcgg cggatctgga accacttttg catgcgatcg 780  
tcgtcagagt gttcatgtg aaaaatacac tcaccatctc aatggtcatg gtgaaggcct 840  
gtactggctg cgacagcatg gaactcagtg caatggctgt aaggcctgca ccaacaatga 900  
ttgagcgaag ctccaaaatg tctccccggg gttgatatta gatttcataa atatactaaa 960  
aatcttgaga gtttttccgt tgaaaactaa aaagctggga aggtgaatcg aatgcattga 1020  
agcctaaaaa cgaccgagcc tattgggatt accattgaag ccagtgtgag ttgcatcaca 1080  
ttggctcaa atctgagact ttaatttggt gattcacggg ggtgtaatgt agttcataat 1140  
taaccccatt cgggggagca gatcgtagtg cgaacgattt caggttcgtt ccctgcaaaa 1200  
actathtagc gcaagtgttg gaaatgcccc cgtttggggg caatgtccat ttttgaatgt 1260  
gtctgtatga ttttgcatct gctgcgaaat ctttgtttcc ccgctaaagt tgaggacagg 1320  
ttgacacgga gttgactcga cgaattatcc aatgtgagta ggtttggtgc gtgagttgaa 1380  
aaaattcggc atactcggcc ttgggttctg tcagctcaag aattcttgag tgaccgatgc 1440  
tctgattgac ctaactgctt gacacattgc atttcctaca atcgcgagag gagacacaac 1500  
atgacctcag catctgcccc aagctttaac cccggcaagg gtcccggctc agcagtcgga 1560  
attgcccttt taggattcgg aacagtcggc actgaggtga tgcgtctgat gaccgagtac 1620  
ggtgatgaac ttgcgcaccg cattggtggc ccaactggagg ttcgtggcat tgctgtttct 1680  
gatatctcaa agccacgtga aggcgttgca cctgagctgc tcaactgagga cgcttttgca 1740  
ctcatcgagc gcgaggatgt tgacatcgtc gttgaggtta tcggcggcat tgagtaccca 1800

ES 2 624 926 T3

cgtgaggtag ttctcgcagc tctgaaggcc ggcaagtctg ttgttaccgc caataaggct 1860  
 cttgttgcag ctcaactctgc tgagcttctc gatgcagcgg aagccgcaaa cgttgacctg 1920  
 tacttcgagg ctgctgttgc aggcgcaatt ccagtgggtg gccactgcg tcgctccctg 1980  
 gctggcgatc agatccagtc tgtgatgggc atcgttaacg gcaccaccaa cttcatcttg 2040  
 gacgccatgg attccaccgg cgctgactat gcagattctt tggttgaggc aactcgtttg 2100  
 ggttacgccg aagctgatcc aactgcagac gtcgaaggcc atgacgccgc atccaaggct 2160  
 gcaatthttg catccatcgc tttccacacc cgtgttaccg cggatgatgt gtactgcgaa 2220  
 ggtatcagca acatcagcgc tgccgacatt gaggcagcac agcaggcagg ccacaccatc 2280  
 aagttgttgg ccatctgtga gaagttcacc aacaaggaag gaaagtcggc tatttctgct 2340  
 cgcgtgcacc cgactctatt acctgtgtcc caccactgg cgtcggtaaa caagtccttt 2400  
 aatgcaatct ttgttgaagc agaagcagct ggtcgcctga tgttctacgg aaacggtgca 2460  
 ggtggcgcgc caaccgcgtc tgctgtgctt ggcgacgctg ttggtgccgc acgaaacaag 2520  
 gtgcacggtg g 2531

- 5 <210> 29
- <211> 2722
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
  
- 10 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (2)..(7)
- <223> sitio de corte por restricción de SphI
  
- 15 <220>
- <221> promotor
- <222> (10)..(470)
- <223> promotor Pgap3 como SEQ ID NO 3
  
- 20 <220>
- <221> gen
- <222> (529)..(1695)
- <223> región codificadora de argJ
  
- 25 <220>
- <221> gen
- <222> (1741)..(2694)
- <223> región codificadora de argB
  
- 30 <220>
- <221> gen
- <222> (2695)..(2708)
- <223> parte de la región codificadora de argD
  
- 30 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (2716)..(2721)
- <223> sitio de corte por restricción BlnI

ES 2 624 926 T3

<400> 29  
ggcatgcatt gaagcctaaa aacgaccgag cctattggga ttaccattga agccagtgtg 60  
agttgcatca cattggcttc aaatctgaga ctttaatttg tggattcacg ggggtgtaat 120  
gtagttcata attaacccca ttcgggggag cagatcgtag tgcgaacgat ttcaggttcg 180  
ttcctgcaa aaactattta gcgcaagtgt tggaaatgcc cccgtttggg gtcaatgtcc 240  
atthttgaat gtgtctgtat gattttgcat ctgctgcgaa atctttgttt ccccgctaaa 300  
gttgaggaca ggttgacacg gagttgactc gacgaattat ccaatgtgag taggtttggt 360  
gcgtgagttg aaaaaattcg ccatactcgc ccttgggttc tgtcagctca agaattcttg 420  
agtgaccgat gctctgattg acctaactgc ttgacacatt gcatttccta caatcgactc 480  
cctaaccagc aaacacaaca aacacatcta attcagtagg agttccacat ggcagaaaaa 540  
ggcattaccg gcgcgaaaag cttcgttgct tctgcaacga ccgcgggtat taaagcttct 600  
ggcaatcctg acatggcgtt ggtggttaac caggggccag agttttccgc agcggccgtg 660  
tttacacgta accgagtttt cgcagcgcct gtgaaggtga gccgagagaa cgttgctgat 720  
ggccagatca gggctgtttt gtacaacgct ggtaatgcta atgcgtgtaa tggctctcag 780  
ggtgagaagg atgctcgtga gtctgtttct catctagctc aaaatttggg cttggaggat 840  
tccgatattg gtgtgtgttc cactggctctt attggtgagt tgcttccgat ggataagctc 900  
aatgcaggta ttgatcagct gaccgctgag ggcgcttgg gtgacaatgg tgcagctgct 960  
gccaaaggca tcatgaccac tgacacggtg gataaggaaa ccgtcgtggt tgctgatggt 1020  
tggactgtcg gcggaatggg caagggcgtg ggcatgatgg ccgccgtctct tgccaccatg 1080  
ctggtctgct tgaccactga tgcacccgtt actcaggaaa tggctcagat cgcgctggct 1140  
aatgctacgg ccgttacgtt tgacaccctg gatattgatg gatcaacctc caccaatgac 1200  
accgtgttcc tgctggcacc tggcgctagc ggaatcacc caactcagga tgaactcaac 1260  
gatgcggtgt acgcagcttg ttctgatata gcagcgaagc ttcaggctga tgcagaggg 1320  
gtgaccaagc gcgttgctgt gacagtggg ggaaccacca acaacgagca ggcgattaat 1380  
gcggctcgca ctgttgctcg tgacaatttg ttcaagtgcg caatgtttgg atctgatcca 1440  
aactggggtc gcgtgttgcc tgcagtcggc atggctgatg ctgatatgga accagagaag 1500  
atthctgtgt tcttcaatgg tcaagcagta tgccttgatt ccaactggcg tcctggtgct 1560  
cgtgaggtgg atctttccgg cgctgacatt gatgtccgaa ttgatttggg caccagtggg 1620  
gaaggccagg caacagttcg aaccactgac ctgagcttct cctacgtgga gatcaactcc 1680  
gcgtacagct cttaaaaaga aacagcactc caactaaca gcagggaaaa gggcacaggc 1740  
atgaatgact tgatcaaaga tttaggctct gaggtgcgcg caaatgtcct cgctgaggcg 1800  
ttgccatggt tgcagcactt ccgcgacaag attgttgtcg tgaatatgg cggaaacgcc 1860

ES 2 624 926 T3

atggtggatg atgatctcaa ggctgctttt gctgccgaca tgggtttctt ggcacccgtg 1920  
 ggcgcaaaac cagtgggtgt gcacgggtgt ggacctcaga tttctgagat gctaaaccgt 1980  
 gtgggtctcc agggcgagtt caagggtgtt ttccgtgtga ccaactcctga ggcatggac 2040  
 attgtgcgca tgggtctctt tggtcaggtc ggtcgcgatt tagttggttt gatcaactct 2100  
 catggccctt acgctgtggg aacctccggt gaggatgccg gcctgtttac cgcgcagaag 2160  
 cgcattgtca acatcgatgg cgtaccact gatattggtt tggtcggaga catcattaat 2220  
 gtcgatgcct cttccttgat ggatatcatc gaggccggtc gcattcctgt ggtctctacg 2280  
 attgctccag gcgaagacgg ccagatttac aacattaacg ccgataccgc agcaggtgct 2340  
 ttggctgcag cgattgggtc agaaccctg ctggttctca ccaatgtgga aggtctgtac 2400  
 accgattggc ctgataagag ctcaactggtg tccaagatca aggccaccga gctggaggcc 2460  
 attcttccgg gacttgattc cggcatgatt ccaaagatgg agtcttgctt gaacgcggtg 2520  
 cgtgggggag taagcgtgc tcatgtcatt gacggccgca tcgcgcactc ggtgttgctg 2580  
 gagcttttga ccattgggtg aattggcacg atggtgctgc cggatgtttt tgatcgggag 2640  
 aattatcctg aaggcaccgt ttttagaaaa gacgacaagg atggggaact gtaaatgagc 2700  
 acgctggaat attggcctag ga 2722

<210> 30  
 < 211> 2005  
 5 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (379)..(379)  
 10 < 223> nucleobase guanina (g)

<220>  
 < 221> gen  
 < 222> (501)..(1505)  
 < 223> región codificadora de gap

15 <400> 30  
 gaagaaattt agatgattga agcctaaaaa cgaccgagcc tattgggatt accattgaag 60  
 ccagtgtgag ttgcatcaca ttggcttcaa atctgagact ttaatttgtg gattcacggg 120  
 ggtgtaaatgt agttcataat taacccatt cgggggagca gatcgtagtg cgaacgattt 180  
 caggttcgtt ccctgcaaaa actathtagc gcaagtgttg gaaatgcccc cgtttggggt 240  
 caatgtccat ttttgaatgt gtctgtatga ttttgcactc gctgcgaaat ctttgtttcc 300  
 ccgctaaagt tgaggacagg ttgacacgga gttgactcga cgaattatcc aatgtgagta 360  
 ggtttggtgc gtgagttgga aaaattcgcc atactcgccc ttgggttctg tcagctcaag 420

ES 2 624 926 T3

aattccttgag tgaccgatgc tctgattgac ctaactgott gacacattgc atttcctaca 480  
atccttagag gagacacaac atgaccattc gtgttggtat taacggattt ggccgtatcg 540  
gacgtaactt ctccgcgca gttctggagc gcagcgacga tctcgaggta gttgcagtca 600  
acgacctcac cgacaacaag accctttcca cccttctcaa gttcgactcc atcatgggcc 660  
gccttgcca ggaagttgaa tacgacgatg actccatcac cgttggtggc aagcgcacg 720  
ctgtttacgc agagcgcgat ccaagaacc tggactgggc tgcacacaac gttgacatcg 780  
tgatcgagtc caccggcttc ttcaccgatg caaacgcggc taaggctcac atcgaagcag 840  
gtgccaagaa ggtcatcadc tccgcaccag caagcaacga agacgcaacc ttcgtttacg 900  
gtgtgaacca cgagtccac gatcctgaga accacaacgt gatctccggc gcatcttgca 960  
ccaccaactg cctcgcacca atggcaaaag tcctaaacga caagttcggc atcgagaacg 1020  
gcctcatgac caccgttcac gcatactg gcgaccagcg cctgcacgat gcacctcacc 1080  
gcgacctgcg tcgtgcacgt gcagcagcag tcaacatcgt tcctacctcc accggtgcag 1140  
ctaaggctgt tgctctggtt ctcccagagc tcaaggcaaa gcttgacggc tacgcacttc 1200  
gcgttccagt tatcaccggt tccgcaaccg acctgacct caacaccaag tctgaggtca 1260  
ccggttagtc catcaacgct gcaatcaag aagctgcagt cggcgagttc ggcgagacc 1320  
tggcttactc cgaagagcca ctggtttcca ccgacatcgt ccacgattcc cacggctcca 1380  
tcttcgacgc tggcctgacc aaggtctccg gcaacaccgt caaggttgtt tcctggtacg 1440  
acaacgagtg gggctacacc tgccagctcc tgcgtctgac cgagctcgta gcttccaagc 1500  
tctaattagt tcacatcgt aacgtggcg atcgaatgct acggtgatgt gtcacccaa 1560  
tagccccggg tgtgcctcgg cgcaccccg gctatttgt gtctttaatc aatacaattg 1620  
aataccggtg ccagcgcac acaatgtgtg gcaatctggg acagtgcac acattgcacc 1680  
agaagaattt ttaaaacaat caaatctcca aggagtacgg catggctgtt aagacctca 1740  
aggacttget cgacgaaggc gtagacggac gccacgtcat cgttcgatct gacttcaatg 1800  
ttcccctcaa cgatgaccgc gagatcaccg ataaggccg aatcattgcc tccctaccaa 1860  
ccctaaagc actgagcga ggtggcgca aggtcatcgt catggctcac cttggccgcc 1920  
caaaggcga ggtcaacgag aagtactccc tcgcacctgt cgctgaggca ctctccgatg 1980  
agcttgcca gtacgttgca cttgc 2005

<210> 31  
< 211> 20  
5 < 212> ADN  
< 213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
< 221> misc\_feature  
10 < 222> (1)..(20)  
< 223> cebador Pgap3-1

<400> 31  
cgttggggt caatgccato 20

ES 2 624 926 T3

<210> 32  
 < 211> 18  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

5 <400> 32  
 cccagtcag gttcttg 18

<210> 33  
 < 211> 2005  
 < 212> ADN  
 10 < 213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
 < 221> mutación  
 < 222> (379)..(379)  
 < 223> nucleobase adenina (a)

15 <220>  
 < 221> gen  
 < 222> (501)..(1505)  
 < 223> región codificadora de gap

<400> 33  
 gaagaaatth agatgattga agcctaahaa cgaccgagcc tattgggatt accattgaag 60  
 ccagtgtgag ttgcatcaca ttggcttcaa atctgagact ttaattttgtg gattcacggg 120  
 ggtgtaaatgt agttcataat taacccatt cgggggagca gatcgtagtg cgaacgattt 180  
 caggttcgtt cctcgahaa actatthtagc gcaagtgttg gaaatgcccc cgthttgggt 240  
 caatgtccat thttgaaatgt gtctgtatga thttgcatct gctgcgaaat cthttgtthcc 300  
 ccgctaaagt tgaggacagg ttgacacgga gttgactoga cgaattatcc aatgtgagta 360  
 ggtthtggtgc gtgagttgaa aaaattcggc atactcggcc ttgggtthctg tcagctcaag 420  
 aattcttgag tgaccgatgc tctgattgac ctaactgctt gacacattgc atthcctaca 480  
 atctthtagag gagacacaac atgaccattc gtgttggtat taacggattt ggccgtatcg 540  
 gacgtaactt cthccgcgca gthctggagc gcagcgacga tctcgaggta gthtgagtca 600  
 acgacctcac cgacaacaag accctthcca cctthctcaa gthcgactcc atcatgggcc 660  
 gccttgcca ggaagttgaa tacgacgatg actccatcac cgttggtggc aagcgatcg 720  
 ctgthtacgc agagcgcgat ccaahaacc tggactgggc tgacacaaac gthgacatcg 780  
 tgatcgagtc caccggcttc thcaccgatg caaacgggc taaggctcac atcgaagcag 840  
 20 gtgccaagaa ggtcatcatc tccgaccag caagcaacga agacgcaacc thcgthtacg 900

ES 2 624 926 T3

gtgtgaacca cgagtcttac gatcctgaga accacaacgt gatctccggc gcatcttgca 960  
ccaccaactg cctcgcacca atggcaaagg tcctaaacga caagttcggc atcgagaacg 1020  
gcctcatgac caccgttcac gcatacactg gcgaccagcg cctgcacgat gcacctcacc 1080  
gcgacctgcg tcgtgcacgt gcagcagcag tcaacatcgt tcctacctcc accggtgcag 1140  
ctaaggctgt tgctctggtt ctcccagagc tcaagggcaa gcttgacggc tacgcacttc 1200  
gcgttccagt tatcacgggt tccgcaaccg acctgacctt caacaccaag tctgaggcca 1260  
ccggtgagtc catcaacgct gcaatcaagg aagctgcagt cggcgagttc ggcgagacct 1320  
tggcttactc cgaagagcca ctggtttcca cgcacatcgt ccacgattcc caccggtcca 1380  
tcttcgacgc tggcctgacc aaggctctccg gcaacaccgt caaggttgtt tcctggtacg 1440  
acaacgagtg gggctacacc tgccagctcc tgcgtctgac cgagctcgta gcttccaagc 1500  
tctaattagt tcacatcgtt aacgtggcg atcgatgctc acggtgatgt gtcacccaa 1560  
tagcccgggg tgtgcctcgg cgcaccccg gctattttgt gtctttaatc aatacaattg 1620  
aataccggtg ccagcgcac acaatgtgtg gcaatctggg acagtgcac acattgcacc 1680  
agaagaattt tttaaacaat caaatctcca aggagtaagg catggctgtt aagaccctca 1740  
aggacttgct cgacgaaggc gtagacggac gccacgcat cgttcgatct gacttcaatg 1800  
ttcccctcaa cgatgaccgc gagatcaccg ataagggccg aatcattgcc tccctaccaa 1860  
cccttaaagc actgagcgaa ggtggcgcaa aggtcatcgt catggctcac cttggccgcc 1920  
caaagggcga ggtcaacgag aagtactccc tcgcacctgt cgctgaggca ctctccgatg 1980  
agcttgcca gtacgttgca cttgc 2005

<210> 34  
< 211> 461  
5 < 212> ADN  
< 213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
< 221> promotor  
10 < 222> (1)..(461)  
< 223> promotor Pg3N3

<220>  
< 221> mutación  
< 222> (265)..(265)  
< 223> nucleobase timina (t)

15 <220>  
< 221> mutación  
< 222> (269).. (269)  
< 223> nucleobase citosina (c)

20 <220>  
< 221> mutación  
< 222> (290)..(290)  
< 223> nucleobase timina (t)

<220>  
< 221> mutación

ES 2 624 926 T3

< 222> (292)..(292)  
 < 223> nucleobase adenina (a)

<220>  
 < 221> mutación  
 < 222> (362)..(362)  
 < 223> nucleobase adenina (a)

5

<400> 34  
 tgaagcctaa aaacgaccga gcctattggg attaccattg aagccagtgt gagttgcatc 60  
 acattggcctt caaatctgag actttaattt gtggattcac gggggtgtaa tgtagttcat 120  
 aattaacccc attcggggga gcagatcgta gtgcgaacga tttcaggttc gttccctgca 180  
 aaaactattt agcgcaagtg ttggaaatgc ccccgtttgg ggtcaatgtc catttttgaa 240  
 tgtgtctgta tgattttgca tctgttgcca aatcctttgt tccccgctat aattgaggac 300  
 aggttgacac ggagttgact cgacgaatta tccaatgtga gtaggtttgg tgcgtgagtt 360  
 gaaaaaattc gccatactcg ccottgggtt ctgtcagctc aagaattctt gagtgaccga 420  
 tgctctgatt gacctaactg cttgacacat tgcatttct a 461

<210> 35  
 < 211> 1660  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

10

<400> 35  
 gccaatgog tggcaatcag gctttacctc agcgaagaat tcgacgacgc caccgcgctc 60  
 tacaccgtcc gatcctttga tgccgcaact gaaagcatcg tgggtgatgt ggttcaacac 120  
 caccacgaaa gccccatgat gcgctggtca gacaccgtaa aaatcaacga caccctcgtg 180  
 ctcaccggac cccgccaca ctttgtcatc cccgaaggcg aacaagcagc actcttcctt 240  
 gatgacaccg ccattccccg tctcgcgctc attttggatc aatggccaac agatcttcgt 300  
 ggcaaaggat gggttgtcac tgacgatccc gcagccttcg atgaactacc cagcatcgac 360  
 ggactggaac tgaacctgct cgcgccggga tcagatccaa ctgttcagcc acttgcccaa 420  
 caggcatatg acctggaaaa ccagaaaact tacgtggtgt gggcagccgg cgagcgagat 480  
 gaaataaaaat ccatccgcag gcacttccgc aagcaggtgg gattggaaaa agatgcagtg 540  
 gccgtgtttg ggtactggaa atacaacacc accaacactc agatcgatgc agtccgcaaa 600  
 gaaaactaca tgaagatgct ctctgaaggg ctacagctgg aaaacttcga cgacctctca 660  
 ttggagattt aaggggtcga gtttttagaa tgggtgtttg cattgattgg cgtctgatga 720  
 gctcttagaa gcgattctgg gagggcatga tttttgggat tcggagctga atgtggactg 780  
 attttggggg aaccagactg gcgtgccc aaatgtcgtgtc ttcagtccta ggcgatgcat 840

ES 2 624 926 T3

```

gcctgtctgg tttctgggct ctcaaaccga acaggagtgc ccacggctgg caaaaagttc      900
agttcttggg cacgctagtc tggttttacc tttttgagtg ccccgaaactg ccaaacgaga      960
gtgcccatga ggggctaaat ctggatccgc ccgcacaaaa caactgccgc agcacaacga      1020
atcaacgctg tgctgcggca gtcacttttt tgaaggatta acgccaacc atggtcatga      1080
gtaggccgat gatcatcaga ccgaagccga tgccatagtt ccatgcacca agatcagcca      1140
tgaatgggat ctgtggggcc acgaggtagt taatgatcaa ccaggctagg ccgacgatca      1200
tgaaggcaaa catgatgacc ttgtaccaca ttggggttcc ggcggaattg atcttaaccg      1260
gggtgcggtt tgcgcttggg ttgcttgaaa ccggtgcggt ctcgttttta gttactcttg      1320
cctttggcat tgttcacacc ttcataatth attgtcttgg aaaaaccca gcaactggta      1380
cttatcttgt ttgagcttaa cgtatcagtt gccgggccag ctaccttgac ggtttccttg      1440
ttggctattg cacgagtgca gcgagatcga attcgaagag tcgcacttgc acttgggcgt      1500
ctttgcggaa gagggttgca ggggttgggg attggaatcc gattttgttt tgatccacga      1560
gggctgcggt gtggatgggg tcgccgacga tcagggattg atctggggcg gtcagccag      1620
cagcgcggag ggcactgatg gcctgttcgg tgaagcttgc      1660

```

- <210> 36
- < 211> 2872
- 5 < 212> ADN
- < 213> Corynebacterium glutamicum
  
- <220>
- < 221> misc\_feature
- < 222> (3)..(8)
- 10 < 223> sitio de restricción Nsil
  
- <220>
- < 221> promotor
- < 222> (9) .. (469)
- < 223> promotor de gap según SEQ ID NO. 2
  
- 15 <220>
- < 221> RBS
- < 222> (470)..(490)
- < 223> RBS de gap según SEQ ID No. 16
  
- <220>
- 20 < 221> gen
- < 222> (491)..(1756)
- < 223> secuencia codificadora de lysC
  
- <220>
- 25 < 221> RBS
- < 222> (1754)..(1775)
- < 223> RBS de gap según SEQ ID No. 26
  
- <220>
- < 221> gen
- < 222> (1776)..(2810)
- 30 < 223> secuencia codificadora de asd

ES 2 624 926 T3

<220>  
 < 221> terminador  
 < 222> (2814)..(2858)  
 < 223> terminador de gap

5 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (2865)..(2870)  
 < 223> sitio de restricción de AvriI

<400> 36  
 cgatgcattg aagcctaaaa acgaccgagc ctattgggat taccattgaa gccagtgatga 60  
 gttgcatcac attggcttca aatctgagac tttaatttgt ggattcacgg ggggtgtaatg 120  
 tagttcataa ttaaccccat tcgggggagc agatcgtagt gcgaacgatt tcaggttcgt 180  
 tcctgcaaa aactatthag cgcaagtgtt ggaaatgcc ccgtttggg tcaatgtcca 240  
 tttttgaaatg tgtctgatg attttgcac tgctgcgaaa tctttgtttc cccgctaaag 300  
 ttgaggacag gttgacacgg agttgactcg acgaattatc caatgtgagt aggtttggtg 360  
 cgtgagttgg aaaaattcgc catactcgcc cttgggttct gtcagctcaa gaattcttga 420  
 gtgaccgatg ctctgattga cctaactgct tgacacattg catttcctac aatcggagag 480  
 gagacacaac atggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga 540  
 acgcattaga aacgtcgtg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt 600  
 ggttgctctgc tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctggaacttg cagcggcagt 660  
 gaatcccgtt ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc 720  
 taacgctctc gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg 780  
 ctctcaggct ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac 840  
 tccaggtcgt gtgcgtgaag cactcgtatg gggcaagatc tgcatgttg ctggtttcca 900  
 ggggtgtaat aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggtt ctgacaccac 960  
 tgcagttgog ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga 1020  
 cgggtgtgat accgctgacc cgcgcacgtt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag 1080  
 cttcgaagaa atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtc tgcgcagtgt 1140  
 tgaatacgtc cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc 1200  
 cggcactttg attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg 1260  
 tgtcgcaacc gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg 1320  
 cgaggtcgg aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct 1380  
 gcagaacgtc tcttctgtag aagacggcac caccgacatc atcttcacct gccctcgttc 1440  
 10 cgacggccgc cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa 1500

ES 2 624 926 T3

tgtgctttac gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca 1560  
cccagtggt accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt 1620  
gatttccacc tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc 1680  
tgcacgtgca ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc 1740  
aggcaccgga cgctgacgtc tagaggagac acaacatgac caccatcgca gttggttggtg 1800  
caaccggcca ggtcggccag gttatgcgca cccttttggga agagcgcaat ttcccagctg 1860  
aactgttgc tttctttgct tccccacgtt ccgcagggcg taagattgaa ttccgtggca 1920  
cggaaatcga ggtagaagac attactcagg caaccgagga gtccctcaag gacatcgacg 1980  
ttgctgtgtt ctccgctgga ggcaccgctt ccaagcagta cgctccactg ttcgctgctg 2040  
caggcgcgac tgtgtggat aactcttctg cttggcgcaa ggacgacgag gttccactaa 2100  
tcgtctctga ggtgaaccct tccgacaagg attccctggt caagggcatt attgcgaacc 2160  
ctaactgcac caccatggct gcgatgccag tgctgaagcc acttcacgat gccgctggtc 2220  
ttgtaaagct tcacgtttcc tcttaccagg ctgtttccgg ttctggtctt gcaggtgtgg 2280  
aaaccttggc aaagcagggt gctgcagttg gagaccacaa cgttgagttc gtccatgatg 2340  
gacaggctgc tgacgcaggc gatgtcggac cttatgtttc accaatcgct tacaacgtgc 2400  
tgccattcgc cggaaacctc gtogatgacg gcaccttoga aaccgatgaa gagcagaagc 2460  
tgcgcaacga atcccgaag attctcggtc tcccagacct caaggtctca ggcacctgcg 2520  
tccgcgtgcc ggttttcacc ggccacacgc tgaccattca cgccgaattc gacaaggcaa 2580  
tcaccgtgga ccaggcgcag gagatcttgg gtgccgcttc aggcgtcaag cttgtcgatg 2640  
tcccacccc acttgcaget gccggcattg acgaatccct cgttggacgc atccgtcagg 2700  
actccactgt cgacgataac cgcggctctg ttctcgtcgt atctggcgac aacctccgca 2760  
aggggtgctgc gctaaacacc atccagatcg ctgagctgct ggttaagtaa tattcccaat 2820  
agcccggggt gtgcctcggc gcaccccggg ctattttgat atcacctagg cg 2872

<210> 37  
< 211> 2872  
5 < 212> ADN  
< 213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
< 221> misc\_feature  
< 222> (3)..(8)  
10 < 223> sitio de restricción de Nsil

<220>  
< 221> promotor  
< 222> (9) .. (469)  
< 223> promotor de gap según SEQ ID NO. 3

15 <220>  
< 221> RBS  
< 222> (470)..(490)  
< 223> RBS de gap según SEQ ID No. 16

# ES 2 624 926 T3

```

<220>
< 221> gen
< 222> (491)..(1756)
< 223> secuencia codificadora de lysC

5 <220>
< 221> RBS
< 222> (1754)..(1775)
< 223> RBS de gap según SEQ ID No. 26

10 <220>
< 221> gen
< 222> (1776)..(2810)
< 223> secuencia codificadora de asd

<220>
15 < 221> terminador
< 222> (2814)..(2858)
< 223> terminador de gap

<220>
20 < 221> misc_feature
< 222> (2865)..(2870)
< 223> sitio de restricción de AvrII

<400> 37
cgatgcattg aagcctaaaa acgaccgagc ctattgggat taccattgaa gccagtgatga 60
gttgcattcac attggccttca aatctgagac ttttaatttgt ggattcacgg ggggtgtaatg 120
tagttcataa ttaaccccat tcgggggagc agatcgtagt gcgaacgatt tcaggttcgt 180
tccctgcaaa aactatthag cgcaagtgtt ggaaatgcc ccgtttggg tcaatgtcca 240
tttttgaatg tgtctgatg attttgcac tgctgcgaaa tctttgtttc cccgctaaag 300
ttgaggacag gttgacacgg agttgactcg acgaattatc caatgtgagt aggtttgggtg 360
cgtgagttga aaaaattcgc cactactcgc cttgggttct gtcagctcaa gaattcttga 420
gtgaccgatg ctctgattga cctaactgct tgacacattg catttcctac aatcggagag 480
gagacacaac atggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgtctg agagtgcgga 540
acgcattaga aacgtcgtg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt 600
ggttgtctgc tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctggaacttg cagcggcagt 660
gaatcccgtt ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggtg agcgtatttc 720
taacgctctc gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg 780
ctctcaggct ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac 840
tccaggctgt gtgcgtgaag cactcgtatg gggcaagatc tgcatgtttg ctggtttcca 900
gggtgttaat aaagaaacct gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggtt ctgacaccac 960

```

ES 2 624 926 T3

```

tgcagttgcg ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatctact cggacgttga      1020
cgggtgtgat accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag      1080
cttcgaagaa atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt      1140
tgaatacgcct cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc      1200
cggcactttg attgccgct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg      1260
tgtcgcaacc gacaagtcgg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg      1320
cgaggctgcg aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct      1380
gcagaacgct tcttctgtag aagacggcac caccgacatc atcttcacct gccctcgttc      1440
cgacggccgc cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa      1500
tgtgctttac gacgaccagc tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca      1560
cccaggtgtt accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt      1620
gatttccacc tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc      1680
tgcacgtgca ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc      1740
aggcaccgga cgtgacgct tagaggagac acaacatgac caccatcgca gttggtggtg      1800
caaccggcca ggtcggccag gttatgcgca cccttttggg agagcgcaat ttcccagctg      1860
acactgttcg tttctttgct tccccacgct cgcgagccg taagattgaa ttccgtggca      1920
cggaaatcga ggtagaagac attactcagg caaccgagga gtccctcaag gacatcgagc      1980
ttgcgttgtt ctccgctgga ggcaccgctt ccaagcagta cgctccactg ttcgctgctg      2040
caggcgcgac tgttgtggat aactcttctg cttggcgcaa ggacgacgag gttccactaa      2100
tcgtctctga ggtgaacctc tccgacaagg attccctggt caagggcatt attgcgaacc      2160
ctaactgca caccatgget gcgatgccag tgctgaagcc acttcacgat gccgctggtc      2220
ttgtaaagct tcacgtttcc tcttaccagg ctgtttccgg ttctggtctt gcaggtgtgg      2280
aaaccttggc aaagcaggtt gctgcagttg gagaccacaa cgttgagttc gtccatgatg      2340
gacaggtctg tgacgcaggc gatgtcggac cttatgtttc accaatcgct tacaacgtgc      2400
tgccattcgc cggaaacctc gtcgatgacg gcaccttcga aaccgatgaa gagcagaagc      2460
tgcgcaacga atcccgcaag attctcggtc tcccagacct caaggtctca ggcacctgcg      2520
tccgcgtgcc ggttttcacc ggccacacgc tgaccattca cccgaattc gacaaggcaa      2580
tcaccgtgga ccaggcgag gagatcttgg gtgccgcttc aggcgtcaag cttgtcgatg      2640
tcccacccc acttgcagct gccggcattg acgaatccct cgttggacgc atccgtcagg      2700
actccactgt cgacgataac cgcggtctgg ttctcgtcgt atctggcgac aacctccgca      2760
aggggtgctg gctaaacacc atccagatcg ctgagctgct ggttaagtaa tattccaat      2820
agcccggggt gtgcctcggc gcaccccggg ctattttgat atcacctagg cg      2872

```

5 <210> 38  
 <211> 2872  
 <212> ADN  
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
 <221> misc\_feature

# ES 2 624 926 T3

< 222> (3)..(8)  
 < 223> sitio de restricción de Nsil

<220>  
 < 221> promotor  
 5 < 222> (9) .. (469)  
 < 223> promotor de gap según SEQ ID NO. 34

<220>  
 < 221> RBS  
 < 222> (470)..(490)  
 10 < 223> RBS de gap según SEQ ID No. 16

<220>  
 < 221> gen  
 < 222> (491)..(1756)  
 < 223> secuencia codificadora de lysC

15 <220>  
 < 221> RBS  
 < 222> (1754)..(1775)  
 < 223> RBS de gap según SEQ ID No. 26

20 <220>  
 < 221> gen  
 < 222> (1776)..(2810)  
 < 223> secuencia codificadora de asd

25 <220>  
 < 221> terminador  
 < 222> (2814)..(2858)  
 < 223> terminador de gap

30 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (2865)..(2870)  
 < 223> sitio de restricción de AvrII

<400> 38  
 c gatgcattg aagcctaaaa acgaccgagc ctattgggat taccattgaa gccagtgatga 60  
 gttgcatcac attggcttca aatctgagac tttaatttgt ggattcacgg ggggtgtaatg 120  
 tagttcataa ttaaccccat tcgggggagc agatcgtagt gcgaacgatt tcaggttcgt 180  
 tcctgcaaa aactatttag cgcaagtgtt ggaaatgcc ccgtttgggg tcaatgtcca 240  
 tttttgaaatg tgtctgtatg attttgcac tgttgcaaaa tctttgtttc cccgctataa 300  
 ttgaggacag gttgacacgg agttgactcg acgaattatc caatgtgagt aggtttgggtg 360  
 cgtgagttga aaaaattcgc cataactcgc cttgggttct gtcagctcaa gaattcttga 420

ES 2 624 926 T3

gtgaccgatg ctctgattga cctaactgct tgacacattg cattedctac aatcggagag 480  
 gagacacaac atggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga 540  
 acgcattaga aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt 600  
 ggttgtctgc tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctggaacttg cagcggcagt 660  
 gaatcccgtt ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctgggtg agcgtatttc 720  
 taacgctctc gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg 780  
 ctctcaggct ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac 840  
 tccaggtcgt gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcatgttg ctggtttcca 900  
 ggggtttaat aaagaaaccc gcgatgtcac caogttgggt cgtgggtggt ctgacaccac 960  
 tgcagttgcy ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga 1020  
 cgggtgtgat accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatagca cagaagctgg aaaagctcag 1080  
 cttcgaagaa atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtc tgcgcagtgt 1140  
 tgaatacgcct cgtgcattca atgtgccact tocgctacgc tcgtcttata gtaatgatcc 1200  
 cggcactttg attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg 1260  
 tgtcgcgaacc gacaagtcgg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg 1320  
 cgaggctgcy aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct 1380  
 gcagaacgct tcttctgtag aagacggcac caccgacatc atcttcacct gccctcgttc 1440  
 cgacggccgc cgcgcatgag agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa 1500  
 tgtgctttac gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca 1560  
 cccaggtggt accgcagagt tcatggaagc tctgcccgat gtcaacgtga acatcgaatt 1620  
 gatttccacc tetgagatte gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc 1680  
 tgcacgtgca ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc 1740  
 aggcaccgga cgtgacgtc tagaggagac acaacatgac caccatcgca gttggtggtg 1800  
 caaccggcca ggtcggccag gttatgagca cccttttggga agagcgcaat ttcccagctg 1860  
 aactgttcg tttctttgct tccccacggt ccgcagggcg taagattgaa ttccgtggca 1920  
 cggaaatcga ggtagaagac attactcagg caaccgagga gtcctcaag gacatcgagc 1980  
 ttgctgtggt ctccgctgga ggcaccgctt ccaagcagta cgctccactg ttcgctgctg 2040  
 caggcgcgac tgttgtggat aactcttctg cttggcgcaa ggacgacgag gttccactaa 2100  
 tcgtctctga ggtgaaccct tccgacaagg attccctggt caagggcatt attgcgaacc 2160  
 ctaactgcac caccatggct gcgatgccag tgctgaagcc acttcacgat gccgctggtc 2220  
 ttgtaaagct tcacgtttcc tcttaccagg ctgtttccgg ttctggtctt gcaggtgtgg 2280

ES 2 624 926 T3

aaaccttggc aaagcagggtt gctgcagttg gagaccacaa cgttgagttc gtccatgatg 2340  
gacagggtgc tgacgcaggc gatgtcggac cttatgtttc accaatcgct tacaacgtgc 2400  
tgccattcgc cggaaacctc gtcgatgacg gcaccttcga aaccgatgaa gagcagaagc 2460  
tgcgcaacga atcccgaag attctcggtc tcccagacct caaggtctca ggcacctgcg 2520  
tccgcgtgcc ggttttcacc ggccacacgc tgaccattca cgccgaattc gacaaggcaa 2580  
tcaccgtgga ccaggcgcag gagatcttgg gtgccgcttc aggcgtcaag cttgtcgatg 2640  
tcccaacccc acttgcagct gccggcattg acgaatccct cgttggacgc atccgtcagg 2700  
actccactgt cgacgataac cgcggctctgg ttctcgtcgt atctggcgac aacctccgca 2760  
aggggtgctgc gctaaacacc atccagatcg ctgagctgct ggtaagtaa tattcccaat 2820  
agcccggggg gtgcctcggc gcaccccggg ctattttgat atcacctagg cg 2872

<210> 39  
<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> cebador cg0054\_9.p

10 <400> 39  
ccacccatca cctcacttc 20

<210> 40  
<211> 20  
<212> ADN  
15 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> cebador cg0054\_10.p

20 <400> 40  
gcactctcgt ttggcagttc 20

<210> 41  
<211> 20  
<212> ADN  
25 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(20)  
<223> cebador QlysC\_WT\_P2

30 <400> 41  
aagtgccggg atcattacta 20

<210> 42  
<211> 2549  
<212> ADN  
35 <213> Corynebacterium glutamicum

ES 2 624 926 T3

<220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (2)..(7)  
 < 223> sitio de corte de BamHI

5 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (2543)..(2548)  
 < 223> sitio de corte de XbaI

<400> 42  
 gggatcccgc tgcagtcgag gcttcagagg ttttattgct cgacttcacg tgtgctgact 60  
 tcgctgctc aacttctcat gaggcgacat cagtcgaaaa gccggtcatt gtcgtatgaa 120  
 gtctgcgcac gagaagttga gcggaagaag tcggtgttaa gaagtcgacc gcgtgaagtc 180  
 gcccttagg agaattctga ctaactggag ccaaaacttg atccactcga gagctgtgca 240  
 gtctcttttt ccttcaattc tgctgctcg agctcgtaga agtagaggtc tacttcagtt 300  
 ggttcacctt gcacacaagc atgaagtagt gggtaggtcg agttgttaa tgcggtgtag 360  
 aaggggagta gttcgctagc aaaggtaaat ttggagtcgc tgtactgcgg gttctcgggt 420  
 ggagtattcc cggaggattc aagaaatctt gacgcatctt tgatgaggta tgtttggaat 480  
 tcgctcggc cttcctcgcc ggagaggtag taggagttgt cgtaatttg aaccagatg 540  
 gcaaatcgtg cgttttcgat tgcgtccagg agttcctcta cgttgatct cgcacttgtt 600  
 gcagcggag cgactcgggt gccgatgtct ccgatgcag tgagcgtggc gtttccgagg 660  
 ggaacttgat cagaggaata caccatggag ccgatgtcag aggcgactgc gggcagatcc 720  
 ttttgaagct gtttcacaat ttctttgccc agttcgggc ggatctggaa ccacttttgc 780  
 atgcatcgt cgtcagagtg gttcatgtga aaaatacact caccatctca atggcatgg 840  
 tgaagcctg tactggctgc gacagcatgg aactcagtc aatggctgta aggcctgcac 900  
 caacaatgat tgagcgaag tccaaaatgt cctccccggg ttgatattag atttcataaa 960  
 tatactaaaa atcttgagag tttttccgtt gaaaactaaa aagctgggaa ggtgaatcga 1020  
 atgcattgaa gcctaaaaac gaccgagcct attgggatta ccattgaagc cagtgtgagt 1080  
 tgcacacat tggttcaaa tctgagactt taatttggg attcacgggg gtgtaatgta 1140  
 gttcataatt aacccattc gggggagcag atcgtagtgc gaacgatttc aggttcgttc 1200  
 cctgcaaaaa ctatttagcg caagtgttg aaatgcccc gtttggggtc aatgtccatt 1260  
 10 tttgaatgtg tctgtatgat tttgcatctg ctgcgaaatc tttgtttccc cgctaaagtt 1320

ES 2 624 926 T3

gaggacaggt tgacacggag ttgactcgac gaattatcca atgtgagtag gtttgggtgcg 1380  
 tgagttgaaa aaattcgcca tactcgccct tgggttctgt cagctcaaga attcttgagt 1440  
 gaccgatgct ctgattgacc taactgcttg acacattgca tttcctacaa tcgcgagagg 1500  
 agacacaaca tgacctcagc atctgcccc a gctttaacc cgggcaaggg tcccggctca 1560  
 gcagtcggaa ttgccctttt aggattcggg acagtcggca ctgaggatgat gcgtctgatg 1620  
 accgagtaog gtgatgaact tgccgaccgc attggtggcc cactggagggt tctgtgcatt 1680  
 gctgtttctg atatctcaaa gccacgtgaa ggcgttgac ctgagctgct cactgaggac 1740  
 gcttttgac tcacogagcg cgaggatggt gacatcgctg ttgaggttat cggcggcatt 1800  
 gagtaccac gtgaggtagt tctcgcagct ctgaaggccg gcaagtctgt tgttaccgcc 1860  
 aataaggctc ttgttgacg tcactctgct gagcttgctg atgcagcggg agccgcaaac 1920  
 gttgacctgt acttcgaggg tgctgttgca ggcgcaattc cagtggttgg cccactgcgt 1980  
 cgctccctgg ctggcgatca gatccagtct gtgatgggca tcgttaacgg caccaccaac 2040  
 ttcactctgg acgccatgga ttccaccggc gctgactatg cagattcttt ggctgaggca 2100  
 actcgtttgg gttacgccga agctgatcca actgcagacg tcgaaggcca tgacgccgca 2160  
 tccaaggctg caattttggc atccatcgct ttccacaccc gtgttaccgc ggatgatgtg 2220  
 tactgcgaag gtatcagcaa catcagcgt gccgacattg aggcagcaca gcaggcaggc 2280  
 cacaccatca agttgttggc catctgtgag aagttcacca acaaggaagg aaagtccgct 2340  
 atttctgctc gcgtgcaccc gactctatta cctgtgtccc acccactggc gtcggtaaac 2400  
 aagtccttta atgcaatctt tgttgaagca gaagcagctg gtcgcctgat gttctacgga 2460  
 aacgggtcag gtggcgcgcc aaccgcgtct gctgtgcttg gcgacgtcgt tgggtgccga 2520  
 cgaaacaagg tgcacgggtg gctctagag 2549

<210> 43  
 <211> 2442  
 5 <212> ADN  
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(7)  
 10 <223> sitio de corte de BamHI

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2436)..(2441)  
 <223> sitio de corte de XbaI

15 <400> 43  
 gggatcccgc ctggttgctg atcgtatcgt tcagttcgcc aagcttggtg gccctgagaa 60

ES 2 624 926 T3

cgtcattgcg tccactgact gtggctctggg cggacgtctg cattcccaga tgcgatgggc 120  
 aaagctggag tocctagtag agggcgctcg cattgcatca aaggaactgt tctaagctag 180  
 acaacgaggg ttgctagtct aagcagcaaa atgagcggct gttgttcctt caggaaaatt 240  
 atctgaagga acaatagccg etcattttat gtcagtgtgc ttttaagcgt cgacgttgat 300  
 gccaaaactgg gtgagcatgt cacgcagagt ctgcttgaac gatgggtcga cggtcaccat 360  
 gaaggatgct gcggtggaag caagagtggg gattgcgagc aatccctgca gtaccgcaaa 420  
 aggaatggca agccattctg gtggggagac aatggaacca atcactggca ttcggacaa 480  
 ccgatcgatc agtgcttgct gctcttcgct gatttcacg tcatcatcgc tgggtcttt 540  
 gccggaggag ctcaagcttg gggccgagc aatgtcgcca ttgctgagca ttgagctgcc 600  
 ttcagagctg cctggccagg tttcgtttcc atcgactgga tttccatcat catcaaggat 660  
 ctgtgatgag gtgatgttgt ctgagagctg tgtcagtgcg tcagaggact gagcctgggc 720  
 aactggagtg aacacggaca atgccacagc gcttgctgta acaagggca aagtacttcg 780  
 acgcaaagac aaaacttttc tcctggcaat aaatatcgcg atttactatg gaaacaagat 840  
 agaagattgg atagcgaag ctatcctcaa ctcgtagaaa gtgtagtgcc acaaccacag 900  
 tattggctag aaaacaatct atagcattgt totacaaaga gctatgcatt gaagcctaaa 960  
 aacgaccgag cctattggga ttaccattga agccagtgtg agttgcatca cattggcttc 1020  
 aaatctgaga ctttaatttg tggattcacg ggggtgtaat gtagttcata attaacccca 1080  
 ttcgggggag cagatcgtag tgcgaacgat ttcaggttcg ttccctgcaa aaactatta 1140  
 gcgcaagtgt tggaaatgcc cccgtttggg gtcaatgtcc atttttgaat gtgtctgtat 1200  
 gattttgcat ctgctgcgaa atccttgctt ccccgctaaa gttgaggaca ggttgacacg 1260  
 gagttgactc gacgaattat ccaatgtgag taggtttggg gcgtgagttg aaaaaattcg 1320  
 ccatactcgc ccttgggttc tgtcagctca agaattcttg agtgaccgat gctctgattg 1380  
 acctaactgc ttgacacatt gcatttccta caatcgcgat ttagaggaga cacaacatga 1440  
 gtgaaacata cgtgtctgag aaaagtccag gagtgatggc tagcggagcg gagctgattc 1500  
 gtgccgccga cattcaaacg gcgcaggcac gaatttcctc cgtcattgca ccaactccat 1560  
 tgcagtattg ccctcgtctt tctgaggaaa ccggagcggg aatctacctt aagcgtgagg 1620  
 atctgcagga tgttcgttcc tacaagatcc gcggtgcgct gaactctgga gcgcagctca 1680  
 cccaagagca gcgcgatgca ggtatcgttg ccgcactcgc aggtaacat gccagggcg 1740  
 tggcctatgt gtgcaagtcc ttgggcgttc agggacgcat ctatgttcct gtgcagactc 1800  
 caaagcaaaa gcgtgaccgc atcatggttc acggcggaga gtttgtctcc ttggtggtca 1860  
 ctggcaataa cttcgacgaa gcateggctg cagcgcagta agatgcagag cgcaccggcg 1920  
 caacgctgat cgagcctttc gatgctcgca acaccgtcat cggtcagggc accgtggctg 1980

ES 2 624 926 T3

ctgagatcct gtgcgagctg acttccatgg gcaagagtgc agatcacgtg atggttccag 2040  
 tcggcgggtgg cggacttctt gcaggtgtgg tcagctacat ggctgatatg gcacctcgca 2100  
 ctgcgatcgt tggatcga cagcgggag cagcatccat gcaggctgca ttgcacaatg 2160  
 gtggaccaat cactttggag actggtgatc cctttgtgga cggcgcagca gtcaaactgtg 2220  
 tcggagatct caactacacc atcgtggaga agaaccaggg tcgcgtgcac atgatgagcg 2280  
 cgaccgaggg cgctgtgtgt actgagatgc tcgatcttta ccaaacgaa ggcatcatcg 2340  
 cggagcctgc tggcgcgctg tctatcgctg ggttgaagga aatgtccttt gcacctggtt 2400  
 ctgctgtggt gtgcatcatc tctggtggca acagctctag ag 2442

<210> 44  
 < 211> 2072  
 < 212> ADN  
 5 < 213> Corynebacterium glutamicum

<220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (2)..(7)  
 < 223> sitio de corte de HindIII

10 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (2066)..(2071)  
 < 223> sitio de corte de BamHI

<400> 44  
 caagcttcac catccggcca tatcaaggtt gaccgcgtct cccgcaccaa catccccggt 60  
 gtgtacgcag caggtgactg tactgaccta ttcccactgg cgtccggtgc agcgatgcag 120  
 ggccgatcog ccatgtatca cgcactcggg gaagggctga gccccatccg tttgaagact 180  
 gttgccacog cagtgtttac ccgcccagag atcgcagcag taggtatcac ccatgcacaa 240  
 gttgattcog gcgaagtgtc tgctcgcgtg attgtgcttc ctttggctac taaccacgc 300  
 gccaaagatgc gttccctgcg ccacggtttt gtgaagctgt tctgccgccc taactctggc 360  
 ctgatcatog gtggtgtcgt ggtggcaccg accgcgtctg agctgatcct accgatcgt 420  
 gtggcagtg ccaaccgtct gacagttgct gatctggctg ataccttcgc ggtgtacca 480  
 tcattgtcag gttcgattac tgaagcagca cgtcagctgg ttcaacatga tgatctaggg 540  
 taattttct gagtcttaga ttttgagaaa acccaggatt gctttgtgca ctctgggtt 600  
 ttcactttgt taagcagttt tggggaaaag tgcaaagttt gcaaagttta gaaatatttt 660  
 aagaggtaa atgtctgcag gtggaagcgt ttaaatgcgt taaacttggc caaatgtggc 720  
 aaccttgca agtgaaaaa ctggggcggg gttagatcct ggggggttta tttcattcac 780  
 15 tttggcttga agtctgcag gatactatgc attgaagcct aaaaacgacc gagcctattg 840

ES 2 624 926 T3

```

ggattaccat tgaagccagt gtgagttgca tcacattggc ttcaaactcg agactttaat      900
ttgtggattc acgggggtgt aatgtagttc ataattaacc ccattcgggg gagcagatcg      960
tagtgcgaac gatttcaggt tcgttcctcg caaaaactat ttagcgcaag tgttggaat      1020
gcccccgttt ggggtcaatg tccatttttg aatgtgtctg tatgattttg catctgctgc      1080
gaaatctttg tttccccgct aaagttgagg acaggttgac acggagttga ctcgacgaat      1140
tatccaatgt gagtaggttt ggtgctgag ttgaaaaaat tcgccatact cgcccttggg      1200
ttctgtcagc tcaagaatc ttgagtgacc gatgctctga ttgacctaac tgcttgacac      1260
attgcatttc ctacaatctt tagaggagac acaacatgtc gactcacaca tcttcaacgc      1320
ttccagcatt caaaaagatc ttggtagcaa accgcggcga aatcgcggtc cgtgctttcc      1380
gtgcagcact cgaaaaccgt gcagccacgg tagctattta cccccgtgaa gatcggggat      1440
cattccaccg ctcttttgct tctgaagctg tccgcattgg taccgaaggc tcaccagtca      1500
aggcgtacct ggacatcgat gaaattatcg gtgcagctaa aaaagttaa gcagatgcca      1560
tttaccggg ataccgcttc ctgtctgaaa atgccagct tgcccgcgag tgtgcgga      1620
acggcattac ttttattggc ccaacccag aggttcttga tctcaccggt gataagtctc      1680
gcgcgtaac cgccggaag aaggctggtc tgccagtttt ggcggaatcc accccgagca      1740
aaaacatcga tgagatcgtt aaaagcgtg aaggccagac ttacccatc tttgtgaagg      1800
cagttgccgg tggtgccgga cgcggtatgc gttttgttgc ttcacctgat gagcttcgca      1860
aattagcaac agaagcatct cgtgaagctg aagcggcttt cggcgatggc gcggtatatg      1920
tcgaacgtgc tgtgattaac cctcagcata ttgaagtgca gatccttggc gatcacactg      1980
gagaagttgt acacctttat gaacgtgact gctcactgca gcgtcgtcac caaaaagttg      2040
tcgaaattgc gccagcacag catttgatc cc      2072

```

- 5 <210> 45
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
  
- 10 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(28)
- <223> cebador Hom\_XI-A1
  
- <400> 45
- gatctagacg tccaggagt cctctacg 28
  
- 15 <210> 46
- <211> 20
- <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
  
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(20)
- <223> cebador LC-hom2

<400> 46  
 tggcgtccaa gatgaagttg 20

5 <210> 47  
 < 211> 33  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

10 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (1)..(33)  
 < 223> cebador Pgap3\_1.p

<400> 47  
 cgagtactato gcattgaagc ctaaaaacga ccg 33

15 <210> 48  
 < 211> 20  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

20 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (1)..(20)  
 < 223> cebador ilvA-int-rev2

<400> 48  
 accgcggatc ttgtaggaac 20

25 <210> 49  
 < 211> 18  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

30 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (1)..(18)  
 < 223> cebador pycUP\_3.p

<400> 49  
 agcacgtcag ctggttca 18

35 <210> 50  
 < 211> 20  
 < 212> ADN  
 < 213> Corynebacterium glutamicum

40 <220>  
 < 221> misc\_feature  
 < 222> (1)..(20)  
 < 223> cebador 2xpyc-1

<400> 50  
 aggtacgcct tgactggtga 20

## REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado con actividad de promotor, que abarca un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos que se representa en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34.
- 5 2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que él se compone de la secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34.
3. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que está unido funcionalmente junto al extremo 3' con un segundo polinucleótido que contiene junto al extremo 5' un codón de iniciación ATG o GTG y codifica uno o varios polipéptido(s), directamente, mediante un oligonucleótido de puente o mediante un polinucleótido de puente, preferentemente mediante un polinucleótido de puente.
- 10 4. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que el polinucleótido según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 está unido con el nucleótido adenosina en la posición 461 del extremo 3' mediante un polinucleótido de puente con una longitud de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos con el primer nucleótido del codón de iniciación del segundo polinucleótido.
- 15 5. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que el polinucleótido según SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 está unido con el nucleótido adenosina junto al extremo 3' mediante un polinucleótido de puente con una longitud de 6 hasta como máximo ( $\leq$ ) 600 nucleótidos, preferentemente con una longitud de 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos, con el primer nucleótido del codón de iniciación del segundo polinucleótido.
6. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el polinucleótido de puente comprende una secuencia de nucleótidos que garantiza la traducción del ARN sintetizado.
- 20 7. El polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 5 hasta 6, caracterizado por que la secuencia del polinucleótido de puente se compone esencialmente de una secuencia de nucleótidos representada en SEQ ID NO:12 o SEQ ID NO:13.
8. El polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 5 hasta 6, caracterizado por que la secuencia del polinucleótido de puente se compone de una de las secuencias de nucleótidos representadas en SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:18.
- 25 9. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que él está unido funcionalmente con el nucleótido adenosina en la posición 461 junto al extremo 3' de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:34 con un oligonucleótido de puente o con un polinucleótido de puente, preferentemente con un polinucleótido de puente, que garantiza la traducción de ARN.
- 30 10. El polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 3 hasta 8, caracterizado por que el segundo polinucleótido, que codifica uno o varios polipéptido(s) y que está unido funcionalmente con el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2, se compone de uno o varios de los polinucleótidos, seleccionados entre el conjunto formado por:
- a) el polinucleótido (gen zwf), que codifica la subunidad Zwf de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (gen Zwf, N° de EC: 1.1.1.49),
- 35 b) el polinucleótido (gen opcA), que codifica la subunidad OpcA de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (gen OpcA, N° de EC: 1.1.1.49),
- c) el polinucleótido (gen devB), que codifica una 6-fosfogluconolactonasa (DevB, N° de EC: 3.1.1.31),
- d) el polinucleótido (gen tkt), que codifica una transcetolasa (Tkt, N° de EC: 2.2.1.1),
- e) el polinucleótido (gen tal), que codifica una transaldolasa (Tal, N° de EC: 2.2.1.2),
- 40 f) el polinucleótido (gen gnd), que codifica una 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd, N° de EC: 1.1.1.44),
- g) el polinucleótido (gen rpe), que codifica una ribulosa-fosfato-3-epimerasa (Rpe, N° de EC: 5.1.3.1),
- h) el polinucleótido (gen rpi), que codifica una ribosa-5-fosfato isomerasa B (Rpi, N° de EC: 5.3.1.6),

## ES 2 624 926 T3

- i) el polinucleótido (gen ppc), que codifica una fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc, N° de EC: 4.1.1.31),
- j) el polinucleótido (gen fbp), que codifica una fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbp, N° de EC: 3.1.3.11),
- k) el polinucleótido (gen pyc), que codifica una piruvato-carboxilasa (Pyc, N° de EC: 6.4.1.1),
- l) el polinucleótido (gen dapA), que codifica una dihidrodipicolinato sintasa (DapA, N° de EC: 4.2.1.52),
- 5 m) el polinucleótido (gen asd), que codifica una aspartatosemialdehído deshidrogenasa (Asd, N° de EC: 1.2.1.11),
- n) el polinucleótido (gen ddh), que codifica una meso-diaminopimelato deshidrogenasa (Ddh, N° de EC: 1.4.1.16),
- o) el polinucleótido (gen lysA), que codifica una diaminopimelato-descarboxilasa (LysA, N° de EC: 4.1.1.20),
- 10 p) el polinucleótido (gen aat), que codifica una aspartato-aminotransferasa (Aat, N° de EC: 2.6.1.1),
- q) el polinucleótido (gen lysE), que codifica un polipéptido con actividad exportadora de L-lisina (LysE, lisina eflujo permeasa),
- r) el polinucleótido (gen dapB), que codifica una dihidrodipicolinato reductasa (DapB, N° de EC: 1.3.1.26),
- s) el polinucleótido (gen lysC), que codifica una aspartatocinasa (LysC, N° de EC: 2.7.2.4),
- 15 t) el polinucleótido (gen dapC), que codifica una succinildiaminopimelato aminotransferasa, AT clase I (DapC, N° de EC: 2.6.1.17),
- u) el polinucleótido (gen dapD), que codifica una tetrahidrodipicolinato succinilasa (DapD, N° de EC: 2.3.1.117),
- 20 v) el polinucleótido (gen dapE), que codifica una succinildiaminopimelato desuccinilasa (DapE, N° de EC: 3.5.1.18),
- w) el polinucleótido (gen dapF), que codifica una diaminopimelato epimerasa (DapF, N° de EC: 5.1.1.7),
- x) los polinucleótidos (gen ilvB y gen ilvN), que codifican las subunidades de una acetolactato sintasa (IlvBN, N° de EC: 4.1.3.18),
- y) el polinucleótido (gen ilvC), que codifica una isomerorreductasa (IlvC, N° de EC: 1.1.1.86),
- 25 z) el polinucleótido (gen ilvD), que codifica una dihidroxi-ácido deshidratasa (IlvD, N° de EC: 4.2.1.9),
- aa) el polinucleótido (gen ilvE), que codifica una transaminasa (IlvE, N° de EC: 2.6.1.42),
- bb) el polinucleótido (gen ilvA) que codifica una treoninadeshidratasa (IlvA, N° de EC: 4.3.1.19),
- cc) el polinucleótido (gen hom) que codifica una homoserinadeshidrogenasa (Hom, N° de EC: 1.2.1.11),
- dd) el polinucleótido (gen thrB), que codifica una homoserinacinasa (ThrB, N° de EC: 2.7.1.39),
- 30 ee) el polinucleótido (gen thrC), que codifica una treoninasintasa (ThrC, N° de EC: 4.2.3.1),
- ff) el polinucleótido (gen leuA), que codifica una isopropilmalatosintasa (LeuA, N° de EC: 2.3.3.13),
- gg) el polinucleótido (gen leuB), que codifica una isopropilmalatosdeshidrogenasa (LeuB, N° de EC: 1.1.1.85),

- hh) el polinucleótido (gen leuC), que codifica la subunidad grande de una isopropilmalatoisomerasa (LeuC, N° de EC: 4.2.1.33),
- ii) el polinucleótido (gen leuD), que codifica la subunidad pequeña de una isopropilmalatoisomerasa (LeuD, N° de EC: 4.2.1.33),
- 5 jj) el polinucleótido (gen lysE), que codifica un transportador de lisina/ornitina (número de solicitud DE 102010003419.3),
- kk) el polinucleótido (gen argB), que codifica una N-acetilglutamatoisomerasa (ArgB, N° de EC: 2.7.2.8),
- ll) el polinucleótido (gen gdh), que codifica una glutamato deshidrogenasa (Gdh, N° de EC: 1.4.1.3),
- 10 mm) el polinucleótido (gen argJ), que codifica una glutamato N-acetiltransferasa (ArgJ, N° de EC: 2.3.1.35 y N° de EC: 2.3.1.1),
- nn) el polinucleótido (gen argC), que codifica una N-acetil-gamma-glutamato fosfato reductasa (ArgC, N° de EC: 1.2.1.38), y
- oo) el polinucleótido (gen argD), que codifica una acetil-ornitina aminotransferasa (ArgD, N° de EC: 2.6.1.11),.
11. Un vector que contiene el polinucleótido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 10.
- 15 12. Un microorganismo que contiene el polinucleótido según SEQ ID NO:34.
13. El microorganismo que contiene el vector de acuerdo con la reivindicación 11.
14. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por que el polinucleótido está integrado en el cromosoma.
- 20 15. El microorganismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 hasta 14, caracterizado por que se trata de una bacteria del género Corynebacterium, preferiblemente Corynebacterium glutamicum.
16. Un microorganismo que contiene el polinucleótido aislado de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 10, caracterizado porque el polinucleótido aislado con actividad de promotor de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 hasta 10, está intercambiado en el cromosoma
- 25 1. por el promotor nativo en el sitio génico nativo del segundo polinucleótido o
2. está integrado con el segundo polinucleótido en su sitio génico nativo o en otro sitio génico, realizándose que el segundo polinucleótido, que codifica uno o varios polipéptido(s) se compone de uno o varios de los polinucleótidos, seleccionados entre el conjunto formado por:
- a) el polinucleótido (gen zwf), que codifica la subunidad Zwf de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (gen Zwf, N° de EC: 1.1.1.49),
- 30 b) el polinucleótido (gen opcA), que codifica la subunidad OpcA de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (gen OpcA, N° de EC: 1.1.1.49),
- c) el polinucleótido (gen devB), que codifica una 6-fosfogluconolactonasa (DevB, N° de EC: 3.1.1.31),
- d) el polinucleótido (gen tkt), que codifica una transcetolasa (Tkt, N° de EC: 2.2.1.1),
- e) el polinucleótido (gen tal), que codifica una transaldolasa (Tal, N° de EC: 2.2.1.2),
- 35 f) el polinucleótido (gen gnd), que codifica una 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Gnd, N° de EC: 1.1.1.44),
- g) el polinucleótido (gen rpe), que codifica una ribulosa-fosfato-3-epimerasa (Rpe, N° de EC: 5.1.3.1),
- h) el polinucleótido (gen rpi), que codifica una ribosa-5-fosfato isomerasa B (Rpi, N° de EC: 5.3.1.6),

## ES 2 624 926 T3

- i) el polinucleótido (gen ppc), que codifica una fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc, N° de EC: 4.1.1.31),
- j) el polinucleótido (gen fbp), que codifica una fructosa-1,6-bisfosfatasa (Fbp, N° de EC: 3.1.3.11),
- k) el polinucleótido (gen pyc), que codifica una piruvato-carboxilasa (Pyc, N° de EC: 6.4.1.1),
- l) el polinucleótido (gen dapA), que codifica una dihidrodipicolinato sintasa (DapA, N° de EC: 4.2.1.52),
- 5 m) el polinucleótido (gen asd), que codifica una aspartatosemialdehído deshidrogenasa (Asd, N° de EC: 1.2.1.11),
- n) el polinucleótido (gen ddh), que codifica una meso-diaminopimelato deshidrogenasa (Ddh, N° de EC: 1.4.1.16),
- o) el polinucleótido (gen lysA), que codifica una diaminopimelato-descarboxilasa (LysA, N° de EC: 4.1.1.20),
- 10 p) el polinucleótido (gen aat), que codifica una aspartato-aminotransferasa (Aat, N° de EC: 2.6.1.1),
- q) el polinucleótido (gen lysE), que codifica un polipéptido con actividad exportadora de L-lisina (LysE, lisina eflujo permeasa),
- r) el polinucleótido (gen dapB), que codifica una dihidrodipicolinato reductasa (DapB, N° de EC: 1.3.1.26),
- s) el polinucleótido (gen lysC), que codifica una aspartatocinasa (LysC, N° de EC: 2.7.2.4),
- 15 t) el polinucleótido (gen dapC), que codifica una succinildiaminopimelato aminotransferasa, AT clase I (DapC, N° de EC: 2.6.1.17),
- u) el polinucleótido (gen dapD), que codifica una tetrahidrodipicolinato succinilasa (DapD, N° de EC: 2.3.1.117),
- 20 v) el polinucleótido (gen dapE), que codifica una succinildiaminopimelato desuccinilasa (DapE, N° de EC: 3.5.1.18),
- w) el polinucleótido (gen dapF), que codifica una diaminopimelato epimerasa (DapF, N° de EC: 5.1.1.7),
- x) los polinucleótidos (gen ilvB y gen ilvN), que codifican las subunidades de una acetolactato sintasa (IlvBN, N° de EC: 4.1.3.18),
- y) el polinucleótido (gen ilvC), que codifica una isomerorreductasa (IlvC, N° de EC: 1.1.1.86),
- 25 z) el polinucleótido (gen ilvD), que codifica una dihidroxi-ácido deshidratasa (IlvD, N° de EC: 4.2.1.9),
- aa) el polinucleótido (gen ilvE), que codifica una transaminasa (IlvE, N° de EC: 2.6.1.42),
- bb) el polinucleótido (gen ilvA) que codifica una treoninadeshidratasa (IlvA, N° de EC: 4.3.1.19),
- cc) el polinucleótido (gen hom) que codifica una homoserinadeshidrogenasa (Hom, N° de EC: 1.2.1.11),
- dd) el polinucleótido (gen thrB), que codifica una homoserinacinasa (ThrB, N° de EC: 2.7.1.39),
- 30 ee) el polinucleótido (gen thrC), que codifica una treoninasintasa (ThrC, N° de EC: 4.2.3.1),
- ff) el polinucleótido (gen leuA), que codifica una isopropilmalatosintasa (LeuA, N° de EC: 2.3.3.13),
- gg) el polinucleótido (gen leuB), que codifica una isopropilmalatosdeshidrogenasa (LeuB, N° de EC: 1.1.1.85),

- hh) el polinucleótido (gen leuC), que codifica la subunidad grande de una isopropilmalatoisomerasa (LeuC, N° de EC: 4.2.1.33),
- ii) el polinucleótido (gen leuD), que codifica la subunidad pequeña de una isopropilmalatoisomerasa (LeuD, N° de EC: 4.2.1.33),
- 5 jj) el polinucleótido (gen lysE), que codifica un transportador de lisina/ornitina (número de solicitud DE 102010003419.3),
- kk) el polinucleótido (gen argB), que codifica una N-acetilglutamatoisomerasa (ArgB, N° de EC: 2.7.2.8),
- ll) el polinucleótido (gen gdh), que codifica una glutamato deshidrogenasa (Gdh, N° de EC: 1.4.1.3),
- 10 mm) el polinucleótido (gen argJ), que codifica una glutamato N-acetiltransferasa (ArgJ, N° de EC: 2.3.1.35 y N° de EC: 2.3.1.1),
- nn) el polinucleótido (gen argC), que codifica una N-acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa (ArgC, N° de EC: 1.2.1.38), y
- oo) el polinucleótido (gen argD), que codifica una acetil-ornitina aminotransferasa (ArgD, N° de EC: 2.6.1.11),.
- 15 17. El microorganismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 hasta 16, caracterizado por que el microorganismo posee la capacidad de producir un producto químico fino.
- 20 18. Un microorganismo de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado por que en el caso del producto químico fino se trata de un L-aminoácido, seleccionado preferiblemente entre el conjunto formado por L-isoleucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-prolina, L-valina y L-triptófano o un ácido orgánico, preferiblemente un  $\alpha$ -cetoácido, particularmente se trata de un  $\alpha$ -cetoácido seleccionado entre el conjunto formado por ácido  $\alpha$ -cetoisocaproico, ácido  $\alpha$ -cetovaleriánico y ácido  $\alpha$ -ceto- $\beta$ -metil valeriánico.
19. Un procedimiento para la preparación de un producto químico fino, caracterizado por que se llevan a cabo las siguientes etapas
- a) fermentar un microorganismo definido en una de las reivindicaciones 12 hasta 18 en un medio de fermentación mediado formación de un caldo de fermentación
- 25 b) acumular el producto químico fino en el caldo de fermentación procedente de a) y/o en las células de microorganismos.
20. El procedimiento para la preparación de un producto químico fino de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado por que se trata de un procedimiento seleccionado entre el conjunto de procedimientos por tandas, procedimientos de afluencia, procedimientos de afluencia repetida y procedimientos continuos.
- 30 21. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19 hasta 20, caracterizado por que a partir del caldo de fermentación que contiene el producto químico fino se recupera el producto químico fino o un producto que contiene el producto químico fino líquido o sólido.

Figura 1: Plásmido pK18mobsacB\_Pgap3\_lysCT311I\_asd

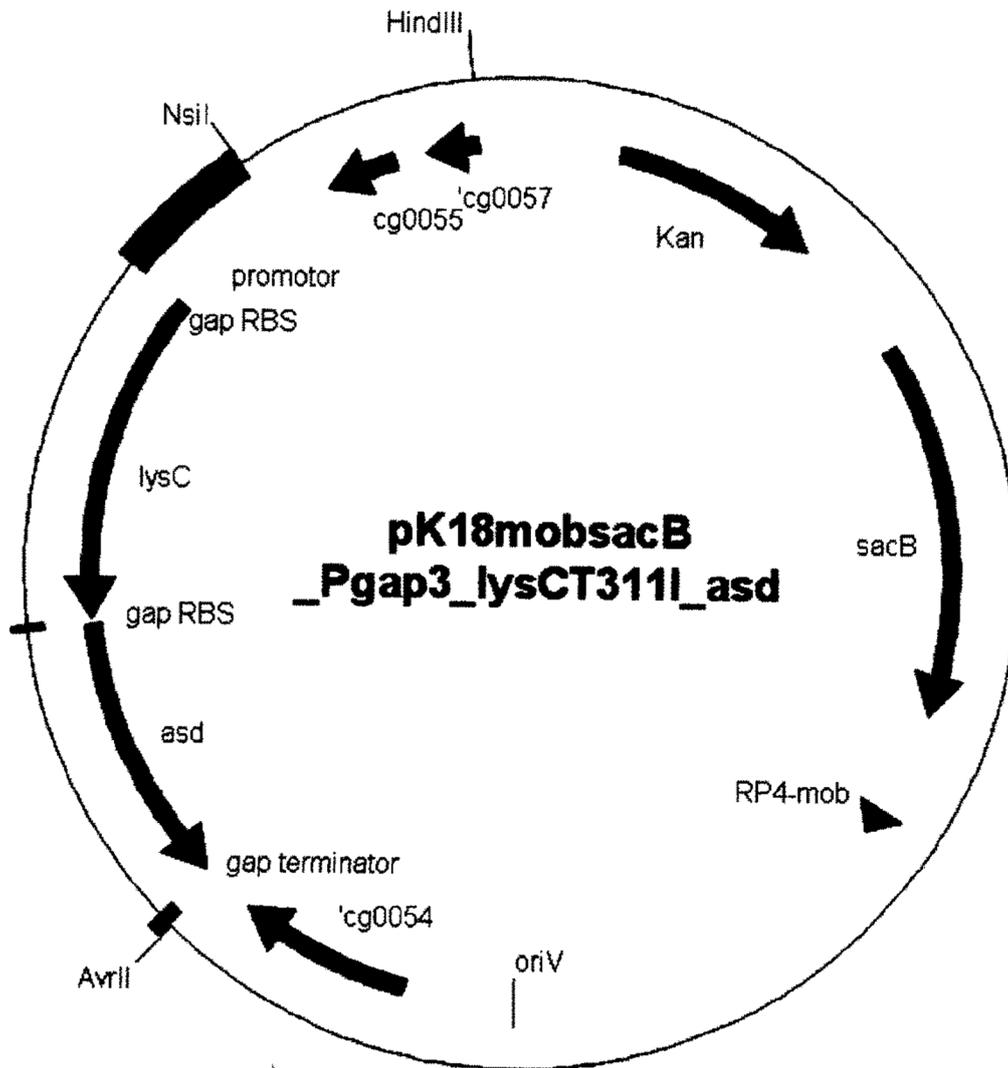


Figura 2: Plásmido pK18mobsacB\_IBcg0054\_Pg3\_argJB

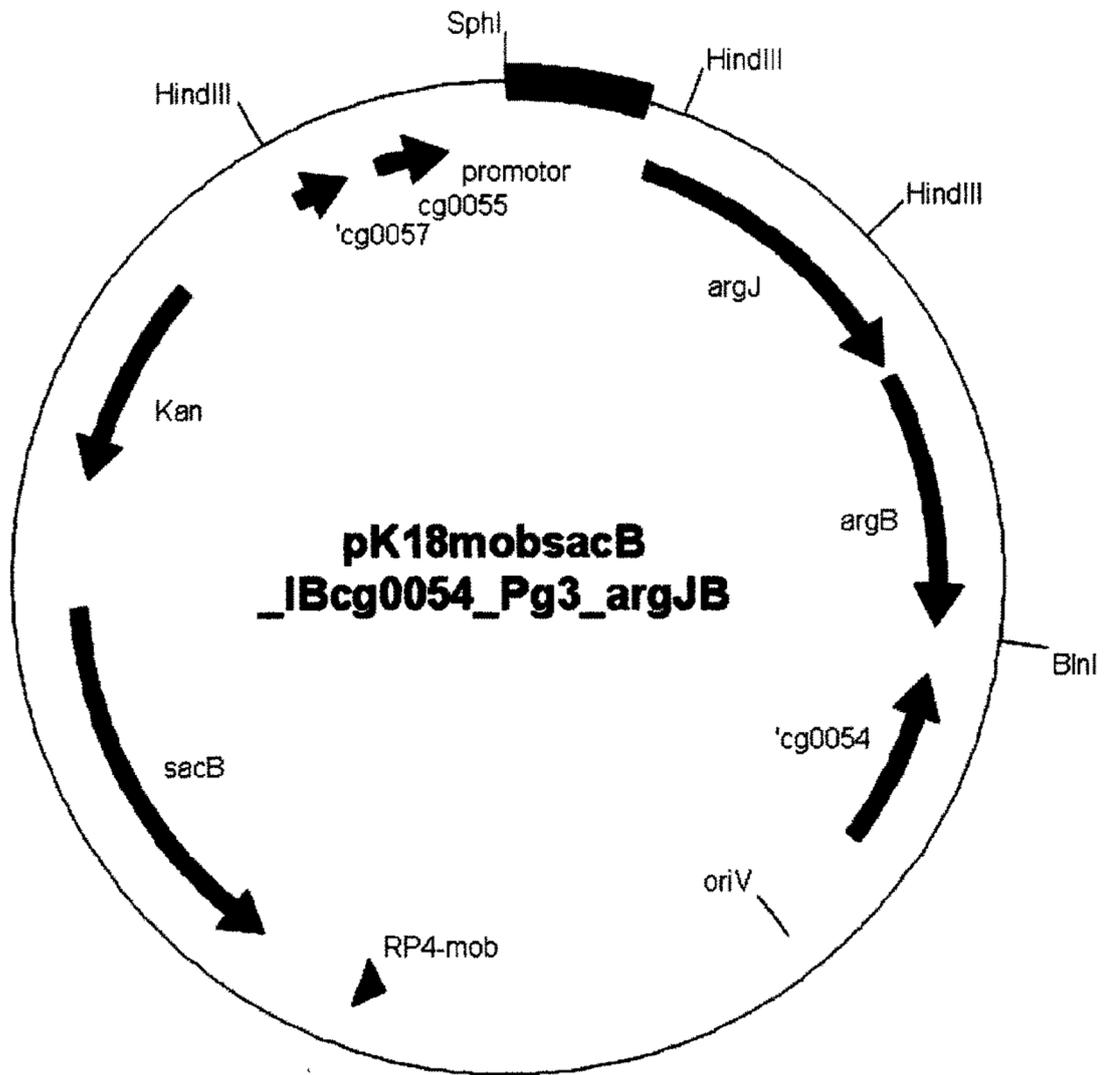


Figura 3: Mapa del plásmido pK18mobsacB\_homUP\_Pg3\_hom

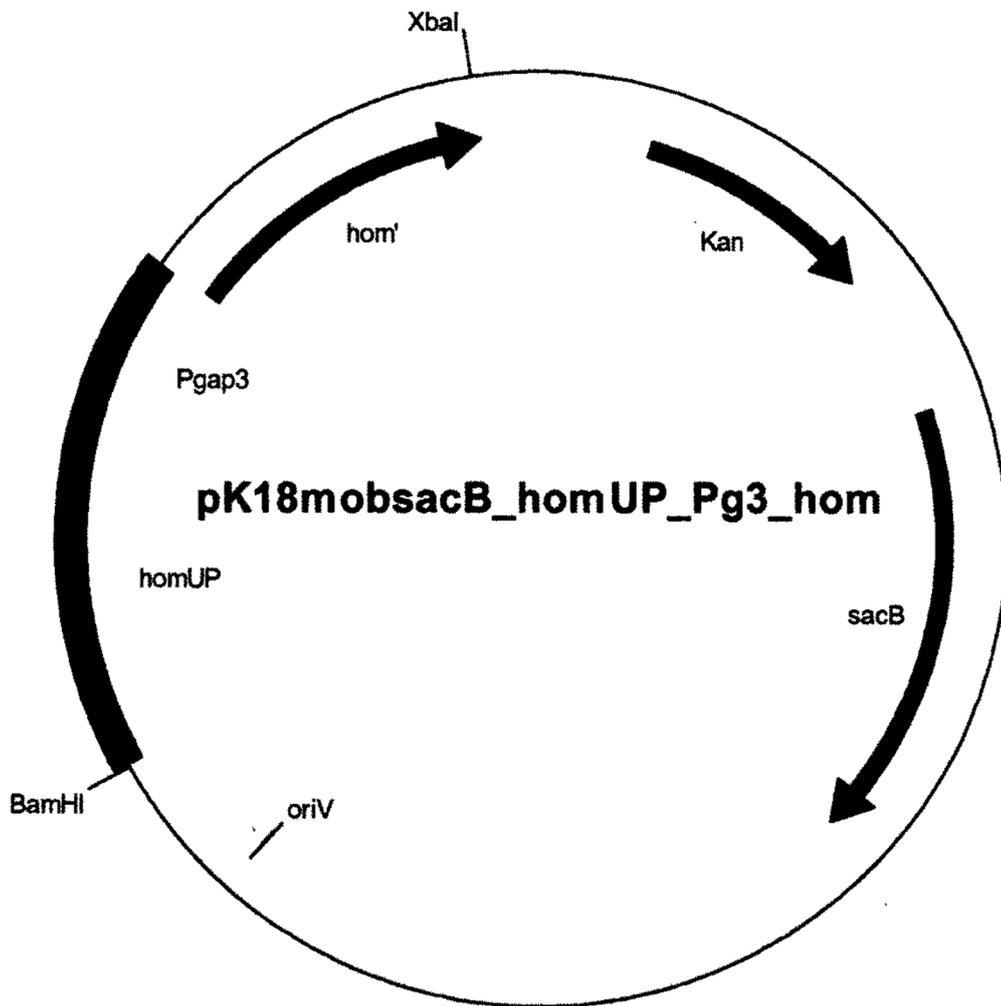


Figura 4: Mapa del plásmido pK18mobsacB\_ilvAUP\_Pg3\_ilvA

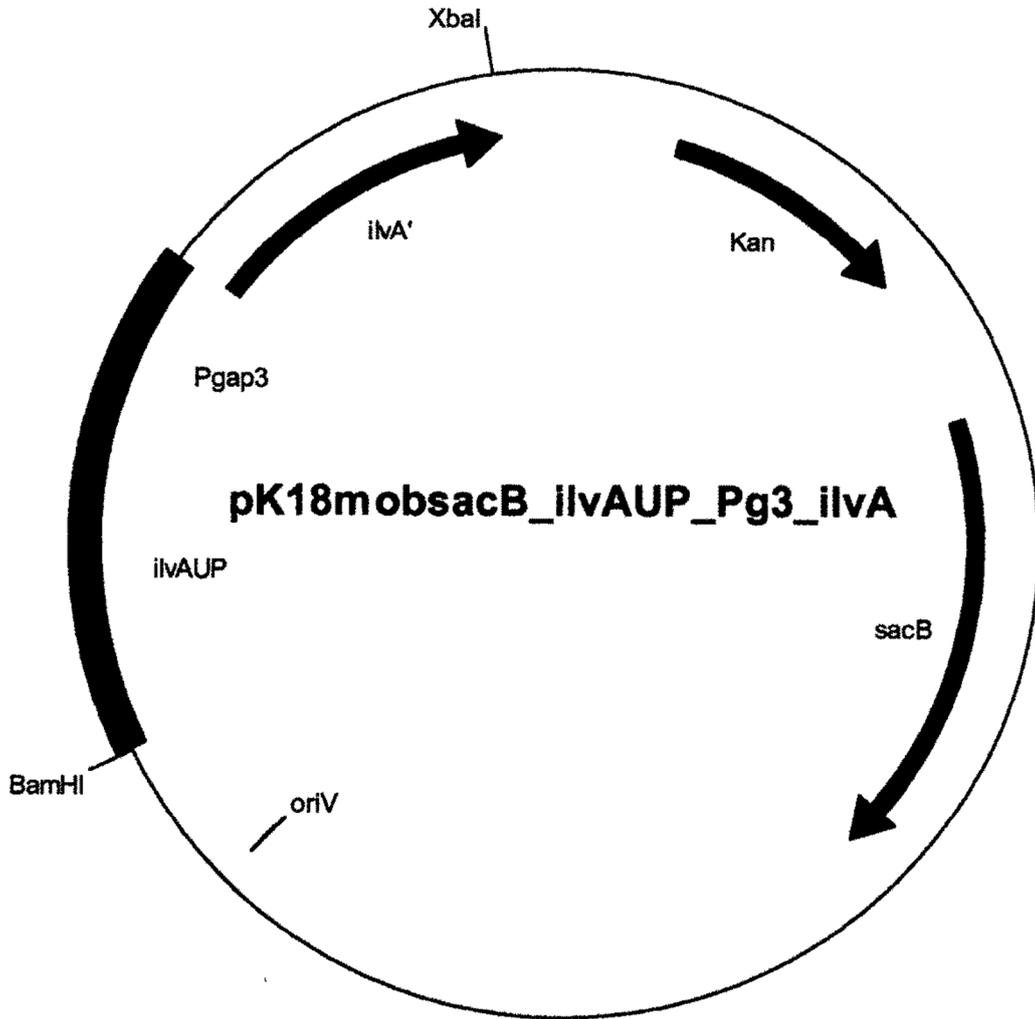


Figura 5: Mapa del plásmido pK18mobsacB\_pycUP\_Pg3\_pyc

