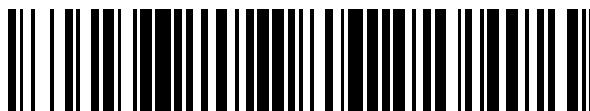


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 045**

51 Int. Cl.:

C12N 1/08 (2006.01)

C12P 25/00 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

C07K 14/32 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.11.2009 PCT/EP2009/064825**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO10052319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2009 E 09751895 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2356211**

54 Título: **Producción mejorada de riboflavina**

30 Prioridad:

07.11.2008 EP 08019492

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

28.12.2017

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

LEHMANN, MARTIN;

HANS, MICHAEL;

HOHMANN, HANS-PETER y

LAUDERT, DIETMAR

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 648 045 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción mejorada de riboflavina.

La presente invención proporciona una producción biotecnológica mejorada de riboflavina (también denominada en la presente memoria vitamina B2) mediante modificación en el operón que contiene los genes biosintéticos de la riboflavina (operón *rib*), en particular modificaciones de/en las secuencias líder (secuencia líder *rib*) en la dirección 5' de los correspondientes genes biosintéticos de la riboflavina (operón *rib*). Además, la presente invención se refiere a microorganismos genéticamente manipulados que llevan dichas secuencias modificadas, a procedimientos para generar dichas secuencias/microorganismos modificados y a su uso para la producción de riboflavina.

La riboflavina es sintetizada por todas las plantas y muchos microorganismos, pero no es producida por los animales superiores. La riboflavina es esencial para el metabolismo básico, porque es un precursor de coenzimas tales como el dinucleótido de flavina y adenina y el mononucleótido de flavina que son necesarios en la oxidación enzimática de los hidratos de carbono. En animales superiores, el suministro insuficiente de riboflavina puede producir pérdida de pelo, inflamación de la piel, deterioro de la visión y fallo de crecimiento.

La biosíntesis de la riboflavina empieza a partir del trifosfato de guanosina (GTP) y la ribulosa-5-fosfato. Los genes de diferentes fuentes implicados en la biosíntesis de la riboflavina son conocidos, tales como, p. ej., *Bacillus subtilis*, *Ereothecium ashbyii*, *Ashbya gossypii*, *Candida flareri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* (véase, p. ej. el documento EP 405370 o Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo "Vitamins").

Con respecto a la situación en *Bacillus subtilis* como un ejemplo de un (micro)organismo que produce riboflavina, los genes implicados en la biosíntesis de riboflavina incluyen *ribG* (*ribD*), *ribB* (*ribE*), *ribA*, y *ribH*. El gen *ribA* codifica dos actividades enzimáticas, es decir, la GTP ciclohidrolasa II que cataliza la primera etapa en la biosíntesis de la riboflavina y la 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato sintasa (DHBPS), que cataliza la conversión de la ribulosa-5-fosfato en 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato (DHBP). La desaminasa y reductasa son codificadas por el primer gen del operón *ribG* (*ribD*). La penúltima etapa en la biosíntesis de la riboflavina es catalizada por la lumazina sintasa, el producto génico de *ribH*. La riboflavina sintasa, que cataliza la última etapa de la ruta, es codificada por el segundo gen del operón, *ribB* (*ribD*). La función de *ribT* situado en el extremo 3' del operón *rib*, hasta este momento no está clara; sin embargo, su producto génico no es necesario para la síntesis de la riboflavina.

La transcripción del operón de la riboflavina a partir del promotor de *rib* (P_{rib}) es controlada por un interruptor ribosómico (*riboswitch*) que implica una región líder reguladora no traducida (en lo sucesivo denominada secuencia líder *rib*) de casi 300 nucleótidos situada en la región 5' del operón *rib* entre el codón de inicio de la transcripción y de inicio de la traducción del primer gen en el operón, *ribG*. A partir de estudios que usan *Bacillus subtilis* se sabe que al menos tres partes diferentes dentro de la secuencia líder *rib* están implicadas en la regulación de la transcripción del operón *rib*: (i) un terminador independiente de rho situado en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* que comprende una repetición invertida seguida de un tramo de poli-T característico de una terminación de transcripción o estructura de atenuación independiente de rho (Kil et al., *Mol. Gen. Genet.* 233, 483-486, 1992; Mironov et al., *Mol. Biol.* 24, 256-261, 1990); (ii) una repetición invertida en la mitad 5' del terminador que se sugiere que funciona como antiterminador (Mironov et al., *Cell* 111, 747-756, 2002); (iii) dos elementos situados en la parte media del terminador y que son complementarios inversos entre sí, que se supone que actúan como un anti-antiterminador que previene que el antiterminador de emparejamiento de bases con el terminador e interfiera con la formación de la estructura de antiterminación (Mironov et al., *Cell* 111(5):747-56, 2002). Se ha confirmado por estudios de transcripción in vitro que la función del terminador depende de la presencia de FMN en el ensayo de transcripción (Winkler et al., *PNAS* 99(25): 15908-13, 2002). Con respecto al operón *rib* de *B. subtilis* como se representa, p. ej. en la SEQ ID NO: 1, el terminador consiste en los nucleótidos 230 a 263, el antiterminador consiste en los nucleótidos 30 a 37, y el anti-antiterminador consiste en los nucleótidos 157 a 164 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente.

De acuerdo con el modelo actual de regulación de la expresión del gen *rib*, el ARNm emergente transcrito desde la secuencia líder *rib* adopta dos estructuras alternativas (el llamado interruptor ribosómico FMN): si el FMN se une al elemento RFN situado dentro de la secuencia líder *rib* (véase, p. ej., la secuencia de ADN desde la posición 25 a 164 en la SEQ ID NO: 1) el anti-antiterminador da emparejamiento de bases con el antiterminador, el cual, por lo tanto, no puede interferir con la formación del bucle de terminación de la transcripción produciendo la terminación prematura de la transcripción del gen *rib*. Cuando el FMN no se une al elemento RFN, el antiterminador da emparejamiento de bases con la secuencia complementaria inversa del terminador de la transcripción permitiendo la transcripción de ultralectura y formación del ARNm de *rib* de longitud completa. Este mecanismo conecta la concentración intracelular de FMN, que determina la relación del elemento RFN unido a FMN con la forma no unida, con la extensión de la producción de ARNm *rib* de longitud completa. Se ha mostrado que el elemento RFN solo sirve como sitio de unión para el FMN pero no para la riboflavina (Mironov et al, 2002; Winkler et al, 2002).

Por consiguiente, la desregulación, sobreproducción y secreción de riboflavina en el caldo de cultivo se puede lograr bien (i) interfiriendo con la unión del FMN al ARNm emergente transcrito a partir de la secuencia líder *rib*, (ii) modificando el anti-antiterminador de modo que no pueda dar emparejamiento de bases eficazmente con el antiterminador, o (iii) modificando o eliminando el terminador.

Una clase de mutantes de *B. subtilis* sobreproductores de riboflavina identificados, contiene mutaciones puntuales, denominadas mutaciones *ribO*, en diferentes posiciones en la mitad 5' de la secuencia líder *rib* (Kil et al., 1992). Las mutaciones *ribO* están localizadas en el elemento RFN y por lo tanto interfieren con la unión de FMN o están situadas en la secuencia de ADN anti-antiterminadora. Se puede esperar que la desregulación máxima de la expresión del gen *rib* y secreción de riboflavina se alcance tras la eliminación de la estructura terminadora, puesto que en este caso se elimina el elemento último del que depende la represión de la transcripción del gen *rib*. Las mutaciones *ribO* se han identificado además, p. ej., en *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* o *Propionibacterium freudenreichii* (Burges et al., *Microbial Cell Factories* 5:24, 2006).

En una segunda clase de mutantes de *B. subtilis* sobreproductores de riboflavina, denominados mutantes *ribC*, se cartografiaron las lesiones cromosómicas a 147° del genoma de *B. subtilis* (Kreneva y Perumov, *Mol. Gen. Genet.* 222, 467-469, 1990). Los mutantes *RibC* contienen mutaciones de sentido alterado en el gen *ribC*. El gen *ribC* se ha mostrado que codifica la flavina quinasa/FAD sintasa de *B. subtilis* (Mack et al., *J. Bacteriol.*, 180:950-955, 1998). Las mutaciones que desregulan la biosíntesis de riboflavina reducen la actividad de flavoquinasa del producto génico *ribC* dando como resultado menores concentraciones intracelulares del mononucleótido de flavina (FMN), la molécula efectora del sistema regulador de riboflavina.

Además, se usó la mutagénesis clásica para generar variantes que llevan mutaciones aleatorias en el genoma del organismo de elección seguido de, p. ej., selección de la mayor resistencia frente a análogos de purina. Alternativamente, los genes implicados en la biosíntesis de riboflavina eran expresados en exceso, por ejemplo, por la sustitución del promotor natural (débil) por un promotor fuerte o amplificación de casetes de expresión en el cromosoma, conteniendo dichos casetes un solo promotor operativamente unido al gen o genes de interés junto con un gen marcador seleccionable amplificable, p. ej., un marcador de resistencia a antibióticos. La amplificación conduce a la producción de múltiples copias del casete de expresión y el gen marcador seleccionable en el cromosoma. Además, podría lograrse una mayor secreción de riboflavina en el caldo de cultivo por el desacoplamiento de la producción de riboflavina del crecimiento de dicha célula hospedante.

Hay varias desventajas asociadas con los procedimientos mencionados anteriormente. Por ejemplo, puede no ser posible lograr niveles de saturación del ARNm por amplificación de genes dirigida por un solo promotor. Además, la producción de múltiples copias del casete de expresión y el gen marcador seleccionable en el cromosoma de una célula hospedante puede no ser estable o puede incluso evitar la expresión adicional del gen respectivo (inhibición por retroalimentación).

Sorprendentemente, se ha descubierto que la secuencia líder *rib*, aparte de su función como un regulador negativo de la expresión del gen *rib* como se supone por los modelos actuales, tiene una fuerte influencia en la abundancia del ARNm de *rib* de longitud completa, indicando por lo tanto una función estabilizadora del ARNm 5'. La introducción de mutación(es)/eliminación(es) específica(s) en la secuencia líder *rib* daba como resultado una mayor producción de riboflavina.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es mejorar los rendimientos y/o la productividad de la producción de riboflavina proporcionando cepas productoras de riboflavina mutantes en donde la secuencia líder *rib* se ha modificado de forma que conduce a una relajación o reducción del efecto o efectos represores sobre la expresión del genes o genes *rib* consecutivos que da como resultado la acumulación del transcrito de ARNm de *rib* de longitud completa intacto. Por lo tanto, la introducción de una secuencia líder *rib* modificada, es decir, una secuencia líder *rib* mejorada comparada con la secuencia líder *rib* de tipo natural, en una célula hospedante adecuada, conduce a mayores tasas de transcripción de genes *rib* consecutivos, tales como, p. ej., *ribA*, a mayor estabilidad del ARNm de *rib* de longitud completa y más desregulación del operón *rib*, es decir más producción de riboflavina desregulada.

En particular, se ha encontrado que las eliminaciones en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* que incluyen (i) las secuencias terminadoras o partes funcionales de las mismas y (ii) las regiones flanqueadoras 5' del terminador, son específicamente eficaces en la mejora del rendimiento y/o productividad de la producción de riboflavina. Una secuencia líder *rib* modificada en donde se ha eliminado la secuencia de ADN entera desde el extremo 3' del elemento RFN al extremo 3' del terminador, es particularmente útil en la mejora de la producción de riboflavina.

Además, se ha encontrado que la combinación de las mutaciones *ribO* junto con las eliminaciones en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* que incluyen las secuencias terminadoras o partes funcionales de las mismas, es específicamente eficaz en la mejora del rendimiento y/o productividad de la producción de riboflavina. Esto podría incluso mejorarse incluyendo regiones flanqueadoras 5' del terminador. Inesperadamente, eliminaciones o modificaciones de la secuencia terminadora entera o partes funcionales de la misma (sin la combinación con las mutaciones *ribO*) no tienen un efecto fuerte sobre la producción de riboflavina en contraste con las eliminaciones mayores que incluyen el terminador junto con las regiones flanqueadoras 5' o combinaciones de eliminaciones del terminador con mutaciones *ribO*. De hecho, eliminaciones o modificaciones de solo la secuencia terminadora o partes funcionales de la misma eran claramente menos eficaces en la desregulación de la producción de riboflavina que las mutaciones *ribO* clásicas. Una secuencia líder *rib* modificada en donde se ha eliminado la secuencia de ADN entera desde el extremo 3' del elemento RFN al extremo 3' del terminador, en combinación con una o más mutaciones *ribO*, es particularmente útil en la mejora de la producción de riboflavina. Esto se podría incluso mejorar si se eliminaran partes mayores del elemento RFN, p. ej., si se elimina aproximadamente una quinta parte del

extremo 3' del elemento RFN.

Por consiguiente, la presente invención se dirige a un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una secuencia líder del operón de riboflavina (secuencia líder *rib*), en donde la secuencia de ADN que corresponde a una secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 42 se ha modificado por introducción de eliminaciones del extremo 3', en donde el polinucleótido modificado o mutado se selecciona del grupo que consiste en:

(a) polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 42, que incluyen una eliminación de al menos las secuencias de acuerdo con los nucleótidos 166 a 263 mostradas en la SEQ ID NO: 42,

(b) polinucleótidos cuya cadena complementaria hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido como se define en una cualquiera de (a) que incluye la eliminación de al menos los nucleótidos 166 a 263 mostrada en la SEQ ID NO: 42 y tiene la actividad de una secuencia líder *rib*,

(c) polinucleótidos que son al menos 95 o 98% idénticos a un polinucleótido como se define en (a) que incluye la eliminación de al menos los nucleótidos 166 a 263 mostrada en la SEQ ID NO: 42 y que tiene la actividad de una secuencia líder *rib*; y

(d) polinucleótidos que son la cadena complementaria de un polinucleótido definido en (a) a (c) que incluye la eliminación de al menos los nucleótidos 166 a 263 mostrados en la SEQ ID NO: 42; en donde dicho polinucleótido, en particular el polinucleótido representado en la SEQ ID NO: 42, comprende modificación(es)/mutación(es) y en donde la acumulación del transcrito de ARNm de *rib* de longitud completa, intacto, aumenta en al menos 5% comparado con una secuencia líder *rib* no modificada, y además conduce a un aumento de la producción de riboflavina, seleccionándose dicha(s) modificación(es)/mutación(es) de una o más mutaciones *ribO* en el elemento RFN que corresponden a los nucleótidos 25 a 164 mostrados en la SEQ ID NO: 42.

La secuencia líder *rib* no modificada como se representa, p. ej., en la SEQ ID NO: 42 puede ser parte de un operón *rib* no modificado, como se muestra, p. ej., en la SEQ ID NO: 1 aislada de *Bacillus subtilis*. Las secuencias líder *rib* como las de la presente invención se pueden usar sea con el promotor de *rib* natural o con un promotor constitutivo tal como p. ej. P_{spo15} o P_{veg} y como se representa, p. ej., en la SEQ ID NO: 55 o 56.

Las mutaciones *ribO* que se introducen en una secuencia líder *rib* y combinadas con modificaciones en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* para dar las secuencias líder *rib* modificadas como se definen en la presente memoria, se refieren a cualquier mutación o mutaciones (intercambio, eliminaciones, inserciones de bases) situada en cualquier posición en el extremo 5' de la secuencia líder *rib* que corresponde a los nucleótidos 25 a 164 mostrados en la SEQ ID NO: 42 que incluye el elemento RFN como han definido/caracterizado en Kil et al., 1992, y que conducen a la producción de riboflavina mejorada comparado con una cepa que lleva una secuencia líder *rib* no modificada como se define en la presente memoria.

En particular, la invención se refiere a una secuencia líder *rib* modificada que está modificada en la parte 3' como se ha definido antes y además contiene una o más mutaciones *ribO* en el elemento RFN que corresponde a los nucleótidos 25 a 164 mostrados en la SEQ ID NO: 42 que corresponden a los definidos por Kil et al. (1992) o una o más, tal como, p. ej. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, mutaciones *ribO*, es decir, sustitución(es), en una posición que corresponde a una posición como se representa en la SEQ ID NO:42 que se selecciona, p. ej. de la posición 31, 39, 40, 41, 55, 85, 86, 88, 93, 116, 121 y 128. Preferiblemente, la mutación *ribO* se selecciona de T31G, G39A, G40A, G41A, C55T, C85T, C86T, G88A, C93T, A116C, G121A, C128G, y combinaciones de las mismas, en donde los nucleótidos corresponden a las posiciones representadas en la SEQ ID NO: 42. Se muestran ejemplos de secuencias líder *rib* que llevan dichas mutaciones *ribO* que incluyen el promotor de *rib* natural en el extremo 5', en las SEQ ID NO: 45, 46 y 47. Estas mutaciones *ribO* también pueden estar fusionadas con un promotor constitutivo, tal como, p. ej., P_{veg} o P_{spo15}, representado, p. ej., en las SEQ ID NO: 57, 58 o 60 y SEQ ID NO: 59, respectivamente. Preferiblemente la secuencia líder *rib* modificada como se define en la presente memoria comprende una sola mutación *ribO*, tal como, p. ej., localizada en una posición que corresponde a la posición 39, 40, 41, 85 o 121 como se muestra en la SEQ ID NO: 42, más preferiblemente, la mutación *ribO* se selecciona de G39A, G40A, G41A, C85T (denominada "RK41"), G121A (denominada "RK1a") y combinaciones de las mismas. Dichas mutaciones *ribO* se combinan además con la o las mutaciones en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* como se definen en la presente memoria.

En una realización particular, una secuencia líder *rib* modificada como de la presente invención lleva más de una mutación *ribO* combinada con mutación o mutaciones en el extremo 3' de la secuencia líder *rib*. Se prefiere una combinación de tres mutaciones *ribO*, más preferiblemente en una posición que corresponde a la posición 39, 40 y 41 de la SEQ ID NO: 42, incluso más preferiblemente las mutaciones *ribO* G39A-G40A-G41A denominado "triple *ribO*". Un ejemplo de dicha mutación triple *ribO* introducida en una secuencia líder *rib* se representa en la SEQ ID NO: 47 (que incluye el promotor de *rib* natural). Estas mutaciones *ribO* también pueden estar fusionadas con un promotor constitutivo sustituyendo el natural, como se representa, p. ej., en la SEQ ID NO: 57.

Dichas mutaciones *ribO* se combinan además con modificaciones en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* como se define en la presente memoria. Dicha modificación en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* puede incluir al menos la eliminación de nucleótidos que corresponden a los nucleótidos 166 a 263 o 136 a 263 de la SEQ ID NO: 42 para

dar una secuencia líder *rib* modificada como de la presente invención que conduce a una mayor producción de riboflavina tras la introducción en una célula hospedante adecuada comparado con una célula hospedante que lleva una secuencia líder *rib* no modificada.

5 Los ejemplos de secuencias líder *rib* modificadas en donde se han eliminado el terminador y las regiones flanqueadoras 5' combinado con las mutaciones *ribO* especificadas antes, se muestran en las SEQ ID NO: 52, 53, 81 y 82. El promotor de *rib* natural también se puede sustituir por uno constitutivo, tal como p. ej., P_{spo15} y P_{veg} (véase, p. ej., la SEQ ID NO: 65). Tomando el operón *rib* de *B. subtilis* como se representa en la SEQ ID NO: 42 como una secuencia de referencia, una secuencia líder *rib* modificada como la de la presente invención, puede contener una eliminación de nucleótidos que corresponde a los nucleótidos 166 a 263 de la SEQ ID NO: 42 denominada "eliminación SWITCH" o que corresponde a los nucleótidos 136 a 263 denominada "del mro175", que se combinan con cualquiera de las mutaciones *ribO* anteriores.

10 Las secuencias líder *rib* modificadas como se describe en la presente memoria que llevan mutaciones *ribO* como se han definido antes, que se combinan con mutación(es)/modificación(es) en el extremo 3' de la secuencia líder *rib*, en donde las modificaciones en el extremo 3' se pueden seleccionar, p. ej., del terminador junto con las regiones flanqueadoras 5'.

15 Además, y como parte de la invención, las secuencias líder *rib* modificadas como se definen en la presente memoria llevan mutación(es)/modificación(es) en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* que incluyen una eliminación de al menos los nucleótidos 166 a 263 mostrada en la SEQ ID NO: 42, en donde las modificaciones se pueden seleccionar de eliminaciones de nucleótidos que corresponden a los nucleótidos 166 a 263 o 136 a 263 de la SEQ ID NO: 42.

20 En una realización particular preferida, la célula hospedante que lleva la secuencia líder *rib* modificada como se ha definido antes, acumula más de 25 mg/l de riboflavina, tal como 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 mg/l o más de riboflavina, o incluso más de 1 g/l de riboflavina en el medio de cultivo comparado con los mutantes de *ribO* conocidos, definidos por Kil et al. (1992), tales como, p. ej., las mutaciones *ribO* T31G, G39A, G40A, G41A, C55T, C85T, C86T, G88A, C93T, A116C, G121A, C128G, y combinaciones de las mismas en donde los nucleótidos corresponden a las posiciones como se representan en la SEQ ID NO: 42. El experto en la técnica sabe que estas cantidades varían dependiendo, p. ej., de las condiciones de cultivo, la cepa del hospedante y/o el sustrato.

25 En una realización, una secuencia líder *rib* modificada como la de la presente invención, contiene una mutación *ribO* que corresponde a la mutación *ribO* seleccionada de RK1a, RK41 o triple *ribO* en el operón *rib* de *B. subtilis* (SEQ ID NO: 42) combinada con una eliminación en el extremo 3' seleccionada de la eliminación SWITCH o eliminación mro175 (véase, antes). Una combinación preferida es RK1a con la eliminación SWITCH, o eliminación mro175. También se prefiere la combinación de RK41 con la eliminación SWITCH, o eliminación mro175. Se prefiere además la combinación de triple *ribO* con la eliminación SWITCH o eliminación mro175. Más preferiblemente, la secuencia líder *rib* modificada como la de la presente invención contiene una combinación de RK41 con la eliminación SWITCH, triple *ribO* con eliminación mro175. Son incluso más preferidas dichas secuencias líder *rib* modificadas fusionadas con promotor constitutivo, tal como p. ej. P_{spo15} y P_{veg} (véase, p. ej., SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70 o 71).

30 Una secuencia líder *rib* modificada de acuerdo con la presente invención también puede incluir modificaciones por la introducción de elementos estabilizadores del ARNm. Dichos elementos se pueden introducir entre el promotor y la secuencia codificante del gen o genes *rib*. Los ejemplos de dichos elementos incluyen los mostrados en la SEQ ID NO: 43 (llamado elemento estabilizador de ARNm *aprE*) o SEQ ID NO: 44 (llamado elemento estabilizador de ARNm *grpE*) y secuencias que hibridan preferiblemente en condiciones restrictivas con las mismas.

35 Las secuencias de ácidos nucleicos, es decir, las secuencias líder *rib* modificadas, como las de la presente invención, pueden estar operativamente unidas a un promotor adecuado, que puede ser un promotor constitutivo o inducible. El promotor será el natural o un promotor que originalmente no está unido al respectivo gen o genes implicados en la biosíntesis de la riboflavina. El experto en la técnica sabrá cómo seleccionar promotores adecuados. Los ejemplos de promotores útiles se pueden encontrar en la bibliografía, véase, en particular, p. ej., el documento EP 405370.

Por lo tanto, la invención se refiere en una realización preferida a un polinucleótido modificado o mutado (secuencia líder *rib*) seleccionado del grupo que consiste en:

50 (a) polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos (modificada) de acuerdo con las SEQ ID NO: 65, 67, 68, 69, 70 o 71;

(b) polinucleótidos cuya cadena complementaria hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido como se define en (a) y tienen la actividad de una secuencia líder *rib* modificada,

55 (c) polinucleótidos que son al menos 95 o 98% idénticos a un polinucleótido como se define en (a) y que tienen la actividad de una secuencia líder *rib* modificada; y

(d) polinucleótidos que son la cadena complementaria de un polinucleótido definido en (a) a (c);

en donde dichos polinucleótidos, en particular las secuencias representadas con las SEQ ID NO: 65, 67, 68, 69, 70 o 71, se denominan secuencias modificadas o mutadas en donde la acumulación de transcrito de ARNm de *rib* de longitud completa, intacto, aumenta en al menos 5% tras la introducción en una célula hospedante adecuada comparado con una célula que lleva las correspondientes secuencias no modificadas.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión “secuencia líder *rib*” se refiere a cualquier secuencia de ADN que está asociada con uno o más genes *rib* en la dirección 3’ y que contiene elementos reguladores no traducidos, que afecta a la expresión del o de los genes *rib* consecutivos. Estos elementos reguladores típicamente comprenden (i) un terminador en el extremo 3’ de la secuencia de ADN, (ii) un anti-terminador, y (iii) un sitio de unión a RFN en la dirección 5’ del terminador. Como se conoce de *Bacillus subtilis*, la secuencia líder *rib* abarca casi 300 nucleótidos situados en la región 5’ del operón *rib* entre el codón de inicio de la transcripción y el de inicio de la traducción del primer gen en el operón, *ribG*. La secuencia terminadora en la secuencia líder *rib* de *B. subtilis* está situada entre los nucleótidos 231 y 263 (véase la figura 1). Dichas secuencias líder *rib* se han identificado además en otras eubacterias tales como *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* en particular *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. halodurans*, *B. amyloliquefaciens*, *C. diptheriae* y *C. glutamicum*, *P. aeruginosa*, *P. putida* o *P. syringiae* (véase la tabla 1 de Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30, 3141-3151, 2002).

La expresión “elemento RFN” como se usa en la presente memoria, se refiere a secuencias de ADN altamente conservadas dentro de una secuencia líder *rib*. Después de la transcripción en ARNm, los elementos RFN pueden plegarse en estructuras conservadas con cinco horquillas que forman un sitio de unión para el FMN. Se pueden identificar potenciales elementos RFN usando RFAM, que es una colección de alineamientos de secuencias múltiples y modelos de covarianza que representan familias de ARN no codificantes (Griffiths-Jones et al.: “Rfam: an RNA family database”. *Nucleic Acids Res* 2003, 31:439-441; disponible en <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Rfam/getacc?RF00050>). Se proporcionan ejemplos de elementos RFN en los genomas de diferentes bacterias en Gelfand et al., *Trends Genet.* 15, 439-442, 1999. Se da una visión general que incluye las secuencias de nucleótidos de los elementos RFN de diferentes organismos en la figura 2 de Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30, 3141-3151, 2002. De acuerdo con la definición de Mironow et al., *Cell* 111(5):747-56, 2002, el elemento RFN dentro de la secuencia líder *rib* de *B. subtilis* está situado entre los nucleótidos 22 a 165 (véase la figura 1 o SEQ ID NO: 42). Con la ayuda del alineamiento mostrado en la figura 2 de Vitreschak et al., 2002, el experto en la técnica es capaz de generar una secuencia líder *rib* modificada en organismos que contienen dicho elemento RFN que conduce a una mayor producción de riboflavina. La expresión “secuencia líder *rib* no modificada” o “polinucleótido no modificado” y “secuencia líder *rib* de tipo natural” o “polinucleótido de tipo natural”, se usan de forma intercambiable en la presente memoria. La secuencia líder *rib* no modificada o polinucleótidos no modificados pueden incluir cualquier polinucleótido que hibrida preferiblemente en condiciones de alta restricción con una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 42, para el que se desea aumentar la actividad específica con el fin de aliviar los efectos represivos de la secuencia líder *rib*, para aumentar la estabilidad del ARNm del gen *rib*, para conducir a un operón *rib* más desregulado y/o aumentar la producción de riboflavina en un microorganismo dado. Estas secuencias se usan entonces como punto de partida para diseñar secuencias líder *rib* mutantes con mayor actividad de acuerdo con la presente invención. “Tipo natural” en el contexto de la presente invención puede incluir tanto secuencias que se pueden obtener de la naturaleza como variantes de secuencias sintéticas, si se pueden hacer más activas por cualquiera de las enseñanzas de la presente invención. En particular, dichos polinucleótidos son de origen procariota, preferiblemente origen bacteriano, en particular procedentes de bacterias Gram positivas o Gram negativas, p. ej. *Bacillus*, preferiblemente *Bacillus subtilis*.

Las expresiones “polinucleótido modificado” o “secuencia líder *rib* modificada” y “polinucleótido mutante” o “secuencia líder *rib* mutante” se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Un polinucleótido mutante/modificado o secuencia líder *rib* modificada puede incluir cualquier variante que se puede obtener de un polinucleótido/secuencia líder *rib* de tipo natural (de acuerdo con la definición anterior) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención y que es más activo (tal como, p. ej., medible como aumento en la riboflavina producida a partir de un sustrato dado o como mayor estabilidad del ARNm de *rib*) que la respectiva secuencia de tipo natural. Para el alcance de la presente invención, no es relevante cómo se obtienen el o los mutantes; dichos mutante se pueden obtener, p. ej., por mutagénesis dirigida, mutagénesis de saturación, mutagénesis aleatoria/evolución dirigida, mutagénesis química o por UV de las células/organismos enteros, y otros métodos que son conocidos en la técnica. Estos mutantes también se pueden generar, p. ej., diseñando genes sintéticos. Las modificaciones en la secuencia líder *rib* y su efecto en la expresión de los genes *rib* se puede medir por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, estos métodos incluyen ensayos usando beta-galactosidasa como gen indicador o secreción de riboflavina al caldo de cultivo de microorganismos que contienen la secuencia líder *rib* modificada en lugar de o además de la secuencia líder *rib* de tipo natural. El efecto (positivo) de las secuencias líderes *rib* modificadas en los respectivos niveles de ARNm también se puede determinar por transferencias Northern o PCR en tiempo real.

El experto en la técnica sabe cómo generar secuencias líder *rib* mutadas/modificadas que incluyen la introducción de elementos estabilizadores del ARNm y/o la sustitución del promotor natural. En una realización, una secuencia líder *rib* modificada se genera por la introducción de elementos estabilizadores del ARNm en una secuencia líder *rib* no modificada previamente. Un ejemplo, de un método útil para la introducción de dichos elementos estabilizadores del ARNm se muestra en la figura 2.

- Dicha generación de secuencias líder *rib* mutadas/modificadas se puede llevar a cabo, por ejemplo, bien modificando genéticamente el organismo hospedante de una forma como se ha descrito en la presente memoria, que produce una secuencia líder *rib* mutada en donde el o los efectos represivos en la expresión del gen *rib* se han relajado o reducido comparado con una secuencia líder *rib* no modificada, que a su vez conduce a una mayor acumulación de transcritos de ARNm de *rib* de longitud completa, intactos, y por lo tanto, a un aumento de la eficacia y/o rendimiento de la producción de riboflavina. Por lo tanto, con una secuencia líder *rib* modificada, el operón *rib* está menos regulado y está más desregulado comparado con una cepa que lleva una secuencia líder *rib* no modificada.
- “Actividad mejorada” o “actividad potenciada” como se usa en la presente memoria, debe entenderse como una relajación (total o parcial) o reducción del o de los efectos represivos/reducción de la regulación de la secuencia líder *rib* en un microorganismo que produce riboflavina. Por lo tanto, para el fin de la presente invención, una secuencia líder *rib* modificada con mayor actividad tiene menos influencia represiva en la transcripción de los genes *rib* conduciendo a la desregulación del operón *rib* comparado con una secuencia líder *rib* no modificada. Además, una secuencia líder *rib* modificada con actividad mejorada como se define en la presente memoria conduce a una acumulación del ARNm de *rib* de longitud completa, intacto, que es mayor en al menos 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% o incluso más de 500% determinado por transferencia Northern o PCR en tiempo real. Esto se puede medir (indirectamente) por un aumento en la producción de riboflavina tras la represión/regulación minimizada de la secuencia líder *rib* o por determinación de la concentración de ARNm de los transcritos de longitud completa o concentración de enzimas biosintéticas de riboflavina transcritas a partir de los genes *rib*. Una secuencia líder *rib* es al menos 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% o incluso más de 500% menos represiva/regulada en la expresión del gen *rib* comparado con una secuencia líder *rib* de tipo natural. Por lo tanto, una secuencia líder *rib* modificada que tiene mejor actividad se refiere a una secuencia líder *rib* con un nivel de desregulación que es mayor en al menos 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% o incluso más de 500%, comparado con una secuencia líder *rib* no modificada como se define en la presente memoria.
- La expresión “elemento estabilizador del ARNm” como se usa en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ADN que tras la introducción en la región 5' no traducida, p. ej., en la dirección 3' del inicio de la transcripción del respectivo gen, es capaz de proporcionar una mayor estabilidad al ARNm que es transcrito a partir del respectivo gen que comprende dicho elemento estabilizador del ARNm. El elemento estabilizador del ARNm preferiblemente contiene 1 o más bucles en horquilla, pero también puede no contener bucles en horquilla en absoluto.
- Cualquier secuencia de ácido nucleico capaz de formar uno o más bucles en horquilla que conduzcan a una mayor estabilidad de los transcritos de ARNm, a partir de uno o más genes diana que preferiblemente están implicados en la producción de riboflavina, pueden estar dentro del alcance de la presente invención. La estabilización del ARNm también puede ser posible por un sitio de unión fuerte del ribosoma (RBS) que no forma necesariamente un bucle.
- Los elementos estabilizadores del ARNm como se han definido antes, pueden ser de cualquier longitud, pero preferiblemente consisten en al menos 15 nucleótidos, más preferiblemente al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 nucleótidos, lo más preferiblemente 39-87 nucleótidos, que comprenden preferiblemente 1 o más bucles en horquilla, en particular 1 o 2 bucles en horquilla. La horquilla puede consistir en al menos 4 pares de bases, preferiblemente al menos 8, 10, 12, 15 pares de bases (estando presentes posiblemente apareamientos erróneos de nucleótidos/bucles interiores y/o bucles protuberantes) y los bucles pueden consistir en, p. ej., 3-30 nucleótidos no unidos, preferiblemente 4, 6, 8, 10, 11, 14, 15, 25 o más nucleótidos. La longitud de los bucles interiores preferiblemente es 2, 4, 6, 8, 10, 12 nucleótidos no unidos. Pueden estar presentes uno o más bucles protuberantes, que consiste en, p. ej., 1, 2 o incluso 6 nucleótidos no unidos. La estabilidad termodinámica calculada (ΔG) del bucle en horquilla se puede calcular de acuerdo con los algoritmos desarrollados por Zuker (2003, *Nucleic Acids Res.* 31:3406-3415). En una realización, la estabilidad termodinámica es -2,8 kcal/mol o menor, preferiblemente -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -15, -20 kcal/mol o menor. En otra realización de la presente invención, los elementos estabilizadores del ARNm pueden no comprender ningún bucle en absoluto.
- La estabilidad o integridad de los transcritos de ARNm de *rib* se pueden medir por ejemplo por la determinación de la semivida del ARNm usando estabilización por transferencia Northern y/o PCR en tiempo real como describen, p. ej., Allenby et al., *Microbiology*, 150, p.2619-2628 (2004) o Sharp y Bechhofer, *Mol. Microbiol.* 57, 484-495 (2005). Como se usa en la presente memoria, la estabilidad o integridad del ARNm es mayor (o la degradación del ARNm es menor/está bloqueada) si la semivida de dicho ARNm es mayor en al menos 1%, 2%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% o incluso más de 500%, comparado con la semivida del ARNm de un operón *rib* de tipo natural, es decir, que no contiene una secuencia líder *rib* modificada como la de la presente invención.
- El ADN molde se puede obtener de la misma o una célula hospedante diferente que se va a usar para la producción de riboflavina. Además, el molde para la reacción puede ser ADNc obtenido por transcripción inversa del ARNm preparado a partir de cepas que se sabe o se sospecha que comprenden un polinucleótido de acuerdo con la invención. El producto de la PCR se puede subclonar y secuenciar para asegurar que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una nueva secuencia de ácido nucleico como se describe en la presente memoria, o un equivalente funcional del mismo. Además, una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se puede sintetizar completa o parcialmente usando métodos bien conocidos en la técnica.

La invención también se refiere a polinucleótidos (secuencias líder *rib*) y a su uso para la producción de riboflavina, cuya cadena complementaria hibrida en condiciones restrictivas con un polinucleótido como se define en la presente memoria, y que pueden mejorar la acumulación de transcritos de ARNm de *rib* de longitud completa, intactos.

5 La invención también se refiere a polinucleótidos y su uso para la producción de riboflavina, siendo dichos polinucleótidos al menos 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, idénticos a un polinucleótido mostrado en las SEQ ID NO: 42, 55, 56, 67, 68, 69, 70, 71, o el complemento de las mismas.

10 La invención también se refiere a procedimientos para generar microorganismos que llevan polinucleótidos modificados como se define en la presente memoria, es decir, para manipular genéticamente un microorganismo con el fin de aumentar la acumulación de los transcritos de ARNm de *rib* de longitud completa, intactos, y a su uso para mejorar y/o potenciar el rendimiento y/o la eficacia de la producción de riboflavina.

15 La introducción de una secuencia de ADN como se usa en la presente memoria puede ser, por ejemplo, por adición o inserción de una secuencia de ADN por transformación, conjugación o transducción en el cromosoma de una célula hospedante. Dicha adición o inserción puede ocurrir por recombinación de ADN que puede dar o no también como resultado la retirada o eliminación de nucleótidos del ADN cromosómico. Los métodos mediante los cuales se logra la introducción de secuencias de ADN en una célula hospedante, p. ej., microorganismos, en especial por introducción específica de sitio, son bien conocidos en la técnica y se describen, p. ej., en Sambrook et al., 1989, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, N. Y.; y Ausubel et al. (eds.), 1995, "Current Protocols in Molecular Biology", (John Wiley & Sons, N.Y.).

20 Las células hospedantes adecuadas incluyen células de microorganismos capaces de producir riboflavina, p. ej., que convierten una fuente de carbono dada en riboflavina y que llevan un operón *rib* no modificado que incluye una secuencia líder no modificada o equivalente u homólogo de la misma (que después muta de modo que conduce a un aumento en la producción de riboflavina como se describe en la presente memoria) o en las que se introduce una versión modificada de dicho operón *rib*/secuencia líder *rib* o equivalente del mismo. Dicha célula se llama entonces "célula recombinante" o "célula transformada". Los microorganismos adecuados que llevan dicho operón *rib*/secuencia líder *rib* no modificado o equivalente del mismo se pueden seleccionar de bacterias, tales como, p. ej., bacterias Gram negativas y Gram positivas, sea como cepas de tipo natural, cepas mutantes obtenidas por mutagénesis clásica y métodos de selección o como cepas recombinantes. Las cepas adecuadas que llevan elementos RFN se citan en la tabla 1 y la figura 2 de Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30, 3141-3151, 2002. Los ejemplos de dichas bacterias incluyen *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Deionococcus*, *Therms*, *Fusobacterium*, *Chloroflexus* y *Thermomonospora*. Preferiblemente, el microorganismo o célula hospedante se selecciona del grupo que consiste en *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus licheniformis* y *Streptococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium difficile*, *Lactococcus lactis* u organismos menos relacionados como *Streptomyces coelicolor*, *Thermomonospora fusca*, *Deionococcus radiodurans*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Fusobacterium nucleatum*, y *Chloroflexus aurantiacus*. Es más preferido *B. subtilis*, en particular *B. subtilis* 1A747 o *B. subtilis* 168. También está en el alcance de esta invención el uso de una secuencia líder *rib* desregulada/modificada, p. ej. de *B. subtilis* como se describe en la presente memoria, para sustituir una secuencia líder *rib* original/de tipo natural en uno de los otros microorganismos mencionados antes, o el uso de una secuencia líder *rib* modificada de otro microorganismo mencionado antes frente al operón *rib* de *B. subtilis*.

Dichos microorganismos que llevan dicha secuencia líder *rib* modificada se denominan también microorganismos genéticamente modificados o recombinantes o células hospedantes producidas de modo recombinante/genéticamente manipuladas.

45 Los microorganismos que se pueden usar para la presente invención pueden estar disponibles al público en diferentes fuentes, p. ej., Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Inhoffenstrasse 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania, American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 EE.UU., Agricultural Research Culture Collection (NRRL), Peoria, IL, EE.UU., Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japón (antes: Institute for Fermentation, Osaka (IFO), 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japón) o el *Bacillus* Genetic Stock Center (BGSC), The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 EE.UU.

55 En relación con la presente invención, se entiende que los microorganismos mencionados antes también incluyen sinónimos o basónimos de dichas especies que tienen las mismas propiedades fisiológicas, como se define por el Código internacional de nomenclatura de procariontes. La nomenclatura de los microorganismos, como se usa en la presente memoria es la aceptada oficialmente (en la fecha de presentación de la solicitud de prioridad) por el Comité Internacional de Sistemática de Procariontes (International Committee on Systematics of Prokaryotes) y la división de microbiología aplicada de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (International Union of Microbiological Societies), y publicado en su vehículo de publicación oficial el International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM).

La presente invención se dirige a microorganismos modificados, en donde dicha modificación conduce a un mayor

rendimiento, producción y/o eficacia de riboflavina a partir de sustratos como, p. ej., la glucosa. Esto se puede llevar a cabo aumentando la actividad de la secuencia líder *rib* como se describe en la presente memoria, es decir, disminuyendo el nivel de regulación. Además, un microorganismo como el de la presente invención puede llevar modificaciones adicionales, con la condición de que dichas modificaciones tengan un impacto directo en el rendimiento, producción y/o eficacia de la producción de riboflavina.

Por lo tanto, una realización de la presente invención se refiere a un microorganismo que lleva una secuencia líder *rib* modificada como se describe en la presente memoria y modificación(es) adicional(es), tal como, p. ej., por sustitución del promotor natural del operón *rib* por un promotor fuerte (constitutivo o inducible), tal como p. ej., P_{spo15} o P_{veg}. La introducción de dicho promotor fuerte da como resultado un aumento de la producción de riboflavina que es al menos 50%, 75%, 100%, 200%, 250%, 300%, 350%, 500% o incluso más de 1000%, comparado con un microorganismo que lleva una secuencia líder *rib* modificada en la dirección 3' del promotor natural. Esto se puede aumentar incluso más por la sobreexpresión de uno o más genes *rib*, en particular de *ribA* o por introducción de múltiples copias del operón *rib* en la célula hospedante, tal como se implementa en la cepa RB50 de *B. subtilis* (véase, p. ej., el documento EP 405370). Comparado con la producción de riboflavina en *B. subtilis* RB50, la producción de riboflavina se puede aumentar en al menos 100%, 200%, 250%, 500%, o incluso más de 750% por alteración genética de un microorganismo de modo que lleve una modificación en la secuencia líder *rib* como se define en la presente memoria fusionada con un promotor fuerte. Un microorganismo que lleva una secuencia líder *rib* modificada como se define en la presente memoria, opcionalmente combinado con la introducción de un promotor fuerte y/o copia/copias múltiples del operón *rib* se puede alterar adicionalmente mediante un desacoplamiento del crecimiento de la producción de riboflavina, tal como, p. ej., mediante la introducción de una auxotrofia como se describe en el documento EP 1186664 para, p. ej., biotina, y/o además combinado con la introducción de gen de transcetolasa modificado como se describe, p. ej., en el documento WO 07/051552.

La presente invención proporciona una secuencia líder *rib* modificada como se define en la presente memoria, que lleva (i) una o más mutaciones *ribO* en el elemento RFN que corresponde a los nucleótidos 25 a 164 mostrados en la SEQ ID NO: 42 junto con modificaciones en el extremo 3' de la secuencia líder *rib*, o (ii) eliminaciones de al menos las secuencias correspondientes de acuerdo con los nucleótidos 166 a 263 mostrados en la SEQ ID NO: 42, en donde dichas secuencias líderes *rib* están fusionadas con promotores fuertes, tales como p. ej., P_{spo15} o P_{veg}.

Una cepa particular preferida para la producción de riboflavina es *B. subtilis*. Una cepa más preferida es *B. subtilis* RB50::[pRF69]_n que contiene múltiples (n) copias (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 copias) de pRF69 que codifica un operón *rib* modificado con el promotor fuerte P_{spo15} para potenciar la transcripción de los genes *rib* (véase, p. ej., el documento EP 405370 y Perkins et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 22:8-18, 1999, para la construcción de la cepa y las condiciones de cultivo para dar la producción de riboflavina). *B. subtilis* RB50 y el plásmido pRF69 pueden estar disponibles en NRRL (número de acceso B 18502) y ATCC (número de acceso ATCC 68338), respectivamente.

De acuerdo con un objeto adicional de la presente invención, se proporciona el uso de un polinucleótido modificado como se ha definido antes o un microorganismo que está genéticamente manipulado con dichos polinucleótidos para la producción de riboflavina.

La invención también se refiere a procedimientos para la expresión de un operón *rib* (modificado) que incluye una secuencia líder *rib* modificada en un microorganismo, a procedimientos para la producción de polinucleótidos (modificados) como se ha definido antes, en un microorganismo y a procedimientos para la producción de dichos microorganismos modificados capaces de producir riboflavina. Todos estos procedimientos pueden comprender la etapa de alterar un microorganismo, en donde "alterar" como se usa en la presente memoria abarca el procedimiento de "alterar genéticamente" de modo que se puedan mejorar tanto el rendimiento y/o la productividad de riboflavina como la acumulación de ARNm de *rib* de longitud completa, intacto, comparado con el microorganismo de tipo natural. El término "alterar" también incluye la generación de polinucleótidos modificados como se describe en la presente memoria, en particular la modificación de la secuencia líder *rib*. Como se usa en la presente memoria, el "rendimiento de riboflavina mejorado" significa un aumento de al menos 50%, 75%, 100%, 200%, 250%, 300%, 350%, 500% o incluso más de 10000% o 100000% (véase antes), comparado con un microorganismo de tipo natural/no modificado, es decir, un microorganismo que no está genéticamente alterado.

La expresión "genéticamente manipulado" o "genéticamente alterado" significa la alteración científica de la estructura del material genético en un organismo vivo. Implica la producción y uso de ADN recombinante. Más en particular, se usa para distinguir el organismo genéticamente manipulado o modificado del organismo que se encuentra de forma natural. La manipulación genética se puede hacer por una serie de técnicas conocidas en la técnica, tal como, p. ej., sustitución de genes, amplificación de genes, alteración de genes, adición, inserción, eliminación, transfección, transformación usando plásmidos, virus u otros vectores. Un organismo genéticamente modificado, p. ej., microorganismo genéticamente modificado, se denomina a menudo también un organismo recombinante, p. ej., microorganismo recombinante. Un microorganismo genéticamente manipulado lleva una secuencia líder *rib* modificada como se ha definido antes.

De acuerdo con la invención, se proporciona una célula hospedante genéticamente manipulada/producida de forma recombinante (denominada también célula recombinante o célula transformada) que lleva dicha secuencia líder *rib*

modificada como la de la presente invención, de modo que se mejora el rendimiento, producción y/o eficacia de la producción de riboflavina. La célula hospedante se puede seleccionar de un microorganismo capaz de producir riboflavina a partir de una fuente de carbono dada, en particular *Bacillus*, preferiblemente *B. subtilis*.

5 Una "célula transformada" o "célula recombinante" es una célula en la que (o en un ancestro de la cual) se ha introducido, mediante técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico de acuerdo con la invención, que conduce a una acumulación mayor y/o potenciada de ARNm de *rib* de longitud completa, intacto. También incluye la introducción de una o más mutaciones en una secuencia líder *rib* de tipo natural ya presente en dicha célula. Las células hospedantes adecuadas incluyen células de microorganismos capaces de producir riboflavina, p. ej., de convertir una fuente de carbono dada en riboflavina como se ha definido antes. Las cepas útiles para llevar a cabo dicho procedimiento de fermentación se han citado antes y se conocen en la técnica.

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

15 El término "aislado" significa que el material se saca de su entorno original (p. ej., el entorno natural si se encuentra de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido que se encuentra de forma natural presente en un microorganismo vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido, separado de parte o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos podrían ser parte de una composición y todavía estar aislados en cuanto que dicho vector o composición no es parte de su entorno natural.

20 Como se usa en la presente invención, el término "gen" se refiere a moléculas de ácido nucleico que se pueden aislar del ADN cromosómico, que incluyen un marco de lectura abierto que codifica una proteína, p. ej., proteínas implicadas en la síntesis de riboflavina, tal como por ejemplo enzimas de la ruta biosintética de la riboflavina de *B. subtilis*.

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

30 Como se usa en la presente memoria, los términos "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" se pretende que incluyan moléculas de ADN (p. ej., ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (p. ej., ARNm) y análogos de ADN o ARN generados usando análogos nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. El ácido nucleico se puede sintetizar usando análogos de oligonucleótidos o derivados (p. ej., nucleótidos de inosina o fosfortioato). Dichos oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen capacidades de emparejamiento de bases alteradas o mayor resistencia a nucleasas.

35 Salvo que se indique otra cosa, todas las secuencias de nucleótidos determinadas por secuenciación de una molécula de ADN en la presente memoria, se determinaron usando un secuenciador de ADN automático. Por lo tanto, como se conoce en la técnica, para cualquier secuencia de ADN determinada por este procedimiento automático, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en la presente invención puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas por automatización son típicamente al menos aproximadamente 90% idénticas, más típicamente al menos aproximadamente 95% a al menos aproximadamente 40 99,9% idénticas a la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real se puede determinar de forma más precisa mediante otros procedimientos que incluyen métodos de secuenciación manual del ADN, bien conocidos para los expertos en la técnica.

El experto en la técnica es capaz de identificar dichas bases identificadas de forma errónea y sabe cómo corregir dichos errores.

45 Los polinucleótidos de acuerdo con la invención independientemente de si están modificados o no están modificados, se pueden usar como sondas de hibridación o cebadores de la PCR. Está incluido además el uso de polinucleótidos como se describen en la presente memoria, para la potenciación y/o mejora de la función o actividad de secuencias líder *rib* homólogas en otros organismos que están estrechamente relacionados con *Bacillus* y como se ha descrito antes como células hospedantes adecuadas. Como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencias líder *rib* homólogas" abarca secuencias líder *rib* de diferentes organismos de acuerdo con la figura 2 en Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30, 3141-3151, 2002, en donde se han alineado diferentes elementos RFN. Con este alineamiento, el experto en la técnica puede identificar fácilmente partes de la secuencia líder *rib* que corresponden a las descritas en la presente invención procedentes de *B. subtilis* con el fin de generar secuencias líder *rib* modificadas en los organismos citados como se describe en la presente invención.

55 La invención también se refiere a un polinucleótido aislado que puede hibridar en condiciones restrictivas, preferiblemente en condiciones altamente restrictivas, con un polinucleótido como el de la presente invención, tal como por ejemplo, un polinucleótido mostrado en las SEQ ID NO: 42, 52, 53, 67, 68, 69, 70, 71, 81, 82, preferiblemente seleccionado de las SEQ ID NO: 42, 67, 68, 69, 71, 70. Ventajosamente, dicho polinucleótido se

puede obtener de un microorganismo capaz de producir riboflavina, en particular de *Bacillus subtilis*.

Como se usa en la presente invención, el término "hibridar" se pretende que describa condiciones para la hibridación y el lavado en las que las secuencias de nucleótidos al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente 80%, incluso más preferiblemente al menos de aproximadamente 85% a 90%, lo más preferiblemente al menos 95% homólogas entre sí, típicamente permanecen hibridadas unas con otras.

Un ejemplo preferido, no limitante, de condiciones de hibridación restrictivas son la hibridación en 6x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 1x SSC, SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, más preferiblemente a 60°C e incluso más preferiblemente a 65°C.

Las condiciones altamente restrictivas incluyen incubaciones a 42°C durante un periodo de varios días, tal como 2-4 días, usando una sonda de ADN marcada, tal como una sonda de ADN marcada con digoxigenina (DIG), seguido de uno o más lavados en 2x SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente y uno o más lavados en 0,5x SSC, SDS al 0,1% o 0,1x SSC, SDS al 0,1% a 65-68°C. En particular, las condiciones altamente restrictivas incluyen, por ejemplo, de 2 h a 4 días de incubación a 42°C usando una sonda de ADN marcada DIG con digoxigenina (preparada usando, p. ej., un sistema de marcaje con DIG; Roche Diagnostics GmbH, 68298 Mannheim, Alemania) en una solución tal como solución de DigEasyHyb (Roche Diagnostics GmbH) con o sin ADN de esperma de salmón 100 µg/ml, o una disolución que comprende 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), dodecilsulfato sódico al 0,02%, N-lauroilsarcosina al 0,1%, y reactivo de bloqueo al 2% (Roche Diagnostics GmbH), seguido de lavado de los filtros dos veces durante 5 a 15 minutos en 2x SSC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente y después lavando dos veces durante 15-30 minutos en 0,5x SSC y SDS al 0,1% o 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 65-68°C.

El experto en la técnica sabrá qué condiciones aplicar para las condiciones de hibridación restrictivas y altamente restrictivas. Se encuentra fácilmente disponible orientación adicional en relación con dichas condiciones en la técnica, por ejemplo, en Sambrook et al., 1989, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, N. Y.; y Ausubel et al. (eds.), 1995, "Current Protocols in Molecular Biology", (John Wiley & Sons, N.Y.).

Además, se pueden preparar oligonucleótidos que corresponden o pueden hibridar con secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención, por técnicas sintéticas convencionales, p. ej., usando un sintetizador de ADN automático.

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

El experto en la técnica será consciente del hecho de que están disponibles varios programas de ordenador diferentes para determinar la homología entre las dos secuencias. Por ejemplo, una comparación de secuencias y determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede llevar a cabo usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48, 444-453, 1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.accelrys.com>), usando bien una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El experto en la técnica apreciará que todos estos parámetros diferentes darán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad global para dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan diferentes algoritmos.

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

Un método útil para construir un microorganismo como el de la presente invención, es decir, para introducir una secuencia líder *rib* modificada en la región 5' no traducida de un gen implicado en la producción de riboflavina, se da en los ejemplos, en donde la introducción de una secuencia líder *rib* modificada descrita en la presente invención, conduce a transcritos de ARNm de longitud completa, intactos del o de los respectivos genes *rib*, que además

conduce a un mayor rendimiento y/o productividad de la riboflavina. La selección de microorganismos recombinantes se puede llevar a cabo por introducción de un gen de resistencia a antibiótico, tal como, por ejemplo, cloranfenicol, neomicina, estreptomina, espectomicina, o similares.

5 La presente invención se dirige a la producción fermentativa de riboflavina usando un microorganismo que lleva una secuencia líder *rib* modificada. Como se usa en la presente memoria, el término "riboflavina" incluye, pero no se limita a riboflavina, mononucleótido de flavina (FMN) dinucleótido de flavina y adenina (FAD), así como a precursores, derivados y sales de riboflavina, FMN o FAD, tales como, p. ej., riboflavina-5-fosfato o riboflavina-5-fosfato sódico. Los precursores y/o derivados de riboflavina, FMN y FAD se pueden seleccionar, p. ej., de DRAPP; 10 5-amino-6-ribosilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinadiona-5'-fosfato; 2,5-diamino-6-ribitilamino-4 (3H)-pirimidinona-5'-fosfato; 5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinadiona-5'-fosfato; 5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H,3H)-pirimidinadiona; 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (DMRL); y flavoproteínas. Los términos "riboflavina" y "vitamina B2" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Los genes implicados en la biosíntesis de riboflavina así como los métodos para la producción fermentativa de riboflavina, en particular la producción fermentativa usando cepas de *Bacillus*, son conocidos (véase, p. ej., el documento EP 405370 o Ullman's Encyclopedia of Industrial 15 Chemistry, 7ª Edición, 2007, Capítulo "Vitamins"). Estos métodos también se pueden aplicar para la producción de riboflavina usando cepas mutantes que comprenden secuencias líder *rib* modificadas como se describen en la presente memoria.

20 Se pueden usar varios sustratos como fuente de carbono en un procedimiento de la presente invención, es decir, un procedimiento para la producción de riboflavina como se ha mencionado antes. En particular, se pueden seleccionar fuentes de carbono de compuestos que consisten en 3, 5 o 6 átomos de carbono, tales como p. ej., D-glucosa, glicerol, jarabe, dextrosa, almidón, sacarosa o ribosa. Preferiblemente, la fuente de carbono es D-glucosa. La expresión "fuente de carbono", "sustrato" y "sustrato de producción" en relación con el procedimiento anterior, se usan de forma intercambiable en la presente invención.

25 Un medio como se usa en la presente invención para el procedimiento anterior que usa un microorganismo modificado puede ser cualquier medio adecuado para la producción de riboflavina. Típicamente, el medio es un medio acuoso que comprende, por ejemplo, sales, sustrato(s) y un determinado pH. El medio en el que el sustrato se convierte en riboflavina se denomina también el medio de producción.

30 La "fermentación" o "producción" o "procedimiento de fermentación" como se usa en la presente memoria, puede ser el uso de células en crecimiento usando medios, condiciones y procedimientos conocidos para el experto en la técnica, o el uso de células que no están en crecimiento, llamadas en reposo, después de que hayan sido cultivadas usando medios, condiciones y procedimientos conocidos para el experto en la técnica, en condiciones adecuadas para la conversión de sustratos adecuados en riboflavina.

35 La riboflavina producida se puede recuperar de las células por cualquier medio adecuado. La recuperación significa, por ejemplo, que la riboflavina producida se puede separar del medio de producción. Opcionalmente, el producto de fermentación así producido se puede procesar más, p. ej., purificar.

40 En relación con el procedimiento anterior que usa un microorganismo, en un aspecto, la etapa de crecimiento se puede llevar a cabo en un medio acuoso, es decir, el medio de crecimiento, complementado con los nutrientes adecuados para el crecimiento normalmente en condiciones aerobias. El cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un modo discontinuo, discontinuo alimentado, semicontinuo o continuo, en donde se prefiere el modo discontinuo alimentado o semicontinuo.

45 El periodo de cultivo puede variar dependiendo, por ejemplo, del hospedante, pH, temperatura y medio nutriente que se va a usar, y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 10 h a aproximadamente 10 días, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 días, más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 días, dependiendo del microorganismo. El experto en la técnica conocerá las condiciones de cultivo óptimas de microorganismos adecuados.

50 El cultivo se puede llevar a cabo, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7,0, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, más preferiblemente aproximadamente de 6,5 a 7,5. Un intervalo de temperatura adecuado para llevar a cabo el cultivo puede ser, por ejemplo de aproximadamente 13°C a aproximadamente 70°C, preferiblemente de aproximadamente 35°C a aproximadamente 39°C, más preferiblemente de aproximadamente 30°C a aproximadamente 39°C, y lo más preferiblemente de aproximadamente 36°C a aproximadamente 39°C. El medio de cultivo para el crecimiento normalmente puede contener nutrientes como fuentes de carbono asimilables, p. ej., D-glucosa, glicerol, jarabe, dextrosa, almidón, sacarosa o ribosa; y fuentes de nitrógeno digeribles tales como sustancias orgánicas, p. ej., peptona, extracto de levadura y aminoácidos. El medio puede ser con o sin urea y/o agua de remojo del maíz y/o levadura de panadería. También se pueden usar 55 diferentes sustancias inorgánicas como fuentes de nitrógeno, p. ej., nitratos y sales de amonio. Además, el medio de crecimiento normalmente puede contener sales inorgánicas, p. ej., sulfato magnésico, sulfato de manganeso, fosfato potásico y carbonato de calcio. Las células obtenidas usando los procedimientos descritos antes, después se pueden incubar más esencialmente en los mismos modos, condiciones de temperatura y pH descritos antes, en presencia de sustratos tal como se ha descrito antes, de modo que conviertan estos sustratos en el producto de

fermentación objetivo deseado. La incubación se puede llevar a cabo en un medio rico en nitrógeno, que contiene, por ejemplo, fuentes de nitrógeno orgánico, p. ej., nitratos y sales de amonio, en cuyo caso las células podrán crecer más mientras producen el producto de fermentación deseado. Alternativamente, la incubación se puede llevar a cabo en un medio pobre en nitrógeno, en cuyo caso las células no crecerán sustancialmente, y estarán en un modo de célula en reposo, o modo de biotransformación. En todos los casos, el medio de incubación puede contener también sales inorgánicas, p. ej., sulfato magnésico, sulfato de manganeso, fosfato potásico, y cloruro de calcio. Un ejemplo de un medio adecuado para la producción de riboflavina se describe en el documento WO 04/113510 (VF-medium), que es particularmente útil con respecto a *Bacillus*.

Los términos "producción" o "productividad" están reconocidos en la técnica e incluyen la concentración de riboflavina formada dentro de un periodo de tiempo dado y un volumen de fermentación dado (p. ej., kg de producto por hora por litro). La expresión "eficacia de la producción" incluye el tiempo necesario para lograr un nivel particular de producción (por ejemplo, cuánto tarda la célula alcanzar una tasa de producción particular de un producto de fermentación). El término "rendimiento" está reconocido en la técnica e incluye la eficacia de la conversión de la fuente de carbono en el producto (es decir, riboflavina). Esto, en general, se escribe como, por ejemplo, kg de producto por kg de fuente de carbono. Por "aumento del rendimiento y/o producción/productividad" del compuesto se entiende que aumenta la cantidad de moléculas recuperadas, o de moléculas recuperadas útiles de este compuesto en una cantidad dada de cultivo a lo largo de una cantidad de tiempo dado.

Los métodos analíticos para determinar el rendimiento/productividad de la riboflavina son conocidos en la técnica. Dichos métodos pueden incluir, pero no se limitan a HPLC o el uso de cepas indicadoras (véase, p. ej., Bretzel et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22, 19-26, 1999).

Figuras

La figura 1 muestra la secuencia líder *rib* de *Bacillus subtilis* que incluye las regiones flanqueadoras 5' y 3' de la misma. La secuencia líder *rib* está situada entre las posiciones de nucleótidos 562 a 857. (A) operón *rib* de tipo natural en donde los elementos reguladores 5' están indicados en negrilla ("**ttgcgt**" y "**tataat**", respectivamente) así como inicio de la transcripción ("**A**") que corresponde al primer nucleótido de la secuencia líder *rib* como se muestra en la SEQ ID NO: 42. (B) secuencia líder *rib* en donde las posiciones de las mutaciones *ribO* tales como la triple *ribO*, RK41 y RK1a se indican en negrilla. (C) a (I) la secuencia líder *rib* en donde la posición de la región flanqueadora derecha, terminadora, bucle en horquilla derecha, bucle en horquilla izquierda, eliminación SWITCH, eliminación *mro175*, y la secuencia líder *rib* entera respectivamente, se indican subrayadas. Para explicaciones adicionales véase el texto, en particular los ejemplos.

La figura 2 muestra las diferentes etapas para construir un microorganismo genéticamente alterado que lleva un elemento estabilizador de ARNm (St) en la dirección 3' de un promotor P_{spo15} constitutivo fuerte a través de LFH-PCR que está situado en el extremo 5' del operón *rib* que comprende los genes *ribD*, *ribE*, *ribA*. Para la selección de microorganismos recombinantes, se usa el casete de resistencia al antibiótico cloranfenicol (Cm). (A) Sustitución del promotor natural por un promotor fuerte usando LFH-PCR. (B) Introducción de elementos estabilizadores del ARNm. Para explicaciones adicionales véase el texto, en particular los ejemplos.

Los siguientes ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención de ninguna forma.

Ejemplos

Los siguientes medios a los que se hace referencia en los ejemplos se describen en el documento WO 04/106557: Medio de caldo de agar sangre triptosa (TBAB), medio de caldo de extracto de levadura-infusión de ternera (VY), 10X sales Spizizen y medio mínimo (MM). Además, se han usado los siguientes medios:

100X Solución de oligoelementos A: 12,5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,55 g de $CaCl_2$; 1,35 g de $FeCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,1 g de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0,17 g/l de $ZnCl_2$; 0,043 g de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,06 g de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,06 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; adición hasta 1 l de H_2O , tratado en autoclave.

5X Solución salina mínima: K_2SO_4 0,057 M; $K_2HPO_4 \cdot 5H_2O$ 0,31 M; KH_2PO_4 0,22 M; Na-citrato $\cdot 7H_2O$ 0,017 M; $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0,004 M, pH 7,0, tratado en autoclave.

100X Solución de oligoelementos B: 0,55 g de $CaCl_2$; 0,17g de $ZnCl_2$; 0,043 g de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,06 de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,06 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; adición hasta 1 l de H_2O , tratado en autoclave.

Medio de cribado de riboflavina (RSM): 200 ml de 10X sales de Spizizen; 10 ml de 100X solución de oligoelementos A; 2 ml de glucosa al 50%; 36 ml de rafinosa al 25%; 10 ml de extracto de levadura al 10%; adición hasta 1 l de H_2O .

Medio mínimo de Spizizen (SMM): 100 ml de 10X sales de Spizizen; 10 ml de glucosa al 50%; 1 ml de glutamato sódico al 40%; 10 ml de solución de oligoelementos A; adición hasta 1 l de H_2O .

La producción de riboflavina en matraces de agitación se llevó a cabo como sigue: se inocularon las cepas a partir

de soluciones madre en glicerol congeladas en 5 ml de medio rico VY y se cultivaron durante la noche a 37°C con una agitación de 280 rpm. Las células se recogieron por centrifugación y se volvieron a suspender en 1 ml de RSM (véase antes). Se usaron 250 µl de la suspensión de células para la inoculación de 25 ml de RSM en matraces de agitación con deflectores de 250 ml. Después de 48 h de incubación a 39°C con una agitación de 220 rpm, se extrajeron 500 µl de cultivo y se mezclaron 35 µl de NaOH 4 N con la muestra durante 1 min a temperatura ambiente permitiendo disolver los cristales de riboflavina. Las muestras se neutralizaron por adición de 465 µl de tampón de fosfato potásico 1 M (pH 6,8) y se sedimentaron por centrifugación (5 min, 13200 rpm). El líquido sobrenadante se usó para la determinación por HPLC de las concentraciones de riboflavina y dos productos secundarios: 6,7-dimetil-8-ribitol-lumazina (DMRL) y oxolumazina. Además, se extrajo una segunda muestra de cultivo y después de centrifugación (5 min, 13200 rpm) se usó para determinar las concentraciones de la glucosa y rafinosa residual en el medio para el cálculo del rendimiento de riboflavina respecto a la fuente de carbono.

Las muestras de los cultivos de los matraces de agitación se analizaron por HPLC. La cromatografía se llevó a cabo en un sistema de HPLC Agilent 1100 equipado con un inyector automático termostatzado, una matriz de diodos y un detector de fluorescencia. La separación se llevó a cabo en una columna Supelcosil LC-8DB-5µ (150 mm x 4,6 mm) equipada con una precolumna de 4 mm LC-8DB. Se usó una mezcla de ácido acético 0,1 M y metanol como fase móvil. La elución con gradiente se aplicó empezando con 2% de metanol (constante durante 5 min) y continuando hasta 50% de metanol en 15 min. La columna se mantuvo a 20°C. La señal se registró por UV a 280 nm. La riboflavina se separó bien de las impurezas (p. ej., los productos secundarios: DMRL y oxolumazina) y eluyeron a 15,2 min. La calibración se basa en el material de referencia obtenido de Fluka. El método se calibra de 10 µg/ml a 1 mg/ml de riboflavina.

Además, se analizó la concentración de glucosa y rafinosa en el caldo de cultivo mediante un sistema de HPLC de la serie Agilent 1100 usando una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de UV y uno de índice de refracción. La separación se logró en una columna CAPCELL PAK NH2 UG80 (4,6 mm x 250 mm, 5 µ) (Shiseido). La temperatura óptima de la columna era 35°C. La fase móvil era una mezcla de acetonitrilo y agua DI en una relación 65/35. El caudal era 1,0 ml/min y el volumen de inyección se fijó en 5 µl. Se vigiló la señal del índice de refracción y se usó para la detección. El intervalo de calibración para cada compuesto es de 0,5 mg/ml a 30 mg/ml.

Ejemplo 1: Generación de cepas auxótrofas para riboflavina

Para la manipulación genética de la secuencia líder y promotora original del operón de riboflavina de *B. subtilis*, el promotor de riboflavina, la secuencia líder 5' y la parte 5' de *ribD* (*ribG*) que codifica el dominio de desaminasa de RibD se sustituyeron por un casete de resistencia a la neomicina (*neo*) obtenido del plásmido pUB110 (Itaya et al., 1989, *Nucleic Acid Res.* 17:4410) generando una cepa auxótrofa para la riboflavina de *B. subtilis* BS3813. El ADN genómico obtenido de la cepa de *B. subtilis* 1A747 (SPβ^c, protótrofa), que es un derivado de *B. subtilis* 168 (*trpC2*), se ha obtenido del *Bacillus* Genetic Stock Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio 43210 EE.UU.

Para la construcción de la cepa, se usó la reacción en cadena de la polimerasa de homología flanqueadora larga (LFH-PCR) para generar fragmentos de ADN que contenían el casete de resistencia *neo* de 1236 pb con la región en la dirección 5' de 526 pb del promotor *P_{rib}* natural (flanqueador 5') y el extremo 3' de 502 pb el gen *ribD* (flanqueador 3'). Por lo tanto, se amplificaron primero por PCR 3 fragmentos de ADN, el flanqueador 5', casete de resistencia *neo* y flanqueador 3'. Los fragmentos de ADN flanqueador 5' y flanqueador 3' se generaron como sigue: Se añadieron 1 µl de una solución 100 µM de cebadores p50 (SEQ ID NO: 6) junto con p51 (SEQ ID NO: 7) o cebadores p44 (SEQ ID NO: 4) junto con p45 (SEQ ID NO: 5) a 0,1 µg de ADN cromosómico *B. subtilis* 1A747 en un volumen de reacción de 50 µl que contenía 1 µl de dNTP 10 mM, 5 µl de 10X tampón y 0,5 µl de polimerasa *Pfu* (Stratagene). Para la generación del fragmento de ADN que contiene el casete de resistencia *neo*, se añadieron 1 µl de una solución 100 µM de cebadores p9 (SEQ ID NO: 2) junto con p10 (SEQ ID NO: 3) a 0,05 µg de ADN pUB110 que contiene el casete de resistencia *neo* en un volumen de reacción de 50 µl que contenía 1 µl de dNTP 10 mM, 5 µl de 10X tampón y 0,5 µl de polimerasa *Pfu* (Stratagene). Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en 35 ciclos de tres etapas secuenciales: (i) etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 s; (ii) etapa de reasociación a 52°C durante 30 s; (iii) etapa de elongación a 72°C durante 1 min. Los ciclos de la PCR estaban precedidos de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 3 min. Los tres productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se extrajeron del gel usando el kit de extracción en gel MinElute (Qiagen). En la reacción de LFH-PCR final, los productos de la PCR purificados (flanqueador 5', casete de resistencia *neo*, flanqueador 3') se ensamblaron: se añadieron 1 µl de una solución 100 µM de cebadores p45 junto con p51, 1 µl del producto de la PCR flanqueador 5' (50 ng), 1 µl del producto de la PCR flanqueador 3' (50 ng) y 1 µl de casete de resistencia (100 ng) para dar un volumen de reacción final de 50 µl que contenía 1 µl de dNTP 10 mM, 5 µl de 10X tampón y 0,5 µl de polimerasa *Pfu* (Stratagene). La reacción de LFH-PCR se llevó a cabo en 35 ciclos de tres etapas secuenciales: (i) etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 s; (ii) etapa de reasociación a 52°C durante 30 s; (iii) etapa de elongación a 72°C durante 2,5 min. Los ciclos de la PCR estaban precedidos de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 3 min. El producto de la LFH-PCR ensamblado se purificó usando el kit de purificación de PCR QiaQuick (Qiagen). El producto de la LFH-PCR purificado (2 µg) se usó para la transformación de células competentes de *B. subtilis* 1A747. Se seleccionaron los transformantes resistentes a la neomicina (Nm^r) en placas TBAB que contenían neomicina 2 mg/l y riboflavina 100 mg/l. El genotipo correcto de la cepa auxótrofa para riboflavina y Nm^r BS3813 resultante, se confirmó por dos reacciones de PCR usando los cebadores p45 junto con p10, y cebadores p51 junto con p9, y ADN cromosómico de los transformantes como ADN molde. Las reacciones de

la PCR se llevaron a cabo usando condiciones de reacción estándar como se ha descrito antes para la generación de los fragmentos de ADN flanqueador 5' y flanqueador 3'. Además, la secuencia de *ribD* de BS3813 se confirmó por secuenciación.

5 La transducción de la construcción de eliminación se llevó a cabo con fago PBS-1 de acuerdo con el método descrito en el documento WO 07/051552 (véase el ejemplo 6), en donde el lisado de BS3813 se usó para la transducción de la cepa sobreproductora de riboflavina de *B. subtilis* BS3534 que lleva una mutación en el gen de transcetolasa (para la construcción de BS3534 véase el documento WO 07/051552). BS3534 se basa en la cepa sobreproductora de riboflavina de *B. subtilis* RB50, que se describe con detalle en el documento EP 405370 y disponible con el número de depósito en NRRL B-18502. Se seleccionaron los transductores Nm^r en placas de agar TBAB que
10 contenían neomicina 2 mg/l y riboflavina 100 mg/l. El genotipo de los transductores aislados se confirmó por PCR como se ha descrito antes. La cepa resultante se designó BS3798.

Ejemplo 2: Generación de cepas que llevan secuencias líder *rib* modificadas

15 Se introdujeron dos tipos de mutaciones en la secuencia líder *rib* para desregular la transcripción de los genes *rib* en donde el tipo I se refiere a mutaciones *ribO* y el tipo II se refiere a eliminaciones (parciales) de la secuencia líder *rib* (véase la figura 1).

Se generaron mutaciones *ribO*, es decir C85T denominada "RK41", G121A denominada "RK1a" y una combinación triple G39A-G40A-G41A denominada "triple *ribO*". Para los mutantes de tipo II, se eliminaron las siguientes partes de la secuencia líder *rib*, en donde la numeración de nucleótidos se refiere a la secuencia líder *rib* mostrada en la SEQ ID NO: 42 aislada de *B. subtilis*: eliminación de los nucleótidos 250 a 257 (SEQ ID NO: 36) denominada "eliminación del bucle en horquilla derecho", eliminación de los nucleótidos 231 a 238 (SEQ ID NO: 37) denominada "eliminación del bucle en horquilla izquierdo", eliminación de los nucleótidos 239 a 263 (SEQ ID NO: 38) denominada "eliminación
20 flanqueadora derecha", eliminación de los nucleótidos 231 a 263 (SEQ ID NO: 39) denominada "eliminación de terminador", eliminación de los nucleótidos 166 a 263 (SEQ ID NO: 40) denominada "eliminación SWITCH", eliminación de los nucleótidos 135 a 263 (SEQ ID NO: 41) denominada "eliminación mro175" y una eliminación de la secuencia líder completa, es decir, los nucleótidos 1 a 263 (SEQ ID NO: 42) denominada "eliminación de la
25 secuencia líder". En el caso de la eliminación de mro175, también tuvo lugar una inserción de cuatro nucleótidos (5'-ATGG-3').

La construcción de las cepas que llevan las secuencias líder *rib* modificadas junto con el promotor de *rib* (SEQ ID NO: 45 - 54) se llevó a cabo básicamente mediante dos reacciones de PCR de acuerdo con el protocolo/condiciones indicadas en el ejemplo 1, en donde en una primera reacción de PCR los dos fragmentos de ADN designados
30 flanqueador 5' y flanqueador 3' se generaron usando el ADN cromosómico de *B. subtilis* 1A747. En una segunda reacción de PCR de acuerdo con el protocolo/condiciones descrito en el ejemplo 1, estos dos fragmentos de la PCR se ensamblaron usando los cebadores p45 y p51. Las parejas de cebadores respectivas para las primeras reacciones de la PCR, es decir, cebadores para la generación del flanqueador 5' y cebadores para la generación del
35 flanqueador 3' que dan como resultado las mutaciones/eliminaciones deseadas (véase antes) se citan en la tabla 1, columnas 2 y 3, respectivamente. Después de purificación usando el kit de purificación QiaQuick PCR (Qiagen), se usaron 2 µg del producto de la PCR de longitud completa para la transformación de células *B. subtilis* BS3813 competentes (véase el ejemplo 1). Las células se cultivaron en placas SMM. Los transformantes protótrofos para riboflavina se suspendieron en 1 ml de solución de NaCl al 0,9%. Se cultivaron 100 µl de una dilución de 500 veces
40 de la suspensión de células original en placas de agar TBAB. Se transfirieron colonias individuales a placas de agar TBAB recientes y a placas de agar TBAB complementadas con Nm 2 mg/l y riboflavina 100 mg/l. Los transformantes correctos eran sensibles a la neomicina y por lo tanto crecían solo en placas de agar TBAB y no crecían en placas complementadas con neomicina. Además, el genotipo se confirmó por la secuenciación del promotor de *rib* y *ribD* introducidos nuevos. Las cepas nuevas generadas de *B. subtilis* que contenían las respectivas
45 mutaciones/eliminaciones en la secuencia líder *rib* se designaron como se muestra en la tabla 1, columna 4.

Se prepararon los lisados de PBS-1 de las nuevas cepas generadas y se usaron para la transducción de BS3798 (generada en el ejemplo 1). Las células transducidas se seleccionaron en placas SMM. Los transductores protótrofos para riboflavina de *B. subtilis* se suspendieron en 1 ml de solución de NaCl al 0,9%. Se cultivaron 100 µl de una dilución de 500 veces de la suspensión de células original en placas de agar TBAB. Se transfirieron colonias
50 individuales a placas de agar TBAB recientes y a placas de agar TBAB complementadas con Nm 2 mg/l y riboflavina 100 mg/l. Los transductores correctos crecían solo en placas de agar TBAB y por lo tanto eran sensibles a la neomicina. Las nuevas cepas transducidas se denominaron como se indica en la tabla 1, columna 5.

Tabla 1: Parejas de cebadores usadas para la construcción de los fragmentos flanqueador 5' y flanqueador 3', respectivamente, que dan como resultado secuencias líder *rib* modificadas y denominación de las cepas resultantes sea transformadas con dichos fragmentos de la PCR o transducidas con los lisados respectivos (para explicación adicional véase el texto).

Denominación de la mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Pareja de cebadores del flanqueador 3' (SEQ ID NO)	Pareja de cebadores del flanqueador 5' (SEQ ID NO)	Cepas transformadas	Cepas transducidas
RK1a	p74 / p51 (20 / 7)	p45 / p75 (5/21)	BS3833	BS3839
RK41	p72 / p51 (16 / 7)	p45 / p73 (5 / 18)	BS3958	BS3987, BS3988, BS3989
triple <i>ribO</i>	p72a / p51 (17 / 7)	p45 / p73a (5 / 19)	BStripe_ribO	
eliminación flanqueador derecho	p56 / p51 (8 / 7)	p45 / p57 (5 / 9)	BS3814	BS3832
eliminación terminador	p58 / p51 (10 / 7)	p45 / p59 (5 / 11)	BS3815	BS3821
eliminación del bucle en horquilla derecho	p76 / p51 (22 / 7)	p45 / p77 (5 / 23)	BS3842	BS3846
eliminación del bucle en horquilla izquierdo	p79 / p51 (25 / 7)	p45 / p78 (5 / 24)	BS3847	BS3859
eliminación SWITCH	p80 / p51 (26 / 7)	p45 / p81 (5 / 28)	BS3867	BS3900, BS3916
eliminación <i>mro175</i>	p80a / p51 (27 / 7)	p45 / p81a (5 / 29)	BSmro175	
eliminación secuencia líder	p96 / p51 (31 / 7)	p45 / p95 (5 / 30)	BSleader	

5 Cepas transformadas: designación de las cepas de *B. subtilis* después de transformación de *B. subtilis* BS3813 (neo-resistente; B2-auxótrofo basado en la cepa natural *B. subtilis* 1A747) con el respectivo fragmento de la PCR; Cepas transducidas: designación de cepas de *B. subtilis* después de transducción de *B. subtilis* BS3798 (neo-resistente, B2-auxótrofo basado en *B. subtilis* RB50) con lisado de las respectivas cepas de acuerdo con la columna 4. Para una explicación adicional véase el texto.

10 Se analizó en las nuevas cepas generadas la producción de riboflavina en el cribado de los matraces de agitación como se ha descrito antes. Después de 48 h, la riboflavina de una muestra de 500 µl se disolvió por la adición de NaOH 4 N, se neutralizó y después de centrifugación, la concentración de riboflavina de la muestra procesada se determinó por HPLC junto con la concentración de DMRL y oxolumazina, un producto de degradación de la DMRL. Para el cálculo del rendimiento de riboflavina en la fuente de carbono, se determinaron por HPLC la concentración inicial y residual de todas las fuentes de carbono.

15

Los resultados se presentan en la tabla 2. Mientras que el operón *rib* natural en un contexto génico de la cepa de tipo natural (1A747) básicamente no segrega nada de riboflavina en el medio, el mismo operón *rib* en contexto génico de la cepa seleccionada para la sobreproducción de riboflavina (RB50) segregaba una cantidad medible de riboflavina. Los mejores resultados se obtuvieron con el mutante *ribO* RK41 tanto en el tipo natural (BS3958) como en el contexto génico RB50 (BS3987), respectivamente. La eliminación del terminador no dio como resultado los resultados esperados, en particular en el contexto génico natural (BS3815). Mientras que en el contexto génico natural el mejor segundo resultado se obtenía con los mutantes *ribO* RK1a (BS3833), los segundos mejores resultados en el contexto génico RB50 se lograron con la eliminación SWITCH (BS3900 y BS3916), que mostraban un rendimiento incluso mayor de riboflavina que la cepa de eliminación de la secuencia líder.

20

25 Tabla 2A: Producción de riboflavina con cepas de *B. subtilis* transformadas como se indica basado en la cepa de tipo natural de *B. subtilis* 1A747 que lleva la secuencia líder *rib* natural. El rendimiento se da como g de riboflavina por g de fuente de carbono (para una explicación adicional véase el texto).

Cepa	Mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Rendimiento [%]
1A747	tipo natural	0,0004
BS3833	RK1a	0,0570
BS3958	RK41	0,1100
BS3814	eliminación de flanqueador derecho	0,0090
BS3815	eliminación de terminador	0,0103
BS3867	eliminación SWITCH	0,0139

Tabla 2B: Producción de riboflavina con cepas de *B. subtilis* transducidas como se indica basado en la cepa sobreproductora de riboflavina *B. subtilis* RB50 que lleva la secuencia líder *rib* natural. El rendimiento se da como g de riboflavina por g de fuente de carbono (para una explicación adicional véase el texto).

Cepa	Mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Rendimiento [%]
RB50	operón <i>rib</i> de tipo natural	0,46
BS3839	RK1a	1,29
BS3987	RK41	1,64
BS3832	eliminación de flanqueador derecho	0,33
BS3821	flanqueador de terminador	0,74
BS3900, BS3916	eliminación SWITCH	1,48
BS3846	eliminación del bucle en horquilla derecho	0,11
BS3859	eliminación del bucle en horquilla izquierdo	0,52

5 Ejemplo 3: Sustitución del promotor de *rib* natural por promotores constitutivos fuertes

Con el fin de evaluar un posible efecto sinérgico de las mutaciones de la secuencia líder *rib* combinadas con un promotor fuerte, el promotor de *rib* original de las nuevas construcciones generadas (véase el ejemplo 2) se sustituyó por el promotor constitutivo fuerte P_{veg} o por P_{Sp015} . El modo de construcción se parece mucho al procedimiento del ejemplo 2. Para la generación de los fragmentos de ADN flanqueador 3' y flanqueador 5', se añadieron 1 μ l de 100 μ l de solución del cebador p60 (SEQ ID NO: 12) junto con p51 (para la construcción de P_{veg}) o el cebador p62 (SEQ ID NO: 14) junto con p51 (para la construcción de P_{Sp015}) y la pareja de cebadores p45 junto con p61 (SEQ ID NO: 13) (para la construcción de P_{veg}) o pareja de cebadores p45 junto con p63 (SEQ ID NO: 15) (para la construcción de P_{Sp015}), a 0,1 μ g de ADN cromosómico 1A747 en un volumen de reacción de 50 μ l que contenía 1 μ l de dNTP 10 mM, 5 μ l de 10x tampón y 0,5 μ l de polimerasa *Pfu* (Stratagene). Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo durante 35 ciclos de tres etapas secuenciales: (i) etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 s; (ii) etapa de reasociación a 52°C durante 30 s; (iii) etapa de elongación a 72°C durante 1 min. Los ciclos de la PCR estaban precedidos de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 3 min. Los dos productos de la PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa y se extrajeron del gel usando el kit de extracción en gel MinElute (Qiagen). En la reacción de PCR final, los dos productos de la PCR purificados (flanqueador 5' y flanqueador 3') se ensamblaron: se añadieron 1 μ l de una solución 100 μ M de cebadores p45 y p51, 1,0 μ l de producto de la PCR flanqueador 5' (50 ng), 1 μ l de producto de la PCR flanqueador 3' (50 ng) en un volumen de reacción final de 50 μ l que contenía 1,0 μ l de dNTP 10 mM, 5 μ l de 10X tampón y 0,5 μ l de polimerasa *Pfu* (Stratagene). La reacción de la PCR se llevó a cabo durante 35 ciclos de tres etapas secuenciales: (i) etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 s; (ii) etapa de reasociación a 52°C durante 30 s; (iii) etapa de elongación a 72°C durante 2,5 min. Los ciclos de la PCR estaban precedidos de una etapa de desnaturalización del ADN a 95°C durante 3 min. El producto de la PCR ensamblado se purificó usando el kit de purificación de PCR QiaQuick (Qiagen). El producto de la PCR de longitud completa purificado (2 μ g) se usó para la transformación de células competentes de *B. subtilis* BS3813. Las células se cultivaron en placas SMM. Los transformantes de *Bacillus* protótrofos para la riboflavina se suspendieron en 1 ml de solución de NaCl al 0,9%. Se cultivaron 100 μ l de una dilución de 500 veces de la suspensión de células original en placas de agar TBAB. Se transfirieron colonias individuales a placas de agar TBAB recientes y a placas de agar TBAB complementadas con Nm 2 mg/l y riboflavina 100 mg/l. Los transformantes correctos crecían solo en placas de agar TBAB y por lo tanto eran sensibles a la neomicina. Además, el genotipo se confirmó por la secuenciación del nuevo promotor integrado, secuencia líder de *rib* y *ribD*. La cepa con un operón *rib* dirigido por P_{veg} se llamó BS3811, la cepa con el operón *rib* dirigido por P_{Sp015} se llamó BS3817.

Con el fin de combinar los promotores fuertes con las modificaciones de la secuencia líder, el ADN_g de la cepa 1A747 se sustituyó por el ADN_g de la cepa BS3811 (promotor P_{veg}) y BS3817 (promotor P_{Sp015}), respectivamente, en todas las reacciones de la PCR descritas del ejemplo 2. Todas las otras condiciones de la reacción de la PCR incluyendo las parejas de cebadores usados, se mantuvieron idénticas. Los productos de la PCR finales se transformaron en BS3813 y los transformantes obtenidos se verificaron como se ha descrito (ejemplo 2). En el caso de la construcción de P_{Sp015} eliminación secuencia líder, se usaron las parejas de cebadores p45/p95 para el producto de la PCR flanqueador 5' y p96/p51 para el producto de la PCR flanqueador 3' como se indica en la tabla 4. Todas las demás etapas se llevaron a cabo como se ha descrito antes. Se hicieron las siguientes construcciones, con la designación de la cepa resultante de *B. subtilis* transformada con dicha construcción entre paréntesis: P_{veg} eliminación flanqueador derecho (BS3840), P_{Sp015} eliminación flanqueador derecho (BS3831), P_{veg} eliminación terminador (BS3844), P_{Sp015} eliminación terminador (BS3871), P_{Sp015} eliminación SWITCH (BS3874), P_{Sp015} eliminación líder (BS3944), P_{veg} RK41 (BS3887), P_{veg} RK1a (BS3953), P_{Sp015} RK1a (BS3884), P_{veg} triple *ribO* (BS3912).

Se prepararon lisados en PBS-1 a partir de las cepas mencionadas antes y se transdujeron en BS3798. Las células transducidas se seleccionaron en placas SMM. Los transformantes de *B. subtilis* protótrofos para la riboflavina se suspendieron en 1 ml de solución de NaCl al 0,9%. Se cultivaron 100 μ l de la dilución de 500 veces de la suspensión de células original en placas de agar TBAB. Se transfirieron colonias individuales a placas de agar TBAB recientes y a placas de agar TBAB complementadas con Nm 2 mg/l y riboflavina 100 mg/l. Los transformantes correctos crecían

solo en placas de agar TBAB y por lo tanto eran sensibles a la neomicina. Se generaron las siguientes cepas: BS3970 y BS3971 transducidas con lisado de PBS-1 a partir de BS3953; BS3905 y BS3907 transducidas con lisado de PBS-1 a partir de BS3884; BS3903 y BS3914 transducidas con lisado de PBS-1 a partir de BS3887; BS3981-83 transducida con lisado de PBS-1 a partir de BS3912; BS3890 transducida con lisado de PBS-1 a partir de BS3840; BS3880 y BS2882 transducidas con lisado de PBS-1 a partir de BS3844; BS3850 y BS3851 transducidas con lisado de PBS-1 a partir de BS3817; BS5026 y BS5041 transducidas con lisado de PBS-1 a partir de BS3944; BS3853 transducida con lisado de PBS-1 a partir de BS3831; BS3897 y BS3956 transducidas con lisado a partir de BS3874.

Se analizó en la mayoría de las cepas la producción de riboflavina en matraces de agitación como se ha descrito antes. Después de 48 h, la riboflavina de una muestra de 500 µl se disolvió por adición de NaOH, se neutralizó y después de centrifugación, se determinó la concentración de riboflavina de las muestras procesadas por HPLC junto con la concentración de DMRL y oxolumazina. Para calcular el rendimiento de la riboflavina respecto a la fuente de carbono, se determinaron la concentración inicial y residual de todas las fuentes de carbono por HPLC. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3A: Producción de riboflavina con cepas de *B. subtilis* transformadas como se ha indicado, basado en la cepa de tipo natural de *B. subtilis* 1A747 que lleva la secuencia líder *rib* natural. El rendimiento se da como g de riboflavina por g de fuente de carbono (para una explicación adicional véase el texto).

Cepa	Mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Rendimiento [%]
1A747	tipo natural	0,0004
BS3811	P _{veg}	0,0120
BS3817	P _{Spo15}	0,0163
BS3953	P _{veg} RK1a	0,1600
BS3884	P _{Spo15} RK1a	0,7706
BS3887	P _{veg} RK41	0,3757
BS3912	P _{veg} triple <i>ribO</i>	1,0900
BS3840	P _{veg} eliminación flanqueador derecho	0,0748
BS3831	P _{Spo15} eliminación flanqueador derecho	0,0702
BS3844	P _{veg} eliminación terminador	0,0666
BS3871	P _{Spo15} eliminación terminador	0,0359
BS3874	P _{Spo15} eliminación SWITCH	0,2823
BS3944	P _{Spo15} eliminación líder	0,1150

Tabla 3B: Producción de riboflavina con cepas de *B. subtilis* transducidas como se ha indicado, basado en la cepa sobreproductora de riboflavina de *B. subtilis* RB50 que lleva la secuencia líder *rib* natural. El rendimiento se da como g de riboflavina por g de fuente de carbono (para una explicación adicional véase el texto).

Cepa	Mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Rendimiento [%]
RB50	operón <i>rib</i> de tipo natural	0,46
BS3849	P _{veg}	1,33
BS3850, BS3851	P _{Spo15}	1,57
BS3970, BS3971	P _{veg} RK1a	2,88
BS3905, BS3907	P _{Spo15} RK1a	3,31
BS3903, BS3914	P _{veg} RK41	4,18
BS3981	P _{veg} triple <i>ribO</i>	2,52
BS3890	P _{veg} eliminación flanqueador derecho	1,14
BS3853	P _{Spo15} eliminación flanqueador derecho	1,63
BS3880	P _{veg} eliminación terminador	1,80
BS3875	P _{Spo15} eliminación terminador	2,38
BS3897	P _{Spo15} eliminación SWITCH	3,76
BS5026	P _{Spo15} eliminación líder	2,16

Todas las manipulaciones hechas en la secuencia líder *rib* o el promotor de *rib* conducen a una mayor producción de riboflavina. De acuerdo con los resultados descritos en el ejemplo 2 (véase la tabla 2), la mutación de *ribO* RK41 era también la más eficaz cuando se sustituía el promotor natural por uno constitutivo más fuerte. Usando un promotor fuerte, se alcanzó un rendimiento de hasta 4,2% con la combinación de P_{veg} con RK41. Sorprendentemente, la combinación de P_{Spo15} con la eliminación SWITCH mostró el siguiente mejor rendimiento con 3,8%, que es mucho mejor que la combinación de P_{Spo15} con la eliminación de terminador que dio como resultado un rendimiento de 2,4%.

Todas las manipulaciones hechas en la secuencia líder *rib* o el promotor de *rib* condujeron a una mayor producción de riboflavina. De acuerdo con los resultados descritos en el ejemplo 2 (véase la tabla 2), la mutación de *ribO* RK41 era también la más eficaz cuando se sustituía el promotor natural por uno constitutivo más fuerte. Usando un

promotor fuerte, se alcanzó un rendimiento de hasta 4,2% con la combinación de P_{veg} con RK41. Sorprendentemente, la combinación de P_{Spo15} con la eliminación SWITCH mostró el siguiente mejor rendimiento con 3,8%, que es mucho mejor que la combinación de P_{Spo15} con la eliminación de terminador que dio como resultado un rendimiento de 2,4%.

- 5 Ejemplo 4: Combinación de mutaciones *ribO* con eliminaciones de la secuencia líder y sustitución del promotor de *rib* natural por promotores constitutivos fuertes.

Para ver si la combinación de una mutación *ribO* desreguladora típica con eliminaciones de la secuencia líder es capaz de aumentar la producción de riboflavina, se combinaron algunas de las mutaciones generadas en el ejemplo 2 y 3. La construcción seguía el protocolo indicado antes. Los moldes y parejas de cebadores para los productos de la PCR flanqueador 5' y 3' se muestran en la tabla 4 (para más información véase también el ejemplo 1). El ensamblaje de la PCR y la transformación en BS3813 se hicieron como se ha descrito en el ejemplo 2 y 3. La secuenciación puso de manifiesto que estaban presentes dos mutaciones adicionales en las construcciones P_{Spo15}_triple *ribO*_eliminación mro175 y P_{veg}_triple *ribO*_eliminación mro175, en concreto T25G y C101T, en donde la numeración se refiere a la SEQ ID NO: 42. La designación de las nuevas cepas que llevan las nuevas construcciones generadas se muestran en la tabla 4, columna 4.

Se prepararon los lisados de PBS-1 de las nuevas cepas generadas y se usaron para la transducción de BS3798 (generado en el ejemplo 1). La selección de las células transducidas en placas SMM se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 2. Las nuevas cepas transducidas se nombraron como se indica en la tabla 4, columna 5.

20 Tabla 4: Parejas de cebadores usadas para la construcción de los fragmentos flanqueador 5' y flanqueador 3', respectivamente, que dan como resultado secuencias líder *rib* modificadas combinadas con los respectivos promotores constitutivos y denominación de las cepas resultantes sea transformadas con dichos fragmentos de la PCR o transducidas con los lisados respectivos (para una explicación adicional véase el texto).

Denominación de la mutación de la secuencia líder <i>rib</i> (Molde para PCR)	Pareja de cebadores del flanqueador 3' (SEQ ID NO)	Pareja de cebadores del flanqueador 5' (SEQ ID NO)	Cepas transformadas	Cepas transducidas
P _{veg} _triple <i>ribO</i> _eliminación mro175 (BS3912)	p45 / p81a (5 / 29)	p80a / p51 (27 / 7)	BS3889	BS3908
P _{Spo15} _triple <i>ribO</i> _eliminación mro175 (BS3889)	p45 / p63 (5 / 15)	p62 / p51 (14 / 7)	BS3923	BS3922
P _{Spo15} _RK41_eliminación terminador (BS3871)	p45 / p73 (5 / 18)	p72 / p51 (16 / 7)	BS3954	BS3984
P _{Spo15} _RK41_eliminación SWITCH (BS3874)	p45 / p73 (5 / 18)	p72 / p51 (16 / 7)	BS3915	BS3964
P _{veg} _RK41_eliminación SWITCH (BS3887)	p45 / p81 (5 / 28)	p80 / p51 (26 / 7)	BS3920	BS3899

25 Se llevó a cabo el análisis en las nuevas cepas generadas de la producción de riboflavina por cribado de los matraces de agitación como se ha descrito antes. Los resultados se presentan en la tabla 5 que muestra un aumento adicional en la producción de riboflavina comparado con los resultados presentados en el ejemplo 3 (véase la tabla 4). La combinación de las mutaciones *ribO* RK41 y triple *ribO*, respectivamente, con un promotor fuerte y una eliminación de la secuencia líder *rib* dio como resultado rendimientos de riboflavina de más de 7,6% en un cribado de matriz de agitación comparado con 4,2% logrado con la combinación del promotor P_{veg} con la mutación *ribO* RK41 (véase la tabla 4), la mejor combinación sin una eliminación de la secuencia líder. La eliminación de la secuencia líder específica como se describe en la presente memoria casi duplicó el rendimiento de las combinaciones de secuencia líder *rib* desregulada (mutación *ribO*, promotor constitutivo)-promotor. Además de la "eliminación SWITCH" también la eliminación "eliminación mro175" inesperadamente era capaz de mejorar el rendimiento de riboflavina en un contexto génico de RB50 frente a una construcción sin eliminación. La eliminación del terminador ("eliminación terminador") también tiene un efecto positivo pero menos pronunciado. La construcción de eliminación de la secuencia líder en la que P_{Spo15} se pone directamente frente a la secuencia Shine-Dalgarno de *ribD* mostró un rendimiento 3,6 veces menor que las mejores construcciones triples (BS5026, véanse las tablas 4 y 6). Estos resultados sugieren que la secuencia líder *rib* no solo es necesaria para la regulación sino también para la estabilización del transcrito de longitud completa.

Tabla 5: Producción de riboflavina con cepas de *B. subtilis* transducidas como se ha indicado, basado en la cepa sobreproductora de riboflavina de *B. subtilis* RB50 que lleva la secuencia líder *rib* natural. El rendimiento se da como g de riboflavina por g de fuente de carbono (para una explicación adicional véase el texto).

Cepa	Mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Rendimiento [%]
RB50	operón <i>rib</i> de tipo natural	0,46
BS3908	P _{veg} _triple <i>ribo</i> _del mro175	6,79
BS3922	P _{Spol5} _triple <i>ribO</i> _del mro175	6,47
BS3984	P _{Spol5} _RK41 eliminación terminador	5,24
BS3964	P _{Spol5} _RK41 eliminación SWITCH	7,80
BS3899	P _{veg} _RK41 eliminación SWITCH	7,67
BS5026	P _{Spol5} _eliminación líder	2,16

5 Ejemplo 5: Sustitución de la secuencia líder *rib* natural por un elemento estabilizador del ARNm

La secuencia de ADN del elemento estabilizador de ARNm *aprE* se distribuyó en dos productos de la PCR. Para la amplificación del producto 1 de la PCR que contiene la región 5' del operón *rib* en el extremo 5' del elemento estabilizador de ARNm *aprE*, se usaron los cebadores p45 junto con p143' (SEQ ID NO: 33) y el ADN cromosómico de la cepa BS3817 como molde, en condiciones de PCR estándar. Para la amplificación del producto 2 de la PCR que contiene *ribD* en el extremo 3' del elemento estabilizador de ARNm *aprE*, se usaron los cebadores p51 junto con p142 (SEQ ID NO: 32) y el ADN cromosómico de la cepa BS3817 como molde, en condiciones de PCR estándar. En la reacción de LFH-PCR estándar, los productos 1 y 2 de la PCR purificados en gel se ensamblaron en un fragmento de ADN como se ha descrito antes. Se aplicó el mismo método al elemento estabilizador de ARNm *grpE* con el ADN cromosómico de la cepa BS3817 como molde usando la pareja de cebadores p45/p145' (SEQ ID NO: 35) y la pareja de cebadores p51/p144 (SEQ ID NO: 34) para las dos primeras PCR seguido de la PCR de ensamblaje usando la pareja de cebadores p45/p51 en las condiciones descritas antes. Los productos de la LFH-PCR purificados se transformaron de nuevo en células competentes de *B. subtilis* BS3813 auxótrofa para riboflavina, en la que la región promotora de la riboflavina y la parte 5' de *ribD* se sustituyó por un casete de resistencia a la neomicina. Los transformantes protótrofos para riboflavina se seleccionaron en placas SMM. Los transformantes aislados se suspendieron en 1 ml de solución de NaCl al 0,9% y 100 µl de una dilución de 500 veces de la suspensión de células original en placas de agar TBAB. Se transfirieron colonias individuales a placas de agar TBAB recientes y a placas de agar TBAB complementadas con Nm 2 mg/l y riboflavina 100 mg/l. Los transformantes correctos crecían solo en placas de agar TBAB y por lo tanto eran sensibles a la neomicina. Además, el genotipo se confirmó por la secuenciación del nuevo tramo introducido de ADN. Las cepas resultantes se designaron BS5193 (que lleva la construcción P_{150aprE}*rib*DEAHT) y BS5196 (que lleva la construcción P_{150grpE}*rib*DEAHT), respectivamente. Se prepararon los lisados de PBS-1 de las cepas BS5193 y BS5196 y se usaron para la transducción de BS3798 (generada en el ejemplo 1). La selección de las células transducidas en placas SMM se llevó a cabo como se ha descrito en el ejemplo 2. Las nuevas cepas transducidas basadas en la cepa BS5193 se denominaron BS5260 y BS5262, respectivamente, la nueva cepa transducida basada en la cepa BS5196 se denominó BS5244.

30 La producción de riboflavina se analizó en experimentos de matraces agitados como se ha descrito antes. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6A: Producción de riboflavina con cepas de *B. subtilis* transformadas como se ha indicado, comparada con la cepa de tipo natural de *B. subtilis* 1A747 que lleva la secuencia líder *rib* natural. El rendimiento se da como g de riboflavina por g de fuente de carbono (para una explicación adicional véase el texto).

Cepa	Mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Rendimiento [%]
1A747	natural	0,0004
BS3817	P _{Spol5}	0,0163
BS3944	P _{Spol5} _eliminación líder	0,1150
BS5193	P _{Spol5} _aprE	0,1000
BS5196	P _{Spol5} _grPE	0,3700

35

Tabla 6B: Producción de riboflavina de cepas de *B. subtilis* transducidas como se ha indicado, comparada con la cepa sobreproductora de riboflavina de *B. subtilis* RB50 que lleva la secuencia líder *rib* natural. El rendimiento se da como g de riboflavina por g de fuente de carbono (para una explicación adicional véase el texto).

Cepa	Mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Rendimiento [%]
RB50	operón <i>rib</i> de tipo natural	0,46
BS3850	P _{Spol5}	1,57
BS5026	P _{Spol5} _eliminación líder	2,16
BS5260	P _{Spol5} _aprE	2,07
BS5244	P _{Spol5} _grPE	2,99

La sustitución del promotor de *rib* por un promotor constitutivo no regulado como P_{Spo15} aumentaba el rendimiento de riboflavina en el cribado de matraces agitados comparado con un operón *rib* de tipo natural regulado, en 41 veces en un contexto génico de tipo natural y 3,4 veces en un contexto génico de RB50. Cuando se quitó la secuencia líder *rib* y el promotor P_{Spo15} se puso directamente frente a *ribD*, el rendimiento de riboflavina era de nuevo 7 veces mayor en una cepa hospedante de tipo natural y 1,4 veces en el contexto génico de RB50. La sustitución de la secuencia líder *rib* por el elemento estabilizador de ARNm *aprE* mostró que no tenía influencia en el rendimiento en los dos contextos génicos de cepas usadas antes. Sin embargo, sustituyendo la secuencia líder *rib* por el elemento estabilizador de ARNm *aprE*, el rendimiento de riboflavina aumentó 3,7 veces en un hospedante de tipo natural y 1,44 veces en el contexto génico de RB50.

Con el fin de comprobar la influencia de la cepa hospedante con respecto al rendimiento del operón *rib* modificado, los lisados de 1A747 (operón *rib* de tipo natural), BS5193, BS5196 y BS3944 también se transdujeron en otra variante de RB50 denominada BS5178 (*spo0A*⁻, *rib::neo*, *ribCl*, *bpr::cam*, *tkl*^{mut}). Se llevaron a cabo cribados en matraces agitados como se ha descrito antes. Los resultados, incluyendo los nombres de las nuevas cepas construidas, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Producción de riboflavina con cepas de *B. subtilis* transducidas como se ha indicado antes. El rendimiento se da como g de riboflavina por g de fuente de carbono y comparado con el rendimiento de BS5240.

Cepa	Mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Rendimiento [%]
BS5240	P _{Spo15} eliminación líder	100
BS5191	operón <i>rib</i> tipo natural	40
BS5237	P _{Spo15} <i>aprE</i>	140
BS5238	P _{Spo15} <i>grPE</i>	270

En el nuevo contexto génico de la cepa el efecto positivo de los elementos estabilizadores era más pronunciado cuando se ensayaba en el formato de matraces agitados. Ahora, el elemento estabilizador de ARNm *aprE*, también aumentaba el rendimiento de la riboflavina en 40% comparado con una cepa que lleva el operón *rib* sin una secuencia líder. El elemento estabilizador de ARNm *grpE* mostró un aumento de rendimiento de incluso 2,7 veces comparado con la construcción sin una secuencia líder *rib*.

En nuevo contexto génico de la cepa el efecto positivo de los elementos estabilizadores era más pronunciado cuando se ensayaba en el formato de matraces agitados. Ahora, el elemento estabilizador de ARNm *aprE*, también aumentaba el rendimiento de la riboflavina en 40% comparado con una cepa que lleva el operón *rib* sin una secuencia líder. El elemento estabilizador de ARNm *grpE* mostró un aumento de rendimiento de incluso 2,7 veces comparado con la construcción sin una secuencia líder *rib*.

Ejemplo 6: Combinación de mutaciones *ribO* adicionales con eliminaciones de secuencia líder y promotores constitutivos fuertes

De la misma forma que se introdujeron las mutaciones *ribO* RK41 (=RK61a), RK1a y "triple *ribO*", que combinan las mutaciones *ribO* RK4, RK8, RK5 (=RK2) de Kil et al., 1992, en la secuencia líder *rib*, se pueden usar mutaciones *ribO* adicionales descritas en Kil et al., 1992, para generar secuencias líder *rib* optimizadas alternativas. La numeración de las mutaciones se refiere a la secuencia líder *rib* mostrada en la SEQ ID NO: 42. Las mutaciones descritas RK111a (G59A), RK116a (G56A), RK62a (G60A; idéntica a RK82a), RK93a (C87T), y RK27a (C128T) se combinan con la eliminación de terminador, la eliminación SWITCH y la eliminación mro175 (véase antes) junto con un promotor constitutivo fuerte P_{Spo15} o P_{veg} dependiendo del molde usado para la generación del flanqueador 5' y flanqueador 3'. Cualquier mutación eficaz como mutación *ribO* se puede combinar de esta forma con los promotores descritos y eliminaciones de secuencia líder.

Se usaron las siguientes parejas de cebadores para la construcción de las mutaciones *ribO*: pareja de cebadores p111a_f/p111a_r (SEQ ID NO: 83 y 84) para la construcción de RK111a, pareja de cebadores p116a_f/p116a_r (SEQ ID NO: 85 y 86) para la construcción de RK116a, pareja de cebadores p62a_f/p62a_r (SEQ ID NO: 87 y 88) para la construcción de RK62a, pareja de cebadores p93a_f/ p93a_r (SEQ ID NO: 89 y 90) para la construcción de RK93a, y pareja de cebadores p27a_f/ p27a_r (SEQ ID NO: 91 y 92) para la construcción de RK27a. Estos cebadores se usan en reacciones de la PCR como se describe en el ejemplo 2. Para la generación del flanqueador 5', se aplica el cebador p45 junto con el cebador antiparalelo. Para la generación del flanqueador 3', se aplica el cebador directo junto con el cebador p51. Los flanqueadores 5' y 3' se ensamblan en una tercera PCR usando los cebadores p45 y p51 (véase el ejemplo 2). La transformación y transducción de cepas se lleva a cabo como se ha descrito en el ejemplo 2. Para la sustitución del promotor natural, se siguen las instrucciones de acuerdo con el ejemplo 3, para la combinación de las mutaciones *ribO* con mutaciones de la secuencia líder se siguen las instrucciones de acuerdo con el ejemplo 4.

Tabla 9: Moldes necesarios para la generación de las construcciones de *ribO* por el método basado en la PCR como

se ha descrito antes en ejemplos previos (para explicaciones adicionales véase el texto).

Designación de la mutación de la secuencia líder <i>rib</i>	Molde para el flanqueador 5'	Molde para el flanqueador 3'
P _{Spo15} _RK111a	BS3817	BS3817
P _{veg} _RK111a	BS3811	BS3811
P _{Spo15} _RK111a_eliminación SWITCH	BS3874	BS3874
P _{veg} _RK111a_eliminación SWITCH	BS3811	BS3867
P _{Spo15} _RK111a_eliminación terminador	BS3871	BS3871
P _{veg} _RK111a_eliminación terminador	BS3844	BS3844
P _{Spo15} _RK111a_eliminación mro175	BS3817	BSmro175
P _{veg} _RK111a_eliminación mro175	BS3811	BSmro175

5 Los productos de la PCR generados para todas las construcciones citadas en la tabla 9 se transforman en BS3813. La selección tiene lugar como se describe en el ejemplo 2 y se usan lisados de las cepas confirmadas para la transducción de BS3798. El rendimiento de riboflavina obtenido en los experimentos de matraces agitados como se ha descrito antes, está en los intervalos para las construcciones de RK41_eliminación SWITCH o triple *ribO_eliminación mro175* (véase la tabla 5). Estas cantidades son incluso mayores cuando se usa otro contexto génico de cepa, como se ha descrito, por ejemplo, en el ejemplo 5.

Ejemplo 7: Generación de cepas distintas de *B. subtilis* que llevan secuencias líder *rib* modificadas

10 Las construcciones descritas en los ejemplos anteriores se pueden usar para identificar/generar las correspondientes modificaciones en las secuencias líder *rib* a partir de otras cepas que se sabe que tienen un interruptor ribosómico en el sitio y que son cepas hospedantes adecuadas para la producción de riboflavina.

15 Las partes correspondientes de las secuencias líder *rib* no modificadas se identifican en otros organismos de acuerdo con el alineamiento representado en la figura 2 de Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30, 3141-3151, 2002. Las mutaciones por eliminación se generan como se ha descrito antes y opcionalmente se combinan con mutaciones *ribO* (homólogas a las identificadas en *B. subtilis*). Las construcciones se pueden combinar además con promotores fuertes u otra modificación conocida de la cepa hospedante como se ha descrito antes con el fin de aumentar la producción de riboflavina en condiciones de cultivo adecuadas que son conocidas para el experto en la técnica.

20 Las construcciones descritas en los ejemplos anteriores se pueden usar para identificar/generar las correspondientes modificaciones en las secuencias líder *rib* a partir de otras cepas que se sabe que tienen un interruptor ribosómico en el sitio y que son cepas hospedantes adecuadas para la producción de riboflavina.

25 Las partes correspondientes de las secuencias líder *rib* no modificadas se identifican en otros organismos de acuerdo con el alineamiento representado en la figura 2 de Vitreschak et al., *Nucleic Acid Res* 30, 3141-3151, 2002. Las mutaciones por eliminación se generan como se ha descrito antes y opcionalmente se combinan con mutaciones *ribO* (homólogas a las identificadas en *B. subtilis*). Las construcciones se pueden combinar además con promotores fuertes u otra modificación conocida de la cepa hospedante como se ha descrito antes con el fin de aumentar la producción de riboflavina en condiciones de cultivo adecuadas que son conocidas para el experto en la técnica.

30

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> DSM IP Assets B.V.	
	<120> Producción de riboflavina mejorada	
5	<130> 26251	
	<160> 92	
10	<170> PatentIn versión 3.3	
	<210> 1	
	< 211> 4230	
	< 212> ADN	
15	< 213> Bacillus subtilis	
	<400> 1	
	taaggacaaa tgaataaaga ttgtatcctt cggggcaggg tggaaatccc gacggcggt	60
	agtaaagcac atttgcttta gagcccggtga cccgtgtgca taagcacgcg gtggattcag	120
	tttaagctga agccgacagt gaaagtctgg atgggagaag gatgatgagc cgctatgcaa	180
	aatgtttaaa aatgcatagt gttatttctt attgcgtaaa atacctaaag cccogaattt	240
	tttataaatt cggggctttt ttgacggtaa ataacaaaag aggggagggg aacaaatgga	300
	agagtattat atgaagctgg ccttagatct tgcgaagcag ggcgaaggac agaccgaatc	360
	caatccgctc gtggcgctg ttgtcgtaa ggacggacaa attgtcgga tgggcgcca	420
	tttaaaatat ggtgaagctc atgcagaagt tcatgccatc catatggctg gagcacatgc	480
	agagggtgcc gacatttacg ttacactcga accgtgcagc cattacggaa aaacaccgcc	540
	atgtgcagaa ttgattatca actctggtat caaaagagtg ttcgtggcga tgagagatcc	600
	taatccgctt gtggctggaa gagggatcag catgatgaaa gaagctggca ttgaggtaa	660
	ggaaggcatc ctggcagacc aggcggagag gctgaatgaa aaatttctgc actttatgag	720
	gacaggcctt ccgtacgtca cgctaaaagc ggctgccagc cttgacggca agatagctac	780
	cagcacgggt gacagcaaat ggatcacgtc agaggctgca agacaggatg ctcagcaata	840
	caggaaaaca caccaaagca ttttagtcgg agttggcaca gtgaaagccg acaatccgag	900
	cttaacctgc agactgccga atgtaacaaa acagccgggt cgggtcatac ttgataccgt	960
	actctcgatt cctgaggacg ctaaagtgat ttgcgatcaa atagcgcga catggatfff	1020
	tacgacggca cgcgcagacg aggaaaagaa aaaacggctt tcagctttcg gagtgaacat	1080
	atttacactt gaaaccgagc gcattcaaat tectgatgtt ttgaagatcc tagcgggaaga	1140
	aggcatcatg tcggtgtatg tgaagggcg ttcagctgtt cacggaagct ttgtcaaaga	1200

ES 2 648 045 T3

aggetgtttt	caagaaatca	tettctatth	tgeccctaaa	ctaateggag	gaacgcatgc	1260
tcccagctta	atctccggg	aaggthttca	atcaatgaaa	gatgtcccct	tattacaatt	1320
caetgatata	accctaatcg	gccgtgatat	caaaetgacg	gcaaaaaccga	caaaggaata	1380
ggatgggtgac	catgtttaca	ggaattatcg	aagaaacagg	cacaatcgaa	tccatgaaaa	1440
aagcagggca	tgcaatggcc	ttaactatta	aatgctcaaa	gatttttagag	gatgttcate	1500
ttggcgacag	cattgcagtg	aacggcattt	gtctgactgt	caetgattht	acaaaaaatc	1560
aattcacagt	ggatgttatg	cctgaaacag	tcaaagctac	gtcaetgaa	gatttaacaa	1620
aaggaagcaa	agtaaatctg	gaaagagcga	tggcgcaaaa	cgcccgthtc	ggaggccatt	1680
tcgtctcagg	ccatgtcgac	ggaactgcgg	aaatcacacg	aattgaagag	aaaagcaacg	1740
cagthtacta	tgatttaaaa	atggaccogt	cattaacaaa	aacattgggt	ttaaagggat	1800
caattactgt	ggatggcgtg	agcttaacca	tattcggcct	gacagaagac	acagtgacga	1860
tctccttaat	accgcatacg	atcagcgaaa	cgatctthtc	agaaaaaacg	atcggctcta	1920
aagtgaatat	cgaatgcgat	atgatcggaa	aatatatgta	tcgattthtg	cataaagcca	1980
atgaaaataa	gacccaacaa	accattacaa	aagccttctt	aagcgaaaac	ggctthttaga	2040
gaggaagatt	tgcatgtthc	atccgataga	agaagcactg	gacgctthta	aaaaaggcga	2100
agtcateatc	gthgtagatg	atgaagacag	agaaaatgaa	ggagactthg	tggctcttgc	2160
cgagcatgca	acgccggaag	tcattaactt	tatggcgaca	catgggagag	gactgatctg	2220
cacgcgcctc	agtgaggaaa	tcgcagacag	gcttgatctt	cacctatgg	ttgagcataa	2280
tacagactct	caccacactg	catthaccgt	aagcatagac	catcgtgaaa	cgaagacagg	2340
tatcagcctc	caagaaagat	ctthtaccgt	tcaagcattg	ctggacagca	aatccgtgcc	2400
atctgattht	cagcgtccgg	ggcacattht	tccactgatt	gcgaaaaaag	gaggtgtcct	2460
gaaaagagcg	ggccatacag	aagctgctgt	tgatcttgct	gaagcttgcg	gatctccagg	2520
agccggcgtc	atthgtgaaa	ttatgaatga	agacggaacg	atggcgagag	tgctgagct	2580
cattgaaatt	gcgaaaaagc	atcaattaaa	aatgatcacc	attaaggatt	tgattcaata	2640
ccgttacaat	ctgacaacac	ttgtcgagcg	tgaagttgac	attacgctgc	ctactgattt	2700
tgggacatth	aaggthtatg	gatacacaaa	tgaggtagat	ggaaaagagc	atgtcgcatt	2760
tgtgatggga	gatgtgccgt	tcggagaaga	accggtattg	gtccgggtgc	atcagaatg	2820
tctcacaggt	gacgtgtthg	gctctcatcg	ctgtgattgc	ggaccgcagc	tgacgcgccg	2880

ES 2 648 045 T3

gctgaaccaa attgccgcag aaggccgtgg agtgcctctg tacttgcgcc aagaaggacg 2940
 aggcacgcgt ttaatcaata aattaaaagc ttataagctt caggaacaag gctatgacac 3000
 cgtagaagcc aatgagggcg ttggattctt gccggatctt cgcaactatg gcatcggagc 3060
 acaaatttta cgcgacctcg gtgtccgga tatgaagctt ttgacgaata atccgcgaaa 3120
 aatcgcaggc cttgaaggct acggactcag tatttcagaa agagtgcgcg ttcaaatgga 3180
 ggcgaagaa cacataaaaa aatatttgca aacccaaatg aacaagctag gtcatttact 3240
 tcattttotaa tcacaaatat cacaaaaaag gatgggaatc atatgaatat catacaagga 3300
 aatttagttg gtacaggtct taaaatcgga atcgtagtag gaagatttaa tgattttatt 3360
 acgagcaagc tgctgagcgg agcagaagat gcctgtctca gacatggcgt agacacaaat 3420
 gacattgatg tggccttgggt tccaggcgca tttgaaatac cgtttgctgc gaaaaaatg 3480
 gcggaacaa aaaaatatga tgctattatc acattgggca ctgtcatcag aggcgcaacg 3540
 acacattacg attatgtctg caatgaagct gcaaaaggca tcgcgcaagc agcaaacact 3600
 actggtgtac ctgtcatctt tggaattgta acaactgaaa acatcgaaca ggctatcgag 3660
 cgtgccggca caaaagcggg caacaaaggt gtagattgtg ctgtttctgc cattgaaatg 3720
 gcaaatttaa accgctcatt tgaataattt gctgaaaaca gtttaaaaat atggcgaaaa 3780
 tgatataatg tgagaaaacg gatcacctat tcgtatccgt taatagcaga ctggacattt 3840
 tggatataga ggggttttta tgtaattcg ttataaaaaa tcgtttgaaa agattgcgat 3900
 ggggcttctt tcgtttatgc cgaatgaaaa agaccttaag cagcttcagc agacaattaa 3960
 ggactacgaa acggatacag accgccagct ctttctttgg aaagaggacg aggatatcgt 4020
 cggagcaate ggagtcgaaa aaaaggattc tgaggttgag atccggcata tcagtgtgaa 4080
 tccttctcat cgccatcaag gaatcggaaa acagatgatg gatgctttaa agcatttatt 4140
 caaaacgcaa gtactggttc caaatgaatt aacgcagagc tttttcgaac gttgtcaagg 4200
 tcagcaggat caagacattt catacaataa 4230

5 <210> 2
 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

10 <220>
 < 223> cebador

<400> 2
 gctgggctg caggtcgaga tc 22

15 <210> 3
 < 211> 26
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

20 <220>
 < 223> cebador

<400> 3
 gttcaaatg gtaigcgttt tgacac 26

25 <210> 4
 < 211> 49

ES 2 648 045 T3

< 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 5 < 223> cebador

 <400> 4
 gatctcgacc tgcagcccaa gcgaaataaa cttacaattt gagaaaaac 49

 10 <210> 5
 < 211> 21
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 15 <220>
 < 223> cebador

 <400> 5
 20 acatattccc gttatgcatc g 21

 <210> 6
 < 211> 47
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 25
 <220>
 < 223> cebador

 <400> 6
 30 gtgtcaaaac gcataccatt ttgaacgagt tggcacagtg aaagccg 47

 <210> 7
 < 211> 23
 < 212> ADN
 35 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 <400> 7
 40 ctattccttt gtcggtttg ccg 23

 <210> 8
 < 211> 39
 < 212> ADN
 45 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador
 50
 <400> 8
 aatacctaaa gccccgaaga cggtaaataa caaaagagg 39

 <210> 9
 < 211> 23
 < 212> ADN
 55 < 213> Artificial

 <220>
 60 < 223> cebador

 <400> 9
 ttcggggctt taggtathtt acg 23

 65 <210> 10
 < 211> 42

ES 2 648 045 T3

< 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 5 < 223> cebador

 <400> 10
 cctattgCGT aaaataccta aagacggtaa ataacaaaag ag 42

 10 <210> 11
 < 211> 29
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 15 <220>
 < 223> cebador

 <400> 11
 20 tttaggtatt ttacgcaata ggaaataac 29

 <210> 12
 < 211> 72
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 25
 <220>
 < 223> cebador

 <400> 12
 30 taatttaaat ttatttgac aaaaatgggc tcgtgtgta caataaatgt agtgataagg 60
 acaaatgaat aa 72

 <210> 13
 < 211> 50
 35 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador
 40
 <400> 13
 ttgtcaaat aaaatttaa ttagaataa acttacaatt tgagaaaac 50

 <210> 14
 < 211> 80
 45 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 50 < 223> cebador

 <400> 14
 taaaaatttt acaaaaagggt attgactttc cctacagggt gtgtaataat ttaattataa 60

 ggacaaatga ataaagattg 80

 55 <210> 15
 < 211> 51
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 60 <220>
 < 223> cebador

 <400> 15
 caataccttt ttgtaaaatt ttagaataa aacttacaat tgagaaaaa c 51

ES 2 648 045 T3

<210> 16
 < 211> 21
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 10 <400> 16
 ccgtgacccg tgtgcataag c 21

 <210> 17
 < 211> 25
 15 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 20 <400> 17
 aaatggaaat cccgaccggc ggtag 25

 <210> 18
 < 211> 41
 25 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 30 <400> 18
 tatgcacacg ggtcacggac tctaaagcaa atgtgcttta c 41

 35 <210> 19
 < 211> 51
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 40 <220>
 < 223> cebador

 <400> 19
 45 ctaccgccgg tcgggatttc catttgccc cgaaggatac aatctttatt c 51

 <210> 20
 < 211> 21
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 50 <220>
 < 223> cebador

 <400> 20
 55 tttagctga agccgacagt g 21

 <210> 21
 < 211> 37
 < 212> ADN
 60 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 65 <400> 21
 tgtcggcttc agcttaaatt gaatccaccg cgtgctt 37

ES 2 648 045 T3

<210> 22
 < 211> 46
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 10 <400> 22
 gccccgatt tttataaat ttttgacgg taaataacaa aagagg 46

 <210> 23
 < 211> 30
 15 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 20 <400> 23
 aaaaaattta taaaaaattc ggggcttag 30

 <210> 24
 < 211> 22
 25 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 30 < 223> cebador

 <400> 24
 ttaggtatt ttacgaata gg 22

 35 <210> 25
 < 211> 48
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 40 <220>
 < 223> cebador

 <400> 25
 45 cctattgctg aaaataccta aatTTTTat aaattcgggg ctttttg 48

 <210> 26
 < 211> 42
 < 212> ADN
 50 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 <400> 26
 55 agtctggatg ggagaaggat ggacggtaaa taacaaaaga gg 42

 <210> 27
 < 211> 42
 < 212> ADN
 60 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 65 <400> 27
 cagtttaagc tgaagccatg ggacggtaaa taacaaaaga gg 42
 29

ES 2 648 045 T3

<210> 28
 < 211> 21
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 10 <400> 28
 catccttctc ccatccagac t 21

 <210> 29
 < 211> 21
 15 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador
 20
 <400> 29
 ccatggcttc agcttaaact g 21

 <210> 30
 < 211> 24
 25 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 30 < 223> cebador

 <400> 30
 ataattaaat tattacacac cctg 24

 35 <210> 31
 < 211> 45
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 40 <220>
 < 223> cebador

 <400> 31
 45 caggggtgtg aataattaa ttgacggtaa ataacaaaag agggg 45

 <210> 32
 < 211> 53
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 50
 <220>
 < 223> cebador

 <400> 32
 55 ttttaagtaa gtctactctg aatttttta gacggtaaat aacaaaagag ggg 53

 <210> 33
 < 211> 56
 < 212> ADN
 60 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 65 <400> 33
 cagagtagac ttacttaaaa gactattctg caatctttat tcatttgtcc ttataa 56

ES 2 648 045 T3

<210> 34
 < 211> 61
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 10 <400> 34
 cctgtccttc tccttacact ttgagggagg tgaacacaga cggtaaataa caaaagaggg 60

 g 61

 <210> 35
 < 211> 64
 15 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 < 223> cebador

 20 <400> 35
 gtgtaaggag aaggacaggt gctgcccttc gataaaatca atctttatctc atttgcctt 60

 ataa 64

 <210> 36
 < 211> 8
 25 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 <220>
 30 < 223> eliminación

 <400> 36
 ttcggggc 8

 35 <210> 37
 < 211> 8
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 40 <220>
 < 223> eliminación

 <400> 37
 gccccgaa 8

 45 <210> 38
 < 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 50 <220>
 < 223> eliminación
 <400> 38
 tttttataa attcggggct tttt 25

 55 <210> 39
 < 211> 33
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

 60 <220>
 < 223> eliminación

ES 2 648 045 T3

	<400> 39 gccccgaatt tttataaat tcggggcttt ttt	33
5	<210> 40 < 211> 98 < 212> ADN < 213> Artificial	
10	<220> < 223> eliminación	
	<400> 40 atgagccgct atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac	60
	ctaaagcccc gaatttttta taaattcggg gctttttt	98
15	<210> 41 < 211> 128 < 212> ADN < 213> Artificial	
20	<220> < 223> eliminación	
	<400> 41 gacagtgaat gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct atgcaaaatg tttaaaaatg	60
	catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc gaatttttta taaattcggg	120
25	gctttttt	128
	<210> 42 < 211> 263 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis	
30	<400> 42 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg	60
	tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120
	gtttaagctg aagccgacag taaaagtctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca	180
	aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt	240
	ttttataaat tcggggcttt ttt	263
35	<210> 43 < 211> 41 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis	
40	<400> 43 acagaatagt ctttaagta agtctactct gaatttttt a	41
	<210> 44 < 211> 57 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis	
45	<400> 44 atttatcga agggcagcac ctgtcctct ccttacctt tgaggagggt gaacaca	57
50	<210> 45 < 211> 328	

ES 2 648 045 T3

< 212> ADN
 < 213> Bacillus subtilis

<400> 45
 tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tcgctataat 60
 aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtgga aatcccgacc 120
 ggcggtagta aagcacattt gctttagagc cCGtgaccCG tgtgcataag cacgcggtgg 180
 attcaattta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
 atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
 5 gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 46
 < 211> 328
 < 212> ADN
 < 213> Bacillus subtilis

10
 <400> 46
 tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tcgctataat 60
 aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtgga aatcccgacc 120
 ggcggtagta aagcacattt gctttagagt cCGtgaccCG tgtgcataag cacgcggtgg 180
 attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
 atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
 gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 47
 < 211> 328
 < 212> ADN
 < 213> Bacillus subtilis

15
 20
 <400> 47
 tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tcgctataat 60
 aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaaaatgga aatcccgacc 120
 ggcggtagta aagcacattt gctttagagc cCGtgaccCG tgtgcataag cacgcggtgg 180
 attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
 atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
 gaatttttta taaattcggg gctttttt 328

<210> 48
 < 211> 320
 < 212> ADN
 < 213> Bacillus subtilis

25
 30
 <400> 48
 tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tcgctataat 60
 aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtgga aatcccgacc 120
 ggcggtagta aagcacattt gctttagagc cCGtgaccCG tgtgcataag cacgcggtgg 180
 attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct 240
 atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc 300
 gaatttttta taaatttttt 320

ES 2 648 045 T3

	<210> 49		
	< 211> 320		
	< 212> ADN		
5	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 49		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgctact ttaaaaagga tcgctataat	60	
	aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtgga aatcccgacc	120	
	ggcggtagta aagcacatth gctttagagc cegtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg	180	
	attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct	240	
	atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaattttt	300	
	tataaattcg gggctttttt	320	
10	<210> 50		
	< 211> 303		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
15	<400> 50		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgctact ttaaaaagga tcgctataat	60	
	aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtgga aatcccgacc	120	
	ggcggtagta aagcacatth gctttagagc cegtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg	180	
	attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct	240	
	atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaagcccc	300	
	gaa	303	
20	<210> 51		
	< 211> 295		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
25	<400> 51		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgctact ttaaaaagga tcgctataat	60	
	aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtgga aatcccgacc	120	
	ggcggtagta aagcacatth gctttagagc cegtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg	180	
	attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg atgagccgct	240	
	atgcaaaatg tttaaaaatg catagtgtta tttcctattg cgtaaaatac ctaaa	295	
	<210> 52		
	< 211> 230		
30	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 52		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgcgctact ttaaaaagga tcgctataat	60	
	aaccaataag gacaaatgaa taaagattgt atccttcggg gcaggggtgga aatcccgacc	120	
	ggcggtagta aagcacatth gctttagagc cegtgacccg tgtgcataag cacgcggtgg	180	
	attcagttta agctgaagcc gacagtgaaa gtctggatgg gagaaggatg	230	
35	<210> 53		
	< 211> 204		

ES 2 648 045 T3

	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 53		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tCGctataat	60	
	aaccaataag gacaaatgaa taaagattgg atccttcggg gcagggtgga aatcccgacc	120	
	ggcggtagta aagcacattt gctttagagc cCGtgacccg tgtgtataag cacgcggtgg	180	
5	attcagttta agctgaagcc atgg	204	
	<210> 54		
	< 211> 65		
10	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 54		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc attgCGTact ttaaaaagga tCGctataat	60	
	aacca	65	
15	<210> 55		
	< 211> 349		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
20	<400> 55		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg	120	
	ggcagggtgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgaccc	180	
	gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg	240	
	ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttctatt	300	
	gcgtaaaata cctaaagccc cgaatttttt ataaattcgg ggctttttt	349	
	<210> 56		
	< 211> 347		
25	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 56		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taattttaat tttatttgac aaaaatgggc	60	
	tCGtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg	120	
	cagggtggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg cttagagcc cgtgaccct	180	
	gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg	240	
	agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttctattgc	300	
	gtaaaatacc taaagccccg aattttttat aaattcgggg ctttttt	347	
30	<210> 57		
	< 211> 347		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
35	<400> 57		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taattttaat tttatttgac aaaaatgggc	60	
	tCGtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgga tccttcgggg	120	
	caaaatggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg cttagagcc cgtgaccct	180	

ES 2 648 045 T3

	gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg	240
	agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc	300
	gtaaaatacc taaagccccg aatTTTTTat aaattcgggg cTTTTT	347
5	<210> 58 < 211> 347 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis	
	<400> 58	
	tttgtTTTTc tcaaattgta agtttatttc taattttaa tttatttgac aaaaatgggc	60
	tctgtttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg	120
	cagggtgga atccccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagtc cgtgaccct	180
	gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg	240
	agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc	300
10	gtaaaatacc taaagccccg aatTTTTTat aaattcgggg cTTTTT	347
	<210> 59 < 211> 349 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis	
15	<400> 59	
	tttgtTTTTc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaagggt attgactttc	60
	cctacaggggt gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg	120
	ggcaggggtg aaatccccgac cggcggtagt aaagcacatt tgcttttagag cccgtgacc	180
	gtgtgcataa gcacgcggtg gattcaattt aagetgaagc cgacagtgaa agtctggatg	240
	ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt	300
	gcgtaaaata cctaaagccc cgaatttttt ataaattcgg ggetTTTTT	349
20	<210> 60 < 211> 328 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis	
25	<400> 60	
	tttgtTTTTc tcaaattgta agtttatttc taattttaa tttatttgac aaaaatgggc	60
	tctgtttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg	120
	cagggtgga atccccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgaccct	180
	gtgcataagc acgcggtgga ttcaatttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg	240
	agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc	300
	gtaaaatacc taaagccccg aatTTTTT	328
30	<210> 61 < 211> 324 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis	

ES 2 648 045 T3

	<400> 61		
	tttgtttttc tcaaattgta agttttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg	120	
	ggcaggggtgg aaatcccgcac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgacct	180	
	gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg	240	
	ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt	300	
	gcgtaaaata cctaaagccc cgaa	324	
	<210> 62		
5	< 211> 322		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 62		
	tttgtttttc tcaaattgta agttttatttc taattttaat tttatttgac aaaaatgggc	60	
	tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg	120	
	caggggtggaa atcccgcaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacctgt	180	
	gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg	240	
	agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc	300	
10	gtaaaatacc taaagccccg aa	322	
	<210> 63		
	< 211> 316		
	< 212> ADN		
15	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 63		
	tttgtttttc tcaaattgta agttttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg	120	
	ggcaggggtgg aaatcccgcac cggcggtagt aaagcacatt tgctttagag cccgtgacct	180	
	gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg	240	
	ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt	300	
20	gcgtaaaata cctaaa	316	
	<210> 64		
	< 211> 314		
	< 212> ADN		
25	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 64		
	tttgtttttc tcaaattgta agttttatttc taattttaat tttatttgac aaaaatgggc	60	
	tcgtgttgta caataaatgt agtgataagg acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg	120	
	caggggtggaa atcccgcaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacctgt	180	
	gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg	240	
	agaaggatga tgagccgcta tgcaaaatgt ttaaaaatgc atagtgttat ttcctattgc	300	
	gtaaaatacc taaa	314	
30	<210> 65		
	< 211> 251		

ES 2 648 045 T3

	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 65		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tatccttcgg	120	
	ggcaggggtg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgcttttagag cccgtgacct	180	
	gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtga agtctggatg	240	
5	ggagaaggat g	251	
	<210> 66		
	< 211> 86		
10	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 66		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaatt	86	
15	<210> 67		
	< 211> 225		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
20	<400> 67		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg gatccttcgg	120	
	ggcaaaatgg aaatcccgac cggcggtagt aaagcacatt tgcttttagag cccgtgacct	180	
	gtgtgtataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc catgg	225	
	<210> 68		
	< 211> 223		
25	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 68		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc	60	
	tcgtgttgta caataaatgt agtgataag acaaatgaat aaagattgga tccttcgggg	120	
	caaaaatggaa atcccgaccg gcggtagtaa agcacatttg ctttagagcc cgtgacctgt	180	
	gtgtataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagcca tgg	223	
30	<210> 69		
	< 211> 316		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
35			

ES 2 648 045 T3

	<400> 69		
	tttgtttttc tcaaattgta agttttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tacccttcgg	120	
	ggcaggggtg aaatcccgcg cgcggtagt aaagcacatt tgcttttagag tccgtgacct	180	
	gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagctgaagc cgacagtgaa agtctggatg	240	
	ggagaaggat gatgagccgc tatgcaaaaat gtttaaaaat gcatagtgtt atttcctatt	300	
	gcgtaaaata cctaaa	316	
	<210> 70		
5	< 211> 251		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 70		
	tttgtttttc tcaaattgta agttttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg tacccttcgg	120	
10	ggcaggggtg aaatcccgcg cgcggtagt aaagcacatt tgcttttagag tccgtgacct	180	
	gtgtgcataa gcacgcggtg gattcagttt aagetgaagc cgacagtgaa agtctggatg	240	
	ggagaaggat g	251	
	<210> 71		
15	< 211> 249		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 71		
	tttgtttttc tcaaattgta agttttatttc taatttaaat tttatttgac aaaaatgggc	60	
	tcgtgttgta caataaatgt agtgataagc acaaatgaat aaagattgta tccttcgggg	120	
	cagggtgtaa atcccgcacc gcggtagtaa agcacatttg ctttagagtc cgtgacctgt	180	
	gtgcataagc acgcggtgga ttcagtttaa gctgaagccg acagtgaaag tctggatggg	240	
20	agaaggatg	249	
	<210> 72		
	< 211> 186		
25	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		
	<400> 72		
	tttgtttttc tcaaattgta agttttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg cagaatagtc	120	
	ttttaagtaa gtctactctg aattttttta gacggtaaat aacaaaagag gggagggaaa	180	
	caaatg	186	
30	<210> 73		
	< 211> 203		
	< 212> ADN		
	< 213> Bacillus subtilis		

ES 2 648 045 T3

	<400> 73		
	tttgtttttc tcaaattgta agtttatttc taaaaatttt acaaaaaggt attgactttc	60	
	cctacagggg gtgtaataat ttaattataa ggacaaatga ataaagattg attttatoga	120	
	agggcagcac ctgtccttct ccttacctt tgagggaggt gaacacagac ggtaaataac	180	
	aaaagagggg agggaaacaa atg	203	
5	<210> 74 < 211> 263 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis		
	<400> 74		
	ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg	60	
	tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120	
	atttaagctg aagccgacag tgaagctctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca	180	
	aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt	240	
10	ttttataaat tcggggcttt ttt	263	
	<210> 75 < 211> 263 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis		
15	<400> 75		
	ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg	60	
	tagtaaagca catttgcttt agagtccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120	
	gtttaaagctg aagccgacag tgaagctctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca	180	
	aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt	240	
	ttttataaat tcggggcttt ttt	263	
20	<210> 76 < 211> 263 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis		
25	<400> 76		
	ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcaaa atggaaatcc cgaccggcgg	60	
	tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120	
	gtttaaagctg aagccgacag tgaagctctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca	180	
	aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt	240	
	ttttataaat tcggggcttt ttt	263	
30	<210> 77 < 211> 263 < 212> ADN < 213> Bacillus subtilis		
	<400> 77		
	ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg	60	
	tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120	

ES 2 648 045 T3

	gtttaagctg aagccgacag tgaagctctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca	180
	aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt	240
	ttttataaat tcggggcttt ttt	263
5	<210> 78 < 211> 230 < 212> ADN < 213> <i>Bacillus subtilis</i>	
	<400> 78 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg	60
	tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120
	gtttaagctg aagccgacag tgaagctctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca	180
10	aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa	230
15	<210> 79 < 211> 255 < 212> ADN < 213> <i>Bacillus subtilis</i>	
	<400> 79 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg	60
	tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120
	gtttaagctg aagccgacag tgaagctctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca	180
	aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa gccccgaatt	240
	ttttataaat ttttt	255
20	<210> 80 < 211> 255 < 212> ADN < 213> <i>Bacillus subtilis</i>	
25	<400> 80 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg	60
	tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120
	gtttaagctg aagccgacag tgaagctctg gatgggagaa ggatgatgag ccgctatgca	180
	aaatgtttaa aaatgcatag tgttatttcc tattgcgtaa aatacctaaa tttttataa	240
	attcggggct ttttt	255
30	<210> 81 < 211> 165 < 212> ADN < 213> <i>Bacillus subtilis</i>	
	<400> 81 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tcggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg	60
	tagtaaagca catttgcttt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca	120
35	gtttaagctg aagccgacag tgaagctctg gatgggagaa ggatg	165
	<210> 82 < 211> 135	

ES 2 648 045 T3

< 212> ADN
 < 213> Bacillus subtilis

<400> 82
 ataaggacaa atgaataaag attgtatcct tccggggcagg gtggaaatcc cgaccggcgg 60
 tagtaaagca catttgettt agagcccgtg acccgtgtgc ataagcacgc ggtggattca 120
 5 gtttaagctg aagcc 135

<210> 83
 < 211> 26
 < 212> ADN
 10 < 213> Artificial

<220>
 < 223> cebador

15 <400> 83
 gtagtaaagc acattgctt tagagc 26

<210> 84
 < 211> 36
 20 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> cebador

25 <400> 84
 caaatgtgct ttactactgc cggtcgggat ttccac 36

<210> 85
 < 211> 21
 < 212> ADN
 30 < 213> Artificial

<220>
 < 223> cebador

35 <400> 85
 gcggtagtaa agcacatttg c 21

40 <210> 86
 < 211> 40

< 212> ADN
 < 213> Artificial
 45 <220>

< 223> cebador
 <400> 86
 caaatgtgct ttactaccgc tggtcgggat ttccaccctg 40

50 <210> 87
 < 211> 26
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

55 <220>
 < 223> cebador

<400> 87
 60 tagtaaagca catttgctt agagcc 26

ES 2 648 045 T3

<210> 88
 < 211> 45
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 5
 <220>
 < 223> cebador
 <400> 88
 10 gctctaaagc aaatgtgctt tactatcgcc ggtcgggatt tccac 45
 <210> 89
 < 211> 21
 < 212> ADN
 15 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 20 <400> 89
 gtgaccctgtg tgcataagca c 21
 <210> 90
 < 211> 45
 25 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> cebador
 30 <400> 90
 tgcttatgca cacgggtcac aggctctaaa gcaaattgtgc ttac 45
 <210> 91
 < 211> 22
 < 212> ADN
 35 < 213> Artificial
 <220>
 40 < 223> cebador
 <400> 91
 tgaagccgac agtgaaagtc tg 22
 45 <210> 92
 < 211> 41
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 50 <220>
 < 223> cebador
 <400> 92
 55 gactttcact gtcggcttca acttaaactg aatccaccgc g 41

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido que comprende un polinucleótido que codifica una secuencia líder del operón de riboflavina (secuencia líder *rib*), en donde una secuencia de ADN de acuerdo con la SEQ ID NO: 42 se ha modificado por introducción de eliminaciones en el extremo 3', en donde el polinucleótido modificado se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) polinucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 42, que comprenden una eliminación de al menos las secuencias de acuerdo con los nucleótidos 166 a 263 mostradas en la SEQ ID NO: 42,
- (b) polinucleótidos cuya cadena complementaria hibrida en condiciones restrictivas con el polinucleótido como se define en (a),
- 10 (c) polinucleótidos que son al menos 95 o 98% idénticos al polinucleótido como se define en (a), y
- (d) polinucleótidos que son la cadena complementaria del polinucleótido definido en (a) a (c);
- en donde dicho polinucleótido que codifica dicha secuencia líder *rib* comprende además una o más mutaciones *ribO* en el elemento RFN de acuerdo con los nucleótidos 25 a 164 mostrado en la SEQ ID NO:42, y en donde la acumulación del transcrito de ARNm de *rib* de longitud completa, intacto, aumenta en al menos 5% comparado con una secuencia líder *rib* no modificada.
- 15 2. El polinucleótido según la reivindicación 1, en donde la eliminación en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* es una eliminación de los nucleótidos 136 a 263 mostrada en la SEQ ID NO: 42.
3. El polinucleótido según la reivindicación 1 o 2, en donde la eliminación en el extremo 3' de la secuencia líder *rib* consiste en los nucleótidos 166 a 263 o 136 a 263 mostrada en la SEQ ID NO: 42.
- 20 4. El polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde una secuencia líder *rib* modificada mostrada en la SEQ ID NO: 81 u 82, se ha modificado además por introducción de una o más mutaciones *ribO* en el elemento RFN de acuerdo con los nucleótidos 25 a 164 mostrados en la SEQ ID NO: 42.
5. El polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las sustituciones en el elemento RFN se seleccionan de una o más sustituciones en una posición correspondiente a T31, G39, G40, G41, C55, C85, C86, G88, C93, A116, G121, C128, y combinaciones mostradas en la SEQ ID NO: 42.
- 25 6. El polinucleótido según la reivindicación 5, en donde la una o más sustituciones se seleccionan del grupo que consiste en G39A, G40A, G41A, C85T, G121A, y combinaciones de las mismas.
7. El polinucleótido según la reivindicación 6, en donde las sustituciones son una combinación de G39A, G40A y G41A.
- 30 8. El polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, seleccionado del grupo que consiste en polinucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70 o 71.
9. Un microorganismo que produce riboflavina que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 35 10. El microorganismo que produce riboflavina según la reivindicación 9, que produce al menos 5% más riboflavina a partir de una fuente de carbono dada, comparado con la producción de riboflavina usando un microorganismo que lleva una secuencia líder *rib* no modificada codificada por un polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 42.
11. El microorganismo que produce riboflavina según la reivindicación 9 o 10, en donde la acumulación de ARNm de riboflavina de longitud completa, intacto, es mejor comparada con un microorganismo que lleva una secuencia líder *rib* no modificada codificada por un polinucleótido como se muestra en la SEQ ID NO: 42.
- 40 12. Un procedimiento para la producción de riboflavina, en donde un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, se incuba en un medio acuoso en condiciones que permiten la producción de riboflavina a partir de un sustrato dado.
13. Procedimiento para la producción de transcritos de ARNm de longitud completa a partir de genes biosintéticos de riboflavina en un microorganismo que produce riboflavina, por introducción en dicho microorganismo de un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 45 14. El uso de un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un microorganismo según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, para la producción de riboflavina.

Figura 1:

A.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatattacgagaatttacggttttttatc 60
 61 atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgtagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
 181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgtccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcgggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgaacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagttagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaattaa 360
 361 atcaggatztatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaagggtgcaaaagtgaatgattaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaagggtgatgttttgttttctcaaatgtaagtttatttca**ttgcgt**acttta 540
 541 aaaggatcgct**tataat**aacca**At**aaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
 601 ggtggaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagcccggtg 660
 661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
 721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
 781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggagggaaacaa **atg** 860

Figura 1 cont.:

B.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatattacgagaatttacgggtttttatc 60
 61 atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgccttttacttgaggcg 180
 181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgtccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcggagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaattaa 360
 361 atcaggatthtctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaaggttgaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaagggatggttttgtttttctcaaatgtgaagtttatttcattgcgtactttaa 540

A

541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggca**G** 600
AA (*triple ribO*) **T** (RK41)
 601 **GG**tggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagag**C**ccgtgaccctgtg 660

A (RK1a)

661 cataagcacgcggtggattca**G**tttaagctgaagccgacagtgaaggtctggatgggaga 720
 721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
 781 aaatacctaaagccccgaatttttataaatccggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggagggaaacaa atg 860

Figura1 cont.:

C.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggttttttattc 60
 61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctggttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
 181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgtccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcggagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaattaa 360
 361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaagggatgattttgttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtacttta 540
 541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
 601 ggtggaatcccgaccggcggtagtaaacacatttgcttttagagcccgtagcccggtg 660
 661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaagctctggatgggaga 720
 721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
 781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggagggaaacaa atg 860

D.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggttttttattc 60
 61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggaggtttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctggttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
 181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgtccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcggagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaattaa 360
 361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaaggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaagggatgattttgttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtacttta 540
 541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
 601 ggtggaatcccgaccggcggtagtaaacacatttgcttttagagcccgtagcccggtg 660
 661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaagctctggatgggaga 720
 721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
 781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggagggaaacaa atg 860

Figura1 cont.:

E.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacgggtttttattc 60
 61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctggttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
 181 gttatatgtacataaaatgatattgagctgaaggatgtccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcgggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgaacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaattaa 360
 361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaaggggtgatgttttggttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtacttta 540
 541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
 601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagcccggtg 660
 661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
 721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
 781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggaggggaaacaa atg 860

F.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacgggtttttattc 60
 61 atgaaaaaaaggaataaactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctggttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
 181 gttatatgtacataaaatgatattgagctgaaggatgtccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcgggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgaacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaattaa 360
 361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaaggggtgatgttttggttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtacttta 540
 541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
 601 ggtggaaatcccgaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtagcccggtg 660
 661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
 721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
 781 aaatacctaaagccccgaattttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggaggggaaacaa atg 860

Figura 1 cont.:

G.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggttttttattc 60
 61 atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctggttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
 181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
 361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaagggatgatgttttgttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
 541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
 601 ggtggaaatcccgaaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtgaccctgtg 660
 661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaagctctggatgggaga 720
 721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
 781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggagggaacaa atg 860

H.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatttacgagaatttacggttttttattc 60
 61 atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctggttagtgcttttgcttttacttgcaggcg 180
 181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaaattaa 360
 361 atcaggatttatctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaagggttgcaaaagtgaatgattaaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaagggatgatgttttgttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
 541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
 601 ggtggaaatcccgaaccggcggtagtaaagcacatttgcttttagagcccgtgaccctgtg 660
 661 cataagcacgcggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaagctctggatgggaga 720
 721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
 781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggagggaacaa atg 860

Figura 1 cont.:

I.

1 acatattcccgttatgcatcgttatattaattatattacgagaatttacggttttttattc 60
 61 atgaaaaaaaggaataactcatatgaatgaatagattcatattggctggagggttagaaa 120
 121 tgggaagaataaaaaccaagattaccattctgttagtgcttttgccttttacttgcaggcg 180
 181 gttatatgtacataaatgatattgagctgaaggatgttccgacagcaattggacaaacct 240
 241 tgtcctcggaagaagaggaatacaccatccaggaatataaagtgacgaaaattgacggct 300
 301 cagagtatcatggagtagcagaaaacggaacgaaaatcatcttcaacggaaaaaattaa 360
 361 atcaggatthtctgatataaaagaaggtgacaagattaaggcttacttcagcaaatcaa 420
 421 agcggatcgacggattaatcaagggtgcaaaagtgaatgattaaaaacatcacctttcg 480
 481 gatcgaaggtgatgttttgttttctcaaattgtaagtttatttcattgcgtactttaa 540
 541 aaaggatcgctataataaccaataaggacaaatgaataaagattgtatccttcggggcag 600
601 ggtgaaatcccgaccggcgttagtaaagcacatttgcttttagagcccgtgaccggtgtg 660
661 cataagcaccggtggattcagtttaagctgaagccgacagtgaaagtctggatgggaga 720
721 aggatgatgagccgctatgcaaaatgtttaaaaatgcatagtgttatttcctattgcgta 780
781 aaatacctaaagccccgaatttttataaattcggggcttttttgacggtaataacaaa 840
 841 agaggggagggaacaa atg 860

Figura 2:

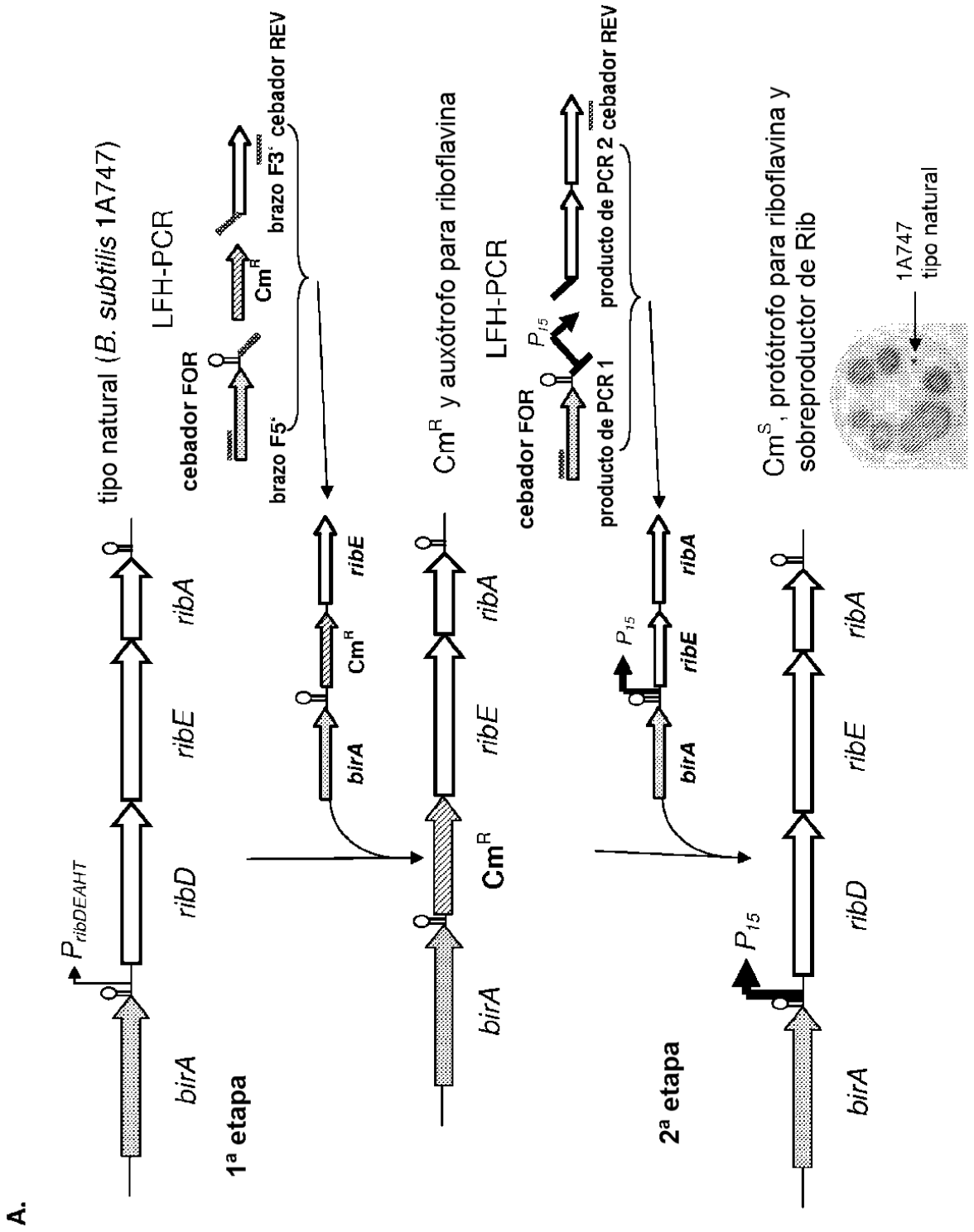


Figura 2 (cont.):

B.

