

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 809**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12N 15/74** (2006.01)

**C12P 13/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2013 PCT/KR2013/000221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13105802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2013 E 13736186 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2803722**

54 Título: **Microorganismos de Corynebacterium que pueden utilizar xilosa y procedimiento de producción de L-lisina utilizando los mismos**

30 Prioridad:

**10.01.2012 KR 20120003133**

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

**15.02.2018**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
330 Dongho-ro, Jung-gu  
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**RAH, SO YEON;  
HUH, LAN;  
KIM, CHANG GYEOM;  
LEE, KWANG HO;  
MOON, JUN OK;  
LEE, KYUNG HAN;  
SUNG, JIN SEOK y  
KIM, HYUNG JOON**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 654 809 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

Microorganismos de *Corynebacterium* que pueden utilizar xilosa y procedimiento de producción de L-lisina utilizando los mismos

### Antecedentes

#### 5 1. Campo

La presente divulgación se refiere a un microorganismo de *Corynebacterium* sp. modificado para que utilice xilosa y un procedimiento para producir L-lisina utilizando el mismo.

#### 2. Descripción de la técnica relacionada

10 Los microorganismos industriales utilizan azúcares tales como glucosa, fructosa y sacarosa como fuente de carbono. Los productos agrícolas se utilizan habitualmente como materia prima para obtener estas fuentes de carbono, pero son caras y son más valiosos como alimento. Recientemente, en vez de utilizar productos agrícolas como materia prima tradicional, han atraído la atención biomasa celulósica incluyendo residuos agrícolas o residuos madereros, residuos industriales, etc. como un material de azúcar en bruto para la fermentación, debido a que tiene la ventaja de bajo coste y suministro abundante.

15 Entre ellos, la xilosa es el segundo carbohidrato lignocelulósico más abundante en la naturaleza y es una biomasa celulósica representativa. Se han producido materiales útiles a partir de la xilosa utilizando microorganismos industriales. Por ejemplo, se conoce un procedimiento de producción de L-aminoácidos, cultivando una cepa de *Escherichia* sp. en un medio que contiene una mezcla de pentosas incluyendo glucosa y xilosa, en el que la cepa está modificada en cuanto a un aumento de expresión del agrupamiento genético xylABFGHR que codifica una enzima (xilosidasa) que hidroliza el xilósido, que es un derivado glicosídico de la xilosa, y después se recupera el L-aminoácido del medio (Patente Japonesa N° 4665567).

20 Por otra parte, se conoce una bacteria Corineforme, el *Corynebacterium glutamicum*, como una cepa Gram-positiva que se utiliza en la producción de distintos L-aminoácidos. Como se ha descrito anteriormente, debido a que la xilosa es el segundo carbohidrato lignocelulósico más abundante en la naturaleza, se espera que los L-aminoácidos tales como la L-lisina puede producirse más económicamente con *Corynebacterium glutamicum* utilizando xilosa. Sin embargo, el *Corynebacterium glutamicum* no tiene genes importantes que estén implicados en la ruta metabólica de la xilosa, que es una pentosa, y por lo tanto existe el problema de que no se puede producir un L-aminoácido a partir de *Corynebacterium glutamicum* utilizando xilosa. Para resolver este problema, existe un informe en el que se modifica el *Corynebacterium glutamicum* para que sea capaz de utilizar la xilosa introduciendo xilosa isomerasa (XylA) y xilulocinasa (XylB) derivadas de *Escherichia coli* (Kawaguchi y col., AEM 72:3418-3428, 2006).

30 El documento WO2009/12073 desvela cepas de *Zymomonas* modificadas por la introducción de un gen de xilosa isomerasa que contiene un promotor mutante del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Z. mobilis*. El promotor dirige un aumento de expresión de xilosa isomerasa, y cuando la cepa se modifica además para la expresión de xilulocinasa, transaldolasa y transcetolasa, se obtenía una mejora en la utilización de la xilosa.

35 Los presentes autores han hecho extensos esfuerzos para producir un L-aminoácido de manera más económica, y como resultados, descubrieron que cuando los genes que codifican XylA y XylB derivados de *Erwinia carotovora* se introducían en *Corynebacterium glutamicum*, la variante era capaz de utilizar la xilosa para producir L-lisina y también demuestran una capacidad de utilizar la xilosa mejorada que la conocida previamente para el microorganismo Corineforme en que se había introducido una XylA y XylB derivadas de *Escherichia coli*, completando de esta manera la presente divulgación.

### Sumario

Un objetivo de la presente divulgación es la provisión de un microorganismo de *Corynebacterium* sp. modificado que es capaz de producir L-lisina utilizando xilosa.

45 Otro objetivo de la presente divulgación es la provisión de un procedimiento para producir L-lisina utilizando el microorganismo de *Corynebacterium* sp. modificado.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un mapa de escisión de un vector de expresión pECCG122-pcj7-xylAB(Er) de la presente divulgación;

50 La FIG. 2 muestra un gráfico que presenta las características de cultivo de una cepa parental y un transformante al que se ha introducido el vector de expresión de acuerdo con una fuente de carbono contenida en un medio; y

La FIG. 3 muestra un gráfico que presenta las características de cultivo de una cepa parental y un transformante en el que se ha insertado pcj7-xylAB(Er) en el cromosoma de acuerdo con una fuente de carbono contenido en un medio.

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un microorganismo de *Corynebacterium* sp. capaz de producir L-lisina utilizando xilosa, que se caracteriza porque se han introducido en el mismo las actividades de xilosa isomerasa y xilulocinasa derivadas de *Erwinia carotovora*.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “xilosa isomerasa (XylA)” significa una enzima que cataliza una reacción de isomerización de xilosa a xilulosa, que está implicada en la ruta metabólica de la xilosa, y con respecto al objetivo de la presente divulgación, puede ser una enzima derivada de *Erwinia carotovora*.

10 La XylA es una xilosa isomerasa derivada de *Erwinia carotovora* y puede incluir una secuencia capaz de proporcionar la capacidad de utilizar la xilosa introduciendo su actividad junto con la actividad de la xilulocinasa derivada de *Erwinia carotovora* en el microorganismo de *Corynebacterium* sp. que no tiene actividad xilosa isomerasa, sin limitación. Además, es evidente que cualquier secuencia que tenga una actividad equivalente a la de la secuencia anterior, aunque no se derive de *Erwinia carotovora*, está incluida en la presente divulgación.

15 Por ejemplo, se puede incluir una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos que contiene una secuencia conservada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de un aminoácido o varios aminoácidos (que puede variar dependiendo de las posiciones y tipos de restos de aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína, específicamente 2 a 20, específicamente 2 a 10, más específicamente 2 a 5 aminoácidos) (en una o más posiciones. Se puede incluir a condición de que sea capaz de mantener o aumentar la actividad de XylA, una secuencia de aminoácidos que tenga un 95 % o más, mucho más específicamente un 97 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión del aminoácido también incluye una secuencia mutada de origen natural en el microorganismo que tenga actividad XylA o una secuencia modificada artificialmente.

25 Como se utiliza en el presente documento, el término “homología” se refiere a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de nucleótidos diferentes, y se puede determinar por un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, BLAST 2.0, que calcula los parámetros tales como la valoración, identidad y similitud, pero no se limita particularmente al mismo.

Como se utiliza en el presente documento, el término “xilulocinasa” significa una enzima que cataliza la reacción de producción de xilulosa a xilulosa 5-fosfato, que está implicada en la ruta metabólica de la xilosa, y con respecto al objetivo de la presente divulgación, puede ser una enzima derivada de *Erwinia carotovora*.

30 La XylB es la xilulocinasa derivada de *Erwinia carotovora* y puede incluir una secuencia capaz de proporcionar la capacidad de utilizar la xilosa por la introducción de su actividad junto con la actividad de la xilosa isomerasa derivada de *Erwinia carotovora* en el microorganismo de *Corynebacterium* sp. que no tiene actividad xilulocinasa, sin limitación. Además, es evidente que cualquier secuencia que tenga una actividad equivalente a la secuencia anterior, aunque no se derive de *Erwinia carotovora*, está incluida en el ámbito de la presente divulgación.

35 Por ejemplo, se puede incluir una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos que contienen una secuencia conservada de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y una sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión de un aminoácido o varios aminoácidos ( que pueden variar dependiendo de las posiciones y tipos de restos de aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína, específicamente de 2 a 20, específicamente de 2 a 10, más específicamente de 2 a 5 aminoácidos) en una o más posiciones. Se puede incluir a condición de que sea capaz de mantener o aumentar la actividad de XylB, una secuencia de aminoácidos que tenga un 95 % o más, mucho más específicamente un 97 % o más de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión del aminoácido también incluye una secuencia mutada de origen natural en el microorganismo que tenga actividad XylB o una secuencia modificada artificialmente.

45 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “gen que codifica la xilosa isomerasa (XylA) (de aquí en adelante (*xyIA*))” significa un polinucleótido que codifica la XylA descrita anteriormente.

50 El gen puede incluir una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, una secuencia de nucleótidos que se pueda hibridar con una sonda derivada de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 en “condiciones rigurosas”, o una secuencia de nucleótidos en los que uno o varios nucleótidos esta/están sustituidos, eliminados, insertados, o añadidos en una o más posiciones de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3. A condición de que sea capaz de mantener o aumentar la actividad de XylA, el gen puede incluir una secuencia de nucleótidos que tenga un 80 % o más, específicamente un 90 % o más, más específicamente un 95 % o más, mucho más específicamente un 97 % o más de homología con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, una secuencia de nucleótidos sustituida con codones favorecidos por las células huésped, una secuencia de nucleótidos en la que se ha extendido o eliminado el extremo N o el extremo C, o una secuencia de nucleótidos en la que el codón de inicio se ha modificado para modificar el nivel de expresión, y de esta manera el gen no está particularmente limitado a los mismos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “gen que codifica la xilulocinasa (XylB) (de aquí en adelante (xylB)” significa un polinucleótido que codifica la XylB descrita anteriormente.

El gen puede incluir una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, una secuencia de nucleótidos que se pueda hibridar con una sonda derivada de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3 en “condiciones rigurosas”, o una secuencia de nucleótidos en los que uno o varios nucleótidos esta/están sustituidos, eliminados, insertados, o añadidos en una o más posiciones de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4. A condición de que sea capaz de mantener o aumentar la actividad de XylB, el gen puede incluir una secuencia de nucleótidos que tenga un 80 % o más, específicamente un 90 % o más, más específicamente un 95 % o más, mucho más específicamente un 97 % o más de homología con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, una secuencia de nucleótidos sustituida con codones favorecidos por las células huésped, una secuencia de nucleótidos en la que se ha extendido o eliminado el extremo N o el extremo C, o una secuencia de nucleótidos en la que el codón de inicio se ha modificado para modificar el nivel de expresión, y de esta manera el gen no está particularmente limitado a los mismos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “condiciones rigurosas” significa las condiciones que permiten una hibridación específica entre polinucleótidos, por ejemplo, la hibridación en un tampón de hibridación a 65 °C (3,53 SSC (0,15 M de NaCl/0,15 M de citrato sódico, pH 7,0), un 0,02 % de Ficoll, un 0,02 % de polivinilpirrolidona, un 0,02 % de seroalbúmina bovina, un 0,5 % de SDS, 2 mM de EDTA, 2,5 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7), y se desvela una descripción detallada en la técnica relacionada (Molecular Cloning (A Laboratory Manual, J. Sambrook y col., Editores, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) o Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., Editores, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Como se ha descrito anteriormente la introducción de las actividades de XylA y XylB en un microorganismo de *Corynebacterium* sp. se puede llevar a cabo por distintos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, hay un procedimiento de inserción de un polinucleótido que incluye las secuencias de nucleótidos que codifican XylA y XylB en un cromosoma, un procedimiento de introducción de un sistema de vector que incluye el polinucleótido en el microorganismo, un procedimiento de introducción de un potente promotor corriente arriba de las secuencias de nucleótido que codifican XylA y XylB, un procedimiento de introducción de xylA y xylB con un promotor modificado, o un procedimiento de introducción de secuencias de nucleótidos modificadas que codifican XylA y XylB, o similares. Más específicamente, si se introducen secuencias de nucleótidos que codifican XylA y XylB, se puede utilizar el promotor pcj7 derivado de *Corynebacterium ammoniagenes* (Patente Coreana N° 10-0620092) como promotor para controlar la expresión de las mismas. En una realización de la presente divulgación, la adquisición de la capacidad de utilizar la xilosa se confirmó como la actividad del gen ajeno ausente en la cepa parental observada por la introducción de un vector de expresión o la inserción cromosómica.

Como se utiliza en el presente documento, el término “vector” se refiere a un producto de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica la proteína diana, que está unida operativamente a una secuencia reguladora adecuada para expresar la proteína diana en una célula huésped. La secuencia reguladora incluye un promotor capaz de iniciar la transcripción, una secuencia operadora arbitraria para regular la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión del ARNm al ribosoma, y secuencias para regular la terminación de la transcripción y la traducción. Una vez transformado en el huésped adecuado, el vector se puede replicar o funcionar independientemente del genoma huésped, o se puede integrar en el propio genoma.

El vector que se utiliza en la presente divulgación no está limitado específicamente y puede ser cualquier vector conocido en la técnica a condición de que pueda replicarse en el huésped. Ejemplos del vector que se utiliza normalmente pueden ser un plásmido, cósmido, virus y bacteriófago naturales o recombinantes. Por ejemplo, se pueden utilizar como el vector fago o el vector cósmido, pWE15, M13, XMBL3, XMBL4, XIXII, XASHII, XAPII, M10, M11, Charon4A, Charon21A o similares. Como vector plasmídico se pueden utilizar, tipo pBR, tipo pUC, tipo pBluescriptII, tipo pGEM, tipo pTZ, tipo pCL, tipo pET o similares.

El vector útil en la presente divulgación no está limitado particularmente, y se puede utilizar el vector de expresión conocido. Específicamente un vector pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC o similares.

Además, el vector que se utiliza en la presente divulgación puede ser un vector capaz de transformar células huésped, para insertar el polinucleótido que codifica la proteína diana en el cromosoma de la célula huésped. Ejemplos específicos del vector incluye, pero no se limita a, el vector lanzadera pECCG112 que puede auto-replicarse en ambas direcciones en *E. coli* /o bacterias de tipo Corineformes. (Patente coreana N° 10-0057684).

Como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” significa una serie de operaciones para la introducción de un vector que incluye un polinucleótido que codifica la proteína diana en una célula huésped de manera que exprese la proteína codificada por el polinucleótido en la célula huésped. El polinucleótido que se va a introducir en la célula huésped puede tener cualquier formar, a condición de que se introduzca en la célula huésped y se exprese en ella. Por ejemplo, el polinucleótido se puede introducir en una célula huésped en forma de casete de expresión que es una estructura que incluye todos los elementos (un promotor unido operativamente al polinucleótido, una señal de terminación, un sitio de unión al ribosoma, una señal de terminación de la señal, etc.) necesarios para la auto-expresión. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión auto-

replicable. Además, el propio polinucleótido se puede introducir en una célula huésped para unirse operativamente a una secuencia necesaria para la expresión en la célula huésped.

La célula huésped puede ser uno cualquiera de microorganismos procariotas, a condición de que sea capaz de producir L-lisina. Ejemplos de la célula huésped puede incluir microorganismos de *Providencia* sp., *Corynebacterium* sp. y *Brevibacterium* sp., específicamente, un microorganismo de *Corynebacterium* sp., y más específicamente *Corynebacterium glutamicum*. En una realización de la presente divulgación, cuando microorganismos de *Corynebacterium* sp. como KCCM11016P, KCCM10770P, KFCC10750, y CJ3P no tienen la capacidad de utilizar la xilosa se les introduce XylA y XylB derivadas de *Erwinia carotovora*, se les provee de la capacidad de utilizar la xilosa, y como resultado, pueden producir L-aminoácidos como la L-lisina utilizando la xilosa como fuente de carbono (Tablas 1 a 6).

Un microorganismo de *Corynebacterium* sp. que tiene la capacidad de producir L-lisina puede ser una variante resistente a un análogo de la L-lisina. El análogo de L-lisina inhibe el crecimiento de microorganismos Corineformes, pero esta inhibición se desensibiliza total o parcialmente cuando coexiste L-lisina en un medio. Ejemplos de análogos de L-lisina incluyen, pero no se limita oxa-L-lisina, hidroxamato de L-lisina, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC),  $\gamma$ -metil L-lisina,  $\alpha$ -clorocapro lactamo o similares. La variante que tiene resistencia a estos análogos de L-lisina se puede obtener por tratamiento de mutagénesis artificial convencional del microorganismo de Corineforme. Además, cuando se lleva a cabo la manipulación genética para inducir un microorganismo productor de L-lisina, se puede conseguir mejorando la expresión de uno o más genes que codifican enzimas implicadas en el sistema biosintético de L-lisina. Ejemplos de estos genes pueden incluir el gen de la dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*), gen de aspatocinasa (*lysC*), gen de la dihidrodipicolinato reductasa (*dapB*), gen de diaminopimelato descarboxilasa (*lysA*), gen de la diaminopimelato deshidrogenasa (*ddh*), gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), gen de la aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*) y gen de aspartasa (*aspa*), pero no se limita a los mismos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "L-lisina" es uno de los  $\alpha$ -aminoácidos básicos, es un aminoácido esencial que no se sintetiza en el cuerpo, es uno de los L-aminoácidos, y tiene la fórmula química de  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ . La L-lisina se sintetiza a partir del oxaloacetato mediante la ruta biosintética de L-lisina, y una reductasa dependiente de NADPH cataliza un proceso intermedio para la biosíntesis de L-lisina. Durante el proceso biosintético de 1 molécula de L-lisina se consumen directamente 3 moléculas de NADPH por las correspondientes enzimas, y se utiliza indirectamente una molécula de NADPH.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "un microorganismo de *Corynebacterium* sp. capaz de producir L-lisina" significa un microorganismo de *Corynebacterium* sp. modificado para producir L-lisina a partir de xilosa, que se prepara introduciendo genes que codifican las enzimas implicadas en el metabolismo de xilosa y no se encuentran en el microorganismo de *Corynebacterium* sp. El microorganismo de *Corynebacterium* sp. puede ser pero no se limita particularmente a, *Corynebacterium glutamicum*, y las enzimas implicadas en el metabolismo de xilosa pueden ser, pero no se limitan particularmente a, XylA y XylB.

A este respecto, la línea celular puede ser de microorganismos de *Corynebacterium* sp., en que la expresión de uno o más de los genes que codifican las enzimas implicadas en el sistema biosintético de L-lisina están mejorados, y los genes que codifican las enzimas implicadas en el sistema biosintético de L-lisina puede ser, pero no se limita al gen de la dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*), gen de aspatocinasa (*lysC*), gen de la dihidrodipicolinato reductasa (*dapB*), gen de diaminopimelato descarboxilasa (*LysA*), gen de la diaminopimelato deshidrogenasa (*ddh*), gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), gen de la aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*) y gen de aspartasa (*aspa*) o similares.

Además, la célula huésped puede ser una cepa mutante resistente a un análogo de L-lisina. La cepa mutante puede obtenerse por mutación del microorganismo de *Corynebacterium* sp. El análogo de L-lisina inhibe el crecimiento del microorganismo Corineforme, pero esta inhibición está desensibilizada total o parcialmente cuando coexiste la L-lisina en un medio. Ejemplos de análogos de L-lisina pueden ser, pero no se limitan particularmente a, preferentemente oxa-L-lisina, hidroxamato de L-lisina, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC),  $\gamma$ -metil L-lisina,  $\alpha$ -clorocapro lactamo o similares.

Entre tanto, en la presente divulgación, se pueden controlar adicionalmente las actividades de enzimas conocidas implicadas en la biosíntesis de L-lisina con el fin de mejorar la producción de L-lisina. Específicamente, en la presente invención, los genes *asd*, *dapB*, y *ddh*, que codifican cada uno las enzimas aspartato semialdehído deshidrogenasa, dihidrodipicolinato reductasa y diaminopimelato deshidrogenasa, se sobre-expresan para controlar adicionalmente las actividades de las enzimas, mejorando de esta manera la producción de L-lisina.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, los presentes autores seleccionaron el ECA0097(*xylA*) (SEQ ID NO: 1) y el ECA0096(*xylB*) (SEQ ID NO: 2) derivados de *Erwinia carotovora* (SCR11043) como genes adecuados que codifican XylA y XylB para introducirlos en el microorganismo de *Corynebacterium* sp. (Ejemplo 1), y clonaron los genes seleccionados que codifican XylA y XylB de manera que se construye un vector de expresión pECCG122-pcj7-*xylA-xylB* (de aquí en adelante, pECCG122-pcj7-*xylAB*(Er)) que expresa *xylA* y *xylB* (de aquí en adelante, *xylAB*(Er)) al mismo tiempo. El vector de expresión se introdujo en el *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (este microorganismo se desvela como KFCC10881, y se re-depositó en una Autoridad depositaria

bajo el tratado de Budapest con el N° de acceso KCCM11016P, Patentes Coreanas N° 10-0159812 y 10-0397322) para preparar un transformante que sobre-exprese *xylAB(Er)*. Se confirmó que el transformante preparado crecía utilizando xilosa como fuente de carbono (FIG. 2), y que producía L-lisina utilizando tanto glucosa como xilosa, o utilizando glucosa y xilosa al mismo tiempo (Tabla 1). Además, con el fin de expresar *xylAB(Er)* en el cromosoma, se construyó un vector recombinante para la inserción cromosómica, pDZTn-pcj7-*xylAB(Er)*, y se transformaron en KCCM11016P, y mediante un segundo cruzamiento, un transformante KCCM11016P-pcj7-*xylAB(Er)* que tiene el *xylAB(Er)* unido operativamente al promotor *pcj7* en el transposón en el cromosoma. También se confirmó que el transformante crece utilizando xilosa como una fuente de carbono (FIG. 3), y produce L-lisina utilizando glucosa o xilosa, o utilizando glucosa y xilosa al mismo tiempo (Tabla 1). Además, con el fin de expresar *xylAB* (de aquí en adelante, *xylAB(Ec)*) y la introducción del *xylAB(Er)* derivado de *Erwinia carotovora* de la presente divulgación, se preparó una cepa (KCCM11016P-pcj7-*xylAB(Ec)*) introduciendo *xylAB(Ec)* en KCCM11016P, y su característica de capacidad de utilizar xilosa y de producción de L-lisina se compararon con la de KCCM11016P-pcj7-*xylAB(Er)*. Como resultado, se descubrió que la tasa de consumo de xilosa de KCCM11016P-pcj7-*xylAB(Er)* aumentó sorprendentemente en comparación con el de KCCM11016P-pcj7-*xylAB(Ec)*, indicando una mejora de la producción fermentadora de L-lisina (Tabla 3). Además con el fin de confirmar si distintos microorganismos de *Corynebacterium* sp. muestran los mismos resultados, se introdujo el pDZTn-pcj7-*xylAB(Er)* en una cepa productora de L-lisina KCCM10770P para preparar un transformante KCCM10770P-pcj7-*xylAB(Er)*, y se confirmó que el transformante era capaz de producir L-lisina utilizando glucosa o xilosa y utilizando glucosa y xilosa al mismo tiempo (Tabla 4). También se introdujo pDZTn-pcj7-*xylAB(Er)* en otra cepa productora de L-lisina KFCC10750 (este microorganismo fue desvelado como KFCC10750 y se re-depositó en una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest con el N° de acceso KCGM11347P, Patente Coreana N° 10-0073610) para preparar un transformante KFCC10750-pcj7-*xylAB(Er)*. También se confirmó que este transformante es capaz de producir L-lisina utilizando glucosa o xilosa, o utilizando glucosa y xilosa al mismo tiempo (Tabla 5). Además, también se introdujo el pDZTn-pcj7-*xylAB(Er)* en la otra cepa productora de L-lisina CJ3P para preparar un transformante CJ3P-pcj7-*xylAB(Er)*. También se confirmó que este transformante era capaz de producir L-lisina utilizando glucosa o xilosa, o utilizando glucosa y xilosa al mismo tiempo.

En consecuencia, los presentes autores diseñaron el transformante como "CA01-2195", que crece utilizando xilosa en un medio y también produce L-lisina utilizando xilosa y glucosa en el medio, y que se depositó bajo el Tratado de Budapest en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM, localizado en Hongjae 1-Dong, Seodaemun-Gu, Seúl, Corea) el 29 de diciembre de 2011 con el N° de acceso KCCM11242P. Es decir, este depósito se reconoce por una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir L-lisina, que incluye las etapas de (i) cultivar el microorganismo de *Corynebacterium* sp. modificado que es capaz de producir L-lisina utilizando xilosa en un medio de cultivo que contiene xilosa como fuente de carbono, de manera que se obtiene un caldo de cultivo; y (ii) recuperar la L-lisina del caldo de cultivo.

Como se utiliza en el presente documento, el término "cultivar" significa que un microorganismo se cultiva en condiciones ambientales controladas artificialmente. En la presente divulgación, el procedimiento para cultivar el microorganismo de *Corynebacterium* sp. se puede llevar a cabo utilizando un procedimiento ampliamente conocido en la técnica. Específicamente, los ejemplos de procedimiento de cultivo incluyen el procedimiento discontinuo, semi-continuo o el proceso semi-continuo repetido de una manera continua, pero no se limita a los mismos.

El medio utilizado para el cultivo tiene que cumplir los requerimientos de un microorganismo específico de una manera apropiada mientras se controla la temperatura, pH, etc. en condiciones aeróbicas en un medio típico que contiene una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, aminoácidos, vitaminas, etc. apropiadas. El medio de cultivo para la cepa de *Corynebacterium* se desvela (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981). Las fuentes de carbono posibles pueden incluir azúcares y carbohidratos tales como la sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, y celulosa, además de una mezcla de glucosa y xilosa como fuente de carbono principal, aceites y grasas tales como al aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino, y grasa de coco, ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico, y ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como el ácido acético. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como mezclas. Las fuentes de nitrógeno posibles pueden incluir fuentes de nitrógeno inorgánico tales como amonio, sulfato amónico, cloruro amónico, acetato amónico, fosfato amónico, carbonato amónico, y nitrato amónico; aminoácidos tales como ácido glutámico, metionina, y glutamina; y fuentes de nitrógeno orgánico tal como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta, agua de macerado de maíz, hidrolizados de caseína, pescado o productos de descomposición del mismo, y aglutinado de soja desgrasada o productos de descomposición del mismo. Estas fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o en combinación. El medio puede incluir fosfato dihidrógeno potásico, fosfato hidrógeno dipotásico o las sales que contienen sodio correspondientes como fuentes de fósforo. Las fuentes de fósforo posibles pueden incluir fosfato dihidrógeno potásico, fosfato hidrógeno dipotásico o las sales que contienen sodio correspondientes. Además, se pueden utilizar compuestos inorgánicos tales como cloruro sódico, cloruro cálcico, cloruro de hierro, sulfato magnésico, sulfato de hierro, sulfato de manganeso y carbonato cálcico. Además de las sustancias anteriores, se pueden incluir sustancias esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas.

También se pueden añadir precursores apropiados al medio de cultivo. Las sustancias mencionadas anteriormente se pueden añadir adecuadamente al medio de cultivo en modo discontinuo, semi-continuo o continuo durante el cultivo, pero no se limita particularmente a estos. El pH del cultivo se puede ajustar añadiendo adecuadamente compuestos básicos tales como el hidróxido sódico, hidróxido potásico, y amoníaco, o compuestos ácidos tales como el ácido fosfórico y ácido sulfúrico.

Se puede utilizar un agente anti-espumante tal como ésteres poliglicólicos de ácidos grasos para suprimir el desarrollo de espuma. Con el fin de mantener las condiciones aeróbicas, se puede introducir oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en el caldo de cultivo. La temperatura del caldo de cultivo normalmente es de 27 °C a 37 °C, específicamente de 30 °C a 35 °C. El cultivo se puede continuar hasta que la producción de L-lisina alcance el nivel deseado. Este objetivo puede conseguirse normalmente en 10 a 100 horas. La L-lisina se puede liberar en el medio de cultivo o incluirse en las células.

Además, la etapa de la recuperación de L-lisina del caldo de cultivo se puede llevar a cabo por un procedimiento conocido en la técnica. Específicamente, el procedimiento conocido para recuperar L-lisina es, pero no se limita particularmente a, específicamente, centrifugación, filtración, extracción, pulverización, secado, evaporación, precipitación, cristalización, electroforesis, solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación en sulfato amónico), cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrófoba, y exclusión por tamaño) o similares.

De aquí en adelante, las constituciones y efectos de la presente divulgación se describirán con más detalle en referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solamente con fines ilustrativos, y el ámbito de la divulgación no tiene la intención de limitarse por estos Ejemplos.

### 20 Ejemplo 1: Selección del gen ajeno

Se seleccionaron como genes ajenos los de *Erwinia carotovora* (ECA0097(*xylA*) derivada de SCRI1043) (aminoácidos SEQ ID NO: 1, nucleótidos SEQ ID NO: 3) y ECA0096(*xylB*) (aminoácidos: SEQ ID NO: 2, nucleótidos: SEQ ID NO: 4) para preparar un microorganismo de *Corynebacterium* sp. provisto de capacidad de utilizar xilosa.

### Ejemplo 2: Construcción de un vector que exprese *xylAB* derivado de *Erwinia carotovora*

Los genes codificantes de XylA y XylB derivados de *Erwinia carotovora* seleccionados en el Ejemplo 1 se localizan muy cerca entre ellos. La información (Nº de acceso BX950851 acerca de *xylA* y *xylB*(Er) y la secuencia de nucleótidos circundante se obtuvo en US NIH GenBank, y basándose en la secuencia de nucleótidos obtenida, se sintetizaron los cebadores para la amplificación de *xylAB*(Er).

SEQ ID NO: 5: 5'-ACACATATGCAAGCCTATTTTGAACAGATC-3'

SEQ ID NO: 6: 5'-AGAACTAGTGCCTTTTGGTGGTGTAAAGT-3'

Con el fin de obtener el fragmento *xylAB*(Er), se llevó a cabo una PCR utilizando el ADN cromosómico de la cepa SCRI1043 de *Erwinia carotovora* como matriz y un par de cebadores (SEQ ID NO: 5 y 6). Se utilizó la ADN polimerasa PfuUltra™ de alta fidelidad (Stratagene) como la polimerasa, y se llevó a cabo la PCR con una desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido por repetición del ciclo 30 veces que incluye desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 3 minutos, y después la polimerización a 72 °C durante 7 minutos. Como resultado, se obtuvo un fragmento genético (SEQ ID NO: 18) de 3122 pb que contenía el *xylAB*(Er) (SEQ ID NO: 17) de 2844 pb. Con el fin de obtener el promotor *pcj7* derivado de *Corynebacterium ammoniagenes* (KR0620092), se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN genómico de *Corynebacterium ammoniagenes* CJHB100 (KR0620092) como matriz y un par de cebadores (SEQ ID NO: 15 y 16). Se utilizó la ADN polimerasa PfuUltra™ de alta-fidelidad (Stratagene) como la polimerasa, y se llevó a cabo la PCR con desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido por la repetición del ciclo 30 veces que incluye desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto, y después polimerización a 72 °C durante 7 minutos. Como resultado, se obtuvo un polinucleótido de 318 pb (SEQ ID NO: 14).

SEQ ID NO: 15: 5'-AATCTAGAAACATCCCAGCGCTA-3'

SEQ ID NO: 16: 5'-AAACTAGTC'ATATGTGTTTCCTTCGTTG-3'

El *pcj7* se clonó en el vector lanzadera *E. coli-Corynebacterium* pECCG122 utilizando enzimas de restricción, XbaI y SpeI, y después se clonó el fragmento *xylAB*(Er) se clonó utilizando NdeI y SpeI, obteniendo de esta manera el vector pECCG122-*pcj7-xylAB*(Er) (FIG.1). La FIG. 1 es un mapa de escisión del vector de expresión pECCG122-*pcj7-xylAB*(Er) de la presente divulgación.

### Ejemplo 3: Desarrollo de la cepa productora de L-lisina a la que se ha introducido *xylAB* derivado de *Erwinia carotovora* y examen de la capacidad para utilizar xilosa

Cada vector de expresión pECCG122-*pcj7-xylAB*(Er) que se obtiene en el Ejemplo 2 se introdujo en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (Patentes Coreanas Nº 10-0159812 y 10-0397322) para preparar un transformante que exprese *xylAB*(Er), el *Corynebacterium glutamicum* CA01-2195.

Con el fin de comparar la capacidad de utilizar xilosa entre KCCM11016P y CA01-2195, se cultivaron las cepas en medio de siembra que contenía glucosa o xilosa como fuente de carbono y se compararon sus características de crecimiento. También se cultivaron en un medio de producción que contenía glucosa o xilosa como fuente de carbono y se compararon sus características de producción de L-lisina.

5 Primero, con el fin de comparar las características de crecimiento, se inocularon las cepas en 25 ml de medio de siembra [fuente de carbono (glucosa o xilosa) 10 g/l, peptona 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l, urea 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, biotina 100 mg/l, tiamina-HCl 1 mg/l, pH 7,0], respectivamente. SE midió la absorbancia (DO600) del caldo de cultivo mientras se cultivaban las cepas a 30 °C durante 32 horas, y se compararon entre ellas (FIG. 2). La FIG. 2 es un gráfico que muestra las características de crecimiento de KCCM11016P y CA01-2195. de acuerdo con la fuente de carbono contenida en el medio, en la que (♦) indica la KCCM11016P cultivada en el medio que contenía glucosa, (■) indica la KCCM11016P cultivada en el medio que contenía xilosa, (▲) indica la CA01-2195 cultivada en el medio que contenía glucosa, y (X) indica la CA01-2195 cultivada en el medio que contenía xilosa.

15 Como se muestra en la FIG. 2, no había diferencia en las características de crecimiento entre KCCM11016P y CA01-2195 en el medio de siembra que contenía glucosa como fuente de carbono. Sin embargo en el medio que contenía xilosa como fuente de carbono, la CA01-2195 crecía a cierto nivel mientras que la KCCM11016P apenas crecía. Por lo tanto se puede ver que la CA01-2195 es capaz de crecer utilizando la xilosa contenida en el medio como única fuente de carbono.

20 A continuación, para comparar las características de producción de L-lisina entre KCCM11016P y CA01-2195, se inoculó 1 ml de caldo de cultivo en 24 ml de medio de producción [fuente de carbono, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 g/l, proteína de soja 2,5 g/l, solidos de macerado de maíz 5 g/l, urea 3 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/l, biotina 100 mg/l, tiamina-HCl 1 mg/l, CaCO<sub>3</sub> 30 g/l, pH 7,0], y se cultivaron a 35 °C y 200 rpm durante 72 horas. En este momento, se determinaron para utilizarse como fuentes de carbono 100 g/l de glucosa, 50 g/l de glucosa + 50 g/l de xilosa, y 70 g/l de glucosa + 30 g/l de xilosa. A continuación, se midieron la concentración de L-lisina, la concentración residual de xilosa y la concentración de glucosa residual en cada caldo de cultivo y se compararon.

[Tabla 1]

Cepa	Glucosa 100 g/l			Glucosa 50 g/l + Xilosa 50 g/l			Glucosa 70 g/l + Xilosa 30 g/l		
	L-lisina	R.X	R.G	L-lisina	R.X	R.G	L-lisina	R.X	R.G
KCCM11016P	42	-	0	21	50	0	29	30	0
CA01-2195	42	-	0	40	0	0	41	0	0

R.X: xilosa residual (concentración de xilosa residual después de terminar la reacción) (unidades: g/l) R.G: glucosa residual (concentración de glucosa residual después de terminar la reacción)

30 Como se muestra en la Tabla 1, cuando se utilizaba el medio que no contenía xilosa (glucosa 100 g/l), la concentración de L-lisina producida en la cepa parental era equivalente a la de CA01-2195. Sin embargo, cuando se utilizaba el medio que contenía xilosa (glucosa 50 g/l + xilosa 50 g/l, y glucosa 70 g/l + xilosa 30 g/l), la CA01-2195 producía L-lisina consumiendo tanto glucosa como xilosa, mientras que la cepa parental producía L-lisina no consumiendo xilosa sino solo glucosa.

Este resultado indica que el microorganismo de *Corynebacterium* sp. que no tiene capacidad de utilizar la xilosa es capaz de consumir xilosa introduciendo el *xyIAB* derivado de *Erwinia carotovora*.

35 **Ejemplo 4: Construcción de un vector recombinante para la inserción cromosómica de *xyIAB* derivado de *Erwinia carotovora* (pDZTn-pcj7-*xyIAB*(Er)) y el vector recombinante para la inserción cromosómica de *xyIAB* derivado de *E. coli* (pDZTn-pcj7-*xyIAB*(Ec))**

40 Para expresar el *xyIAB*(Er) en el cromosoma, se construyó un vector recombinante pDZTn-pcj7-*xyIAB*(Er) para la inserción cromosómica. Para obtener el fragmento pcj7-*xyIAB*(Er), se llevó a cabo una PCR utilizando el pECCG122-pcj7-*xyIAB*(Er) obtenido en el Ejemplo como matriz y un par de cebadores (SEQ ID NO: 7 y 8). Se utilizó la ADN polimerasa PfuUltra™ de alta-fidelidad (Stratagene) como polimerasa, y se llevó a cabo la PCR con desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido por la repetición del ciclo 30 veces que incluía desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 3 minutos, y después polimerización a 72 °C durante 7 minutos. Como resultado, se obtuvo un fragmento genético de 3440 pb (SEQ ID NO: 9). En consecuencia el pcj7-*xyIAB*(Er) de 3440 pb se clonó en el vector pDZTn (Patente Coreana N° 10-1126041) tratado con la enzima de restricción Spel utilizando un kit In-Fusión BD, obteniendo de esta manera un vector recombinante pDZTn-pcj7-*xyIAB*(Er).

SEQ ID NO: 7: 5'-GAGTTCCTCGAGACTAGTAGAAACATCCCAGCGCTA-3'  
 SEQ ID NO: 8: 5'-GATGTCGGGCCCACTAGGCCTTTTTGGTGGTGTTTA-3'

A continuación, para expresar el *xyIAB* derivado de *E. coli* en el cromosoma, se construyó un vector recombinante pDZTn-pcj7-*xyIAB*(Ec) para la inserción cromosómica. Para obtener el promotor pcj7, se llevó a cabo una PCR utilizando el fragmento pcj7 obtenido en el Ejemplo 2 como matriz y un par de cebadores (SEQ ID NO: 7 y 10). Se utilizó la ADN polimerasa PfuUltra™ de alta-fidelidad (Stratagene) como polimerasa, y se llevó a cabo la PCR con desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido por la repetición del ciclo 30 veces que incluía desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto, y después polimerización a 72 °C durante 7 minutos. Como resultado, se obtuvo un fragmento genético de 318 pb. Para obtener el fragmento *xyIAB*(Ec), se llevó a cabo una PCR utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* K12 como matriz y un par de cebadores (SEQ ID NO: 11 y 12). Se utilizó la ADN polimerasa PfuUltra™ de alta-fidelidad (Stratagene) como polimerasa, y se llevó a cabo la PCR con desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido por la repetición del ciclo 30 veces que incluía desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 3 minutos, y después polimerización a 72 °C durante 7 minutos. Como resultado, se obtuvo el fragmento *xyIAB*(Ec) de 3145 pb (SEQ ID NO: 13). En consecuencia se clonaron los productos de PCR de la región pcj7 de 318 pb y el *xyIAB*(Ec) de 3145 pb en el vector pDZTn tratado con la enzima de restricción SpeI utilizando un kit In-Fusión BD, obteniendo de esta manera un vector recombinante pDZTn-pcj7-*xyIAB*(Ec) final.

SEQ ID NO: 10: 5'-TCAAAATAGGCTTGCATGAGTGTTCCTTTTCGTTG-3'  
 SEQ ID NO: 11: 5'-CAAC:GAAAGGAAACACATGC'AAGCCTATTTTGAC-3'  
 SEQ ID NO: 12: 5'-GATGTCGGGGGCACTAGTGGTGTCCATTAACACGCCA-3'

**Ejemplo 5: Desarrollo de la cepa productora de L-lisina en la que se ha insertado el *xyIAB* derivado de *Erwinia* y examen de la capacidad de utilizar xilosa**

El vector pDZTn-pcj7-*xyIAB*(Er) preparado se transformó en KCCM11016P, y mediante un segundo cruzamiento, se obtuvo una cepa KCCM11016P-pcj7-*xyIAB*(Er) que tenía el *xyIAB*(Er) con sustitución de una copia del promotor pcj7 en el transposón del cromosoma.

Para comparar la capacidad de utilización de xilosa entre KCCM11016P-pcj7-*xyIAB*(Er) y KCCM11016P, se cultivaron en un medio de siembra que contenía glucosa y xilosa como fuente de carbono, y se compararon sus características de crecimiento, y se cultivaron en un medio de producción que contenía glucosa o xilosa como fuente de carbono y se compararon sus características de producción de L-lisina, de la misma manera que en el Ejemplo 3.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra las características de crecimiento de las cepas de acuerdo con la fuente de carbono contenida en el medio, en el que (♦) indica la KCCM11016P cultivada en el medio que contenía glucosa, (■) indica la KCCM11016P cultivada en el medio que contenía xilosa, (▲) indica la KCCM11016P-pcj7-*xyIAB*(Er) cultivada en el medio que contenía glucosa, y (X) indica la KCCM11016P-pcj7-*xyIAB*(Er) cultivada en el medio que contenía xilosa.

No había diferencias en las características de crecimiento entre la KCCM11016P-pcj7-*xyIAB*(Er) y KCCM11016P en el medio de siembra que contenía glucosa como fuente de carbono. Sin embargo, en el medio de siembra que contenía xilosa como fuente de carbono, la KCCM11016P-pcj7-*xyIAB*(Er) creía hasta un cierto nivel mientras que la KCCM11016P apenas crecía. Por lo tanto, se puede ver que cuando se inserta el *xyIAB*(Er) en el cromosoma, la cepa es capaz de crecer utilizando la xilosa contenida en el medio.

A continuación se examinaron las características de producción de L-lisina de KCCM11016P-pcj7-*xyIAB*(Er) y KCCM11016P y se compararon entre ellas (Tabla 2).

[Tabla 2]

Cepa	Glucosa 100 g/l			Glucosa 50 g/l + Xilosa 50 g/l			Glucosa 70 g/l + Xilosa 30 g/l		
	L-lisina	R.X	R.G	L-lisina	R.X	R.G	L-lisina	R.X	R.G
KCCM11016P	43.0	-	0	22,6	50	0	29,2	30	0
	42.5	-	0	21,9	0	0	29,6	0	0
KCCM11016P-pcj7- <i>xyIAB</i> (Er)	42.8	-	0	42,1	0	0	42,6	0	0
	43.1	-	0	42,0	0	0	42,2	0	0

R.X: xilosa residual (concentración de xilosa residual después de terminar la reacción) (unidades: g/l) R.G: glucosa residual (concentración de glucosa residual después de terminar la reacción)

Como se muestra en la Tabla 2, cuando se utilizaba el medio que no contenía xilosa (glucosa 100 g/l), la concentración de L-lisina producida en KCCM11016P era equivalente a la de la KCCM11016P-pcj7-*xyIAB*(Er). Sin embargo, cuando se utilizaba el medio que contenía xilosa (glucosa 50 g/l + xilosa 50 g/l, y glucosa 70 g/l + xilosa 30

g/l), la cepa KCCM11016P producía L-lisina consumiendo solo glucosa, mientras que la KCCM11016P-pcj7-xylAB(Er) producía L-lisina consumiendo tanto glucosa como xilosa.

**Ejemplo 6: Preparación de la cepa productora de L-lisina a la que se ha insertado el xylAB derivado de E. coli y comparación de su capacidad para utilizar la xilosa con la cepa KCCM11016P-pcj7-xylAB(Ec)**

5 Para comparar los efectos de mejora de la capacidad de utilización de xilosa entre la introducción de xylAB derivado de E. coli y la introducción de xylAB derivado de Erwinia carotovora de la presente divulgación, se preparó una cepa por la introducción de xylAB(Ec) en KCCM11016P, y se compararon las características de capacidad de utilización de xilosa y la producción de L-lisina con las de la KCCM11016P-pcj7-xylAB(Er) preparada.

10 Para preparar una cepa con el xylAB(Ec) introducido, el vector pDZTn-pcj7-xylAB(Ec) preparado en el Ejemplo 4 se transformó en la KCCM11016P, y mediante un segundo cruzamiento, se obtuvo una cepa KCCM11016P-pcj7-xylAB(Ec) que tenía un xylAB(Ec) unido operativamente al promotor pcj7 en el transposón del cromosoma.

15 De la misma manera que en el Ejemplo 3, para comparar la capacidad de utilización de xilosa entre KCCM11016P-pcj7-xylAB(Er) y KCCM11016P-pcj7-xylAB(Ec), se cultivaron en el medio de producción que contenía 50 g/l de glucosa + 50 g/l de xilosa como fuente de carbono, y se compararon las características de producción de L-lisina, y para examinar la capacidad de utilización de xilosa, se midió la concentración de xilosa residual en el caldo de cultivo a las 15 horas (Tabla 3).

[Tabla 3]

	R.X(g/l)		Lisina
	45 h	72 h	72 h
KCCM11016P-pcj7-xylAB(Er)	8,0	0	42,8
	7,2	0	42,2
KCCM11016P-pcj7-xylAB(Ec)	11,2	0	42,7
	12,1	0	42,4

R.X: xilosa residual (concentración de xilosa residual después de terminar la reacción) (unidades: g/l)

20 Como se muestra en la Tabla 3, las dos cepas demostraban una productividad de L-lisina similar. La tasa de consumo de xilosa de KCCM11016P-pcj7-xylAB(Er) era más rápida que la de KCCM11016P-pcj7-xylAB(Ec), indicando una mejora en la productividad de la fermentación. Es decir, este resultado indica que la introducción de xylAB(Er) derivado de Erwinia carotovora de la presente divulgación muestra un efecto más excelente de mejora de la productividad de fermentación de L-lisina que la introducción del previo xylAB(Ec) derivado de E. coli.

**Ejemplo 7: Desarrollo de la cepa derivada de KCCM10770P en la que se ha insertado xylAB derivado de Erwinia carotovora y examen de la capacidad de utilización de xilosa.**

25 Para examinar si la introducción de xylAB(Er) presenta el mismo efecto en otras cepas productoras de L-lisina distintas de KCCM11016P, se introdujo el pDZTn-pcj7-xylAB(Er) en una cepa KCCM 10770P productora de L-lisina (Patente Coreana N° 10-0924065) que se depositó en una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest. Después de la introducción por un procedimiento de pulso eléctrico, se obtuvo una cepa que tenía el xylAB(Er) con la sustitución de una copia del promotor pcj7 dentro del transposón del cromosoma mediante un  
30 segundo cruzamiento, y la cepa se llamó Corynebacterium glutamicum KCCM10770P-pcj7-xylAB(Er).

Se midieron la capacidad de utilización de la xilosa y la productividad de L-lisina del Corynebacterium glutamicum KCCM 10770P y Corynebacterium glutamicum KCCM10770P-pcj7-xylAB(Er) de la presente invención de la misma manera que en el Ejemplo 3 (Tabla 4).

[Tabla 4]

Cepa	R.G	R.X	L-lisina
KCCM10770P	0	50	23,8
	0	50	24,4
KCCM10770P-pcj7-xylAB(Er)	0	0	47,6
	0	0	47,5

R.X: xilosa residual (concentración de xilosa residual después de terminar la reacción) (unidades: g/l) R.G: glucosa residual (concentración de glucosa residual después de terminar la reacción)

35 Como se muestra en la Tabla 4, cuando se introducía el xylAB(Er) en la cepa KCCM 10770P productora de L-lisina, consumía completamente la xilosa, a pesar de que la cepa parental no pueda utilizar la xilosa, y su productividad de

L-lisina también aumentaba.

Este resultado apoya que cuando el *xylAB* derivado de *Erwinia carotovora* se introduce en distintos microorganismos de *Corynebacterium* sp. así como en microorganismos de *Corynebacterium* sp. especificado por un cierto Número de Acceso, consumen completamente la xilosa como fuente de carbono, produciendo eficazmente de esta manera aminoácidos tales como la L-lisina.

5

**Ejemplo 8: Desarrollo de la cepa derivada de KFCC10750 en la que se inserta el *xylAB* derivado de *Erwinia carotovora* y examen de la capacidad de utilización de xilosa**

Para examinar si la introducción de *xylAB*(Er) presenta el mismo efecto en otras cepas productoras de L-lisina diferentes de KCCM11016P, se introdujo el pDZTn-pcj7-*xylAB*(Er) en una cepa KFCC10750 productora de L-lisina (Patente Coreana N° 10-0073610). Después de la introducción con un procedimiento de pulso eléctrico, se obtuvo una cepa que tenía el *xylAB*(Er) con una sustitución de una copia del promotor pcj7 dentro del transposón del cromosoma mediante un segundo cruzamiento, y la cepa se denominó *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750-pcj7-*xylAB*(Er).

10

La capacidad de utilización de xilosa y productividad de L-lisina de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750 y *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750-pcj7-*xylAB*(Er) de la presente divulgación se midieron de la misma manera que en el Ejemplo 3 (Tabla 5).

15

[Tabla 5]

Cepa	R.G	R.X	L-lisina
KFCC10750	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>19,7</b>
	0	50	18,8
KFCC 10750-pcj7- <i>xylAB</i> (Er)	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>38,3</b>
	0	0	38,6

R.X: xilosa residual (concentración de xilosa residual después de terminar la reacción) (unidades: g/l) R.G: glucosa residual (concentración de glucosa residual después de terminar la reacción)

Como se muestra en la Tabla 5, cuando se introdujo el *xylAB*(Er) en la cepa KFCC10750 productora e L-lisina, consumía completamente la xilosa, a diferencia de la cepa parental que no podía utilizar la xilosa, y su productividad de L-lisina también estaba aumentada.

20

Este resultado apoya que cuando un *xylAB* derivado de *Erwinia carotovora* se introduce en distintos microorganismos de *Corynebacterium* sp. así como microorganismos de *Corynebacterium* sp. especificados por un cierto Número de Acceso, consumían completamente la xilosa como fuente de carbono, produciendo eficazmente de esta manera aminoácidos tales como la L-lisina.

25

**Ejemplo 9: Desarrollo de la cepa derivada de CJ3P en la que se ha insertado *xylAB* derivado de *Erwinia carotovora* y examen de la capacidad de utilización de xilosa**

Para examinar si la introducción de *xylAB*(Er) presentaba el mismo efecto en otras cepas productoras de L-lisina distintas de KCCM11016P, se introdujo el pDZTn-pcj7-*xylAB*(Er) en una cepa CJ3P productora de lisina. La cepa CJ3P es una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que tiene la capacidad para producir L-lisina por la introducción de las mutaciones P458S, V59A, y T311I en 3 tipos de genes *pyc*, *hom*, y *lysC* de la cepa de tipo silvestre, basándose en la técnica expuesta por Binder y col. (Genome Biology 2102, 13:R40). Después de la introducción por un procedimiento de pulso eléctrico, se obtuvo una cepa que tenía *xylAB*(Er) con la sustitución de una copia del promotor pcj7 en el transposón sobre el cromosoma mediante un segundo cruzamiento, y la cepa se llamó *Corynebacterium glutamicum* CJ3P-pcj7-*xylAB*(Er).

30

La capacidad de utilización de xilosa y productividad de L-lisina de *Corynebacterium glutamicum* CJ3P y *Corynebacterium glutamicum* CJ3P-pcj7-*xylAB*(Er) de la presente divulgación se midieron de la misma manera que en el Ejemplo 3 (Tabla 6).

35

[Tabla 6]

Cepa	R.G	R.X	L-lisina
CJ3P	<b>0</b>	<b>50</b>	<b>4,0</b>
	0	50	4,5

(continuación)

Cepa	R.G	R.X	L-lisina
CJ3P-pcj7-xyIAB(Er)	0	0	8,5
	0	0	9,0

R.X: xilosa residual (concentración de xilosa residual después de terminar la reacción) (unidades: g/l) R.G: glucosa residual (concentración de glucosa residual después de terminar la reacción)

Como se muestra en la Tabla 6, cuando se introducía el *xyIAB(Er)* en la cepa CJ3P productora de L-lisina, consumía completamente la xilosa, a diferencia de la cepa parental que no podía utilizar la xilosa, y su producción de L-lisina también aumentaba.

5 Este resultado apoya que cuando el *xyIAB* de *Erwinia carotovora* se introduce en distintos microorganismos de *Corynebacterium* sp. así como los microorganismos de *Corynebacterium* sp. especificados por un cierto Número de Acceso, consumen completa mente la xilosa como fuente de carbono, produciendo eficazmente de esta manera aminoácidos tales como la L-lisina.

10 Por lo tanto, el microorganismo de *Corynebacterium* sp. que expresan *xyIAB(Er)* es capaz de crecer utilizando xilosa en un medio, y también es capaz de producir L-lisina utilizando xilosa y glucosa en un medio.

**Efecto de la divulgación**

15 Cuando se utiliza el microorganismo de *Corynebacterium* sp. de la presente divulgación que es capaz de producir L-lisina utilizando xilosa, la L-lisina se puede producir utilizando xilosa como el segundo carbohidrato lignocelulósico más abundante en la naturaleza. Por lo tanto, el microorganismo se puede utilizar ampliamente para la producción eficaz y económica de L-lisina.

<110> CJ CheilJedang Corporation

20 <120> *Corynebacterium* sp. que tiene disponibilidad de xilosa y un procedimiento para preparar L-lisina empleando el mismo

<130> OPA12193/PCT

<150> KR 10-2012-0003133

25 <151> 10-01-2012

<160> 18

<170> KopatentIn 2.0

30 <210> 1

<211> 439

<212> PRT

<213> *Erwinia carotovora*

35 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(439)

<223> XylA

40 <400> 1

ES 2 654 809 T3

Met Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Ile Glu Lys Val Arg Tyr Glu Gly Ser  
 1 5 10 15

Gln Ser Ser Asn Pro Phe Ala Phe Arg His Tyr Asn Pro Asp Gln Glu  
 20 25 30

Ile Leu Gly Lys Arg Met Ala Asp His Leu Arg Phe Ala Val Ala Tyr  
 35 40 45

Trp His Thr Phe Cys Trp Asn Gly Ser Asp Met Phe Gly Val Gly Ser  
 50 55 60

Phe Ala Arg Pro Trp Gln Gln Ser Gly Asp Ala Leu Glu Leu Ala Lys  
 65 70 75 80

Arg Lys Ala Asp Ile Ala Phe Glu Phe Phe Gln Lys Leu Ser Val Pro  
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Phe His Asp Val Asp Val Ala Pro Glu Gly Asn Ser Leu  
 100 105 110

Lys Glu Tyr Leu His Asn Ile Ala Val Ile Thr Asp Val Leu Ala Glu  
 115 120 125

Lys Gln Gln Asp Ser Gly Val Lys Leu Leu Trp Gly Thr Ala Asn Cys  
 130 135 140

Phe Thr Asn Pro Arg Tyr Gly Ala Gly Ala Ala Thr Asn Pro Asp Pro  
 145 150 155 160

Asp Val Phe Ala Trp Ala Ala Thr Gln Val Phe Thr Ala Met Asn Ala  
 165 170 175

Thr Lys Thr Leu Gly Gly Glu Asn Tyr Val Leu Trp Gly Gly Arg Glu  
 180 185 190

Gly Tyr Glu Thr Leu Leu Asn Thr Asp Leu Arg Gln Glu Arg Glu Gln

ES 2 654 809 T3

		195				200						205				
	Ile	Gly	Arg	Phe	Met	Gln	Met	Val	Val	Glu	His	Lys	His	Lys	Ile	Gly
		210					215					220				
	Phe	Gln	Gly	Thr	Leu	Leu	Ile	Glu	Pro	Lys	Pro	Gln	Glu	Pro	Thr	Lys
	225					230					235					240
	His	Gln	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Val	Ala	Thr	Val	Tyr	Gly	Phe	Leu	Lys	Gln
					245					250					255	
	Phe	Gly	Leu	Glu	Lys	Glu	Ile	Lys	Val	Asn	Val	Glu	Ala	Asn	His	Ala
				260					265					270		
	Thr	Leu	Ala	Gly	His	Ser	Phe	His	His	Glu	Ile	Ala	Thr	Ala	Val	Ala
			275					280					285			
	Leu	Gly	Val	Phe	Gly	Ser	Val	Asp	Ala	Asn	Arg	Gly	Asp	Pro	Gln	Leu
	290						295					300				
	Gly	Trp	Asp	Thr	Asp	Gln	Phe	Pro	Asn	Ser	Val	Glu	Glu	Asn	Thr	Leu
	305					310					315					320
	Ile	Met	Tyr	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Gly	Gly	Phe	Thr	Thr	Gly	Gly	Leu
					325					330					335	
	Asn	Phe	Asp	Ala	Lys	Val	Arg	Arg	Gln	Ser	Thr	Asp	Arg	Tyr	Asp	Leu
				340					345					350		
	Phe	His	Ala	His	Ile	Gly	Ala	Met	Asp	Thr	Met	Ala	Leu	Ala	Leu	Lys
			355					360					365			
	Ala	Ala	Ala	Arg	Met	Ile	Glu	Asp	Asp	Lys	Leu	Asn	Gln	Leu	Val	Ala
							375					380				
	Lys	Arg	Tyr	Ala	Gly	Trp	Asn	Gly	Glu	Leu	Gly	Gln	Gln	Ile	Leu	Gln
	385					390					395					400
	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Glu	Ser	Leu	Ala	Gln	Tyr	Ala	Glu	Ser	His	Gln
					405					410					415	
	Leu	Ala	Pro	Gln	His	Gln	Ser	Gly	Gln	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	Asn	Leu
				420					425					430		
	Val	Asn	Arg	His	Leu	Phe	Gly									
																435

<210> 2  
 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> *Erwinia carotovora*

5

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(485)  
 <223> XylB

10

<400> 2

	Met	Tyr	Ile	Gly	Ile	Asp	Leu	Gly	Thr	Ser	Gly	Val	Lys	Ala	Ile	Leu
	1				5					10					15	

15

ES 2 654 809 T3

Leu Asp Glu Thr Gly Glu Val Ile Ala Ser His Ser Ala Ala Leu Ser  
 20 25 30  
 Ile Ser Arg Pro His Pro Leu Trp Ser Glu Gln Ala Pro Glu Asp Trp  
 35 40 45  
 Trp Gln Ala Thr Asp Gln Ala Leu Gln Ala Leu Ala Ala Thr His Ser  
 50 55 60  
 Leu Arg Ala Val Lys Ala Leu Gly Leu Thr Gly Gln Met His Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Thr Leu Leu Asp Ala His Gln Asn Ile Leu Arg Pro Ala Ile Leu Trp  
 85 90 95  
 Asn Asp Gly Arg Ser Ala Ala Gln Cys Arg Thr Leu Glu Gln Leu Val  
 100 105 110  
 Pro Thr Ser Arg Gln Ile Thr Gly Asn Leu Met Met Pro Gly Phe Thr  
 115 120 125  
 Ala Pro Lys Leu Lys Trp Val Gln Glu Asn Glu Ser Asp Ile Phe Arg  
 130 135 140  
 Gln Ile Asp Lys Val Leu Leu Pro Lys Asp Tyr Leu Arg Trp Arg Leu  
 145 150 155 160  
 Thr Gly Glu Phe Ala Ser Asp Met Ser Asp Ala Ala Gly Thr Leu Trp  
 165 170 175  
 Leu Asp Val Ala Lys Arg Asp Trp Ser Asp Ala Leu Leu Glu Ala Cys  
 180 185 190  
 Ser Leu Ser Arg Glu His Met Pro Thr Leu Tyr Glu Gly Asn Gln Ile  
 195 200 205  
 Thr Gly Tyr Leu Arg Pro Asp Ile Ala Ser Arg Trp Gly Met Asp Pro  
 210 215 220  
 Val Pro Val Ile Ala Gly Gly Gly Asp Asn Ala Ala Gly Ala Ile Gly  
 225 230 235 240  
 Val Gly Leu Tyr Gln Thr Gly Gln Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Ser  
 245 250 255  
 Gly Val Tyr Phe Ala Val Ser Asp Gly Phe Leu Ser Asn Pro Gln His  
 260 265 270  
 Ala Val His Ser Phe Cys His Ala Leu Pro Asn Thr Trp His Leu Met  
 275 280 285  
 Ser Val Met Leu Ser Ala Ala Ser Cys Leu Asp Trp Val Ala Arg Leu  
 290 295 300  
 Thr His Ala Glu Ser Val Pro Ala Leu Leu Gln Glu Val Ala Ser Met  
 305 310 315 320  
 Pro Ala Asp Asp Thr Ile Thr Pro Val Trp Phe Leu Pro Tyr Leu Ser  
 325 330 335  
 Gly Glu Arg Thr Pro His Asn Asn Pro Asp Ala Lys Gly Ala Phe Trp  
 340 345 350

ES 2 654 809 T3

Gly Leu Thr His Gln His Gly Arg Ala Glu Leu Ala Lys Ala Val Leu  
 355 360 365

Glu Gly Val Gly Phe Ala Leu Ala Asp Gly Met Asp Ala Leu His Met  
 370 375 380

Thr Gly Leu Lys Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ile Gly Gly Gly Ala Arg  
 385 390 395 400

Ser Asp Tyr Trp Arg Gln Met Leu Ala Asp Ile Ser Gly Gln Thr Leu  
 405 410 415

Glu Tyr Arg Thr Gly Gly Asp Val Gly Pro Ala Leu Gly Ala Ala Arg  
 420 425 430

Leu Ala Gln Ile Ala Met His Pro His Thr Pro Leu Ala Glu Leu Leu  
 435 440 445

Pro Pro Leu Pro Met Glu Gln Val His Gln Pro Asn Thr Gln Arg His  
 450 455 460

Ala Asp Tyr Ala Glu Arg Arg Arg Thr Phe Lys Thr Leu Tyr Gln Gln  
 465 470 475 480

Leu Ser Pro Leu Met  
 485

<210> 3  
 <211> 1320  
 5 <212> ADN  
 <213> *Erwinia carotovora*

<220>  
 <221> gen  
 10 <222> (1)..(1320)  
 <223> XylA

<400> 3

ES 2 654 809 T3

atgcaagcct attttgaaca gatcgaaaaa gttcgttatg aaggtagcca aagcagtaat 60  
 ccocttcgcct ttogtcacta caatcccgat caggaaattc tcggtaaacy tatggcggac 120  
 catttgcggt ttgccgtcgc ttattggcac acgttctgct ggaacggctc ggatatgttc 180  
 ggcgtcggat cctttgcccg gccgtggcag cagtcggggc atgcgctgga actggcgaag 240  
 cgcaaagcgg atatcgcatt cgaattcttt caaaaactaa gcgtgcctta ctactgcttt 300  
 catgacgtcg atgtcgcgcc ggaagggaac tcgctgaaag aatatctgca taacattgcy 360  
 gtgatcaccg atgtgctggc ggaaaagcag caggatagcg gcgtgaaact gctgtggggc 420  
 accgctaact gcttcaccaa tccccgctat ggcgcaggcg cggccaccaa tcctgatcca 480  
 gatgtgtttg cctgggctgc tacgcagggt ttcacggcaa tgaacgcgac caaaacactg 540  
 ggcggtgaaa actatgtgct gtggggcggg cgcaagggt atgaaactct gctcaatacc 600  
 gacctgcgtc aggagcgtga gcaaattggc cgttttatgc aatggttgt cgagcataaa 660  
 cacaaaatcg gttttcaggg cacactgctc attgaaaccga aaccgcagga accgactaaa 720  
 catcagtagc attacgatgt cgccactggt tatggcttcc tgaaacagtt tgggctggaa 780  
 aaagagatta aagtcaacgt ggaagccaac cacgcgacgc ttgctgggca ttcattccac 840  
 catgagatcg ccaccgctgt cgcgctgggc gttttcggat cggctgatgc caatcgcggc 900  
 gaccctcagc ttggctggga caccgatcag ttccttaaca gcgtggaaga aaacacgctg 960  
 atcatgtatg aaattctcaa ggcaggcggc ttcacgacag gtgggctgaa ctttgatgcc 1020  
 aaagttcgtc gccagagcac cgatcgtat gacctttcc atgcgcatat cggcgcgatg 1080  
 gatacaatgg cactggcgct caaggctgct gccagaatga ttgaagatga taagctcaat 1140  
 caattggtcg ccaagcgcta tgcgggctgg aacggtgaac taggtcagca aattctgcaa 1200  
 ggcaacgcgt cgctggaatc gctggctcag tatgcggaaa gccatcaact ggcaccacag 1260  
 caccagagcg gccagcagga actgctggaa aatctggtta accgccatct atttgctag 1320

- 5 <210> 4
- <211> 1458
- <212> ADN
- <213> *Erwinia carotovora*
- <220>
- <221> gen
- 10 <222> (1)..(1458)
- <223> XylB
- <400> 4

ES 2 654 809 T3

atgtatatcg gtattgatct gggcacttcc ggtgttaaag ccatcttact ggatgaaaca 60  
 ggagaggtga tcgccagcca tagcgccgcg ctgagcattt ctcgccgca tccgctttgg 120  
 tcggagcaag cgcctgagga ctggtggcag gcaacagacc aagcgctaca agcattggca 180  
 gcaacacaca gccttcgocg cgtgaaagcg ctggggttga cggggcaaat gcacggggca 240  
 accttgctgg acgctcacca gaacattctg cgacctgoga tcctttgaa tgacggacgt 300  
 agcgcggcgc aatgccgaac gctggaacag ttggtgccta cctcgcgcca gattaccggc 360  
 aacctgatga tgccgggctt tactgctccc aaactaaaat ggggtgcagga aaacgaaagc 420  
 gatatctttc gccaaatcga caaggtcctg ctgccaaaag actatctccg ctggcgtctg 480  
 acaggggaat ttgccagcga tatgtccgat gcggctggaa ccctctggct ggacgtcgcc 540  
 aaacgggatt ggagcgtatg tctgctggaa gcctgctogc tgagccgtga acacatgcc 600  
 acgctgtatg aaggcaacca gattaccggg tatctgcgac ctgacatcgc cagtcgctgg 660  
 ggtatggatc ccgtcccgtt tattgctggc ggtggggata acgcagcagg cgcgattggc 720  
 gtcgggctgt atcaaaccgg tcagggcgtg ctgtctctcg gcacatccgg cgtttatttc 780  
 gccgtcagcg acggttttct cagtaatcct cagcatgccg tccacagctt ttgccatgcg 840  
 ctgccaaata cctggcacct gatgtccgtg atgttaagcg cggcgtcctg cctagattgg 900  
 gtcgcccggc tgacacacgc cgagagcgtg cccgcactgt tgcaggaagt cgcctcaatg 960  
 ccagccgatg acacgataac gccagtgctg tttttgcctt atctttctgg cgagcgtaca 1020  
 ccgcacaaca atcctgatgc caaagggcga ttctgggggc tcaccacca gcacggccgc 1080  
 gcagagctgg caaaagcggg gctggaaggc gtgggatttg cgcttgccga tgggatggac 1140  
 gcactgcata tgactgggct aaaaccgatg agcatcacgc taattggcgg tggcgcacgt 1200  
 agcgactatt ggcggcaaat gttggcagat atcagtggtc aaactctgga ataccgcacg 1260  
 ggcggcgtatg tcggcccagc gctgggtgcc gcccgctctg cacaatcgc tatgcatccc 1320  
 catacggcac tggcagaact cttgccgccc ctaccgatgg agcaggttca tcagccgaat 1380  
 acccagcgcc acgccgacta tgccgagcgt aggcgcacat ttaaacgct ctaccaacag 1440  
 cttagtccgc tgatgtag 1458

5 <210> 5  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> xylAB(Er) cebador

<400> 5  
 acacatatgc aagcctattt tgaacagatc 30

15 <210> 6  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> xylAB(Er) cebador

5 <400> 6  
agaactagtg cctttggtg ggtttaagt 30

<210> 7  
<211> 36  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> pcj7-xylAB(Er) cebador

15 <400> 7  
gagttcctcg agactagtag aaacatcca gcgcta 36

<210> 8  
<211> 36  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> pcj7-xylAB(Er) cebador

25 <400> 8  
gatgtcgggc ccactaggcc ttttgggtg gttta 36

<210> 9  
<211> 3440  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> pcj7-xylAB(Er)

35 <400> 9

ES 2 654 809 T3

agaaacatcc cagcgctact aatagggagc gttgaccttc cttccacgga cgggtaatcg	60
gagtgcctaa aaccgcatgc ggcttaggct ccaagatagg ttctgcgagg cgggtaatg	120
catcttcttt agcaacaagt tgaggggtag gtgcaaataa gaacgacata gaaatcgtct	180
cctttctggt tttaatcaac atacaccacc acctaaaaat tccccgacca gcaagttcac	240
agtattcggg cacaatatcg ttgccaaaat attgtttcgg aatatcatgg gatacgtacc	300
caacgaaagg aaacacatat gcaagcctat tttgaacaga tcgaaaagt tcgttatgaa	360
ggtagccaaa gcagtaatcc cttcgccttt cgtcactaca atcccgatca ggaaattctc	420
ggtaaacgta tggcggacca tttgcgtttt gcogtcgctt attggcacac gttctgctgg	480
aacggctcgg atatgttcgg cgtcggatcc tttgcccggc cgtggcagca gtcgggcgat	540
gcgctggaac tggcgaagcg caaagcggat atcgcattcg aattctttca aaaactaagg	600
gtgccttaot actgctttca tgacgtcgat gtcgcgcccgg aagggaactc gctgaaagaa	660
tatctgcata acattgcggg gatcacogat gtgctggcgg aaaagcagca ggatagcggc	720
gtgaagctgc tgtggggcac cgctaactgc ttcaccaate cccgctatgg cgcaggcggc	780
gccaccaatc ctgatccaga tgtgtttgcc tgggctgcta cgcaggtggt cacggcaatg	840
aacgcgacca aaactctggg cggtgaaaac tatgtgctgt ggggcgggcg cgaagggtat	900
gaaactctgc tcaataaccga cctgcgtcag gagcgtgagc aaattggccg ctttatgcaa	960
atggttgctg agcataaaca caaaatcggg tttcagggca cactgctcat tgaaccgaaa	1020
ccgcaggaac cgactaaaca tcagtaacgat tacgatgtcg cactgttta tggttctctg	1080
aaacagtttg ggctggaaaa agagattaaa gtcaacgtgg aagccaacca cgcgacgctt	1140
gctgggcatt cattccacca tgagatcgcc accgctgtcg cgctgggcgt tttcggatcg	1200

ES 2 654 809 T3

gtcgatgcc aatcgccgga ccctcagctt ggctgggaca ccgatcagtt ccctaacagc 1260  
gtggaagaaa acacgctgat catgtatgaa attctcaagg caggcggctt cacgacaggt 1320  
gggctgaact ttgatgcaa agttcgtcgc cagagcaccg atcgctatga ccttttccat 1380  
gcgcatatcg gcgcgatgga tacaatggca ctggcgctca aggetgctgc cagaatgatt 1440  
gaagatgata agctcaatca attggtcgcc aagcgctatg cgggctggaa cggatgaacta 1500  
ggtcagcaaa ttctgcaagg caacggtcgc ctggaatcgc tggctcagta tgogaaagc 1560  
catcaactgg caccacagca ccagagcggc cagcaggaac tgctggaaaa tctggttaac 1620  
cgccatctat ttggctagtg cggtagcctt gcctgctacg gcaggttaa aaactgccgt 1680  
agcataaggt tatcaggagc gactatgtat atcggtattg atctgggcac ttcgggtgtt 1740  
aaagccatct tactggatga aacaggagag gtgatcgcca gccatagcgc cgcgctgagc 1800  
attctcgtc cgcacccgtt ttggtcggag caagcgcctg aggactggtg gcaggcaaca 1860  
gaccaagcgc tacaagcatt ggcaagcaaca cacagccttc gcgccgtgaa agcgtggtgg 1920  
ttgaccgggc aatgcaagg ggcaaccttg ctggagcctc accagaacat tctgcgacct 1980  
gcgatccttt ggaatgacgg acgtagcgcg gcgcaatgcc gaacgctgga acagtgggtg 2040  
cctacctcgc gccagattac cggcaacctg atgatccgg gctttactgc tcccaacta 2100  
aatgggtgc aggaaaacga aagcgatata ttctgcaaaa tcgacaaggt cctgctgcca 2160  
aaagactatc tccgctggcg tctgacaggg gaatttgcca gcgatatgct cgatgcggct 2220  
ggaacctctt ggctggacgt cggcaaacgg gattggagcg atgctctgct ggaagcctgc 2280  
tcgctgagcc gtgaacacat gccacgctg tatgaaggca accagattac cggttatctg 2340  
cgacctgaca tcgccagtcg ctggggtatg gatcccgtcc ccgttattgc tggcgggtgg 2400  
gataacgcag caggcgcgat tggcgtcggg ctgtatcaaa ccggtcaggc gatgctgtct 2460  
ctcggcaaat ccggcgttta ttctcgcgtc agcagcgggt ttctcagtaa tcctcagcat 2520  
gccgtccaca gcttttgcca tcgctgcca aatacctggc acctgatgct cgtgatgta 2580  
agcgcggcgt cctgcctaga ttgggtcgcc cgcctgacac acgcccagag cgtcccgcga 2640  
ctgttgacgg aagtcgcctc aatgccagcc gatgacacga taacgccagt gtggtttttg 2700  
ccctatcttt ctggcgagcg tacaccgcac aacaatcctg atgccaaagg cgcattctgg 2760  
gggctcacc accagcagcg ccgcccagag ctggcaaaag cggctgctgga aggcgtggga 2820  
tttgcgcttg ccgatgggat ggacgcactg catatgactg ggctaaaacc cgatagcctc 2880  
acgctaattg gcggtggcgc acgtagcgcac tattggcggc aaatggtggc agatatacgt 2940  
ggtcaaacctc tggaataccg cacggggcgc gatgctggcc cagcgtggtg tgcccgcctg 3000  
ctggcacaaa tcgctatgca tccccatacg ccaactggcag aactcttgcc gccgctaccg 3060  
atggagcagg ttcacagcc gaataaccag cggcaacgcc actatgccga gcgtaggcgc 3120

ES 2 654 809 T3

	acatttataaaa cgctctacca acagcttagt ccgctgatgt agcaccgttc gtccggtaga	3180
	ccggacgggt agtcaactca cccagcgccg cacatcaatc ttctgtaaag ccatcgaaag	3240
	cagcaggctg gccgccagcg cgatgggtgaa gacatagaag atatcgagaa ccggatgatc	3300
	cggcagcatc acatcatgcg tacgtagata gtgaatgatc aacgcgtgga aaccgtaa	3360
	cggcagcgaa tgacgcgaaa tgggtggcaaa acccggtgaa atccgctggc taaagtagta	3420
	cttaaacacc accaaaaggc	3440
5	<210> 10 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> pcj7 cebador	
	<400> 10 tcaaaatagg cttgcatgag tgtttccttt cgttg 35	
15	<210> 11 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> xylAB(Ec) cebador	
	<400> 11 caacgaaagg aaacacatgc aagcctattt tgac 34	
25	<210> 12 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> xylAB(Ec) cebador	
35	<400> 12 gatgtcgggc ccactagtc tgcattaac acgcca 6	
40	<210> 13 <211> 3145 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> xylAB(Ec)	
	<400> 13	

ES 2 654 809 T3

atgcaagcct attttgacca gctcgatcgc gttcgttatg aaggctcaaa atcctcaaac 60  
 ccgttagcat tccgtcacta caatcccgac gaactggtgt tgggtaagcg tatggaagag 120  
 cacttgcggt ttgccgcctg ctactggcac accttctgct ggaacggggc ggatatgttt 180  
 ggtgtggggg cgtttaatcg tccgtggcag cagcctggtg aggcactggc gttggcgaag 240  
 cgtaaagcag atgtgcgatt tgagtttttc cacaagtac atgtgccatt ttattgcttc 300  
 cacgatgtgg atgtttcccc tgagggcgcg tcgttaaaaag agtacatcaa taattttgcg 360  
 caaatggttg atgtcctggc aggcaagcaa gaagagagcg gcgatgaagct gctgtgggga 420  
 acggccaact gctttacaaa ccctcgtac ggcgcgggtg cggcgacgaa ccagatcct 480  
 gaagtcttca gctgggcggc aacgcaagtt gttacagcga tggaagcaac ccataaattg 540  
 ggcggtgaaa actatgtcct gtggggcggg cgtgaaggtt acgaaacgct gttaaatacc 600  
 gacttgcgtc aggagcgtga acaactgggc cgctttatgc agatggtggt tgagcataaa 660  
 cataaaatcg gttccaggg cacgttgctt atcgaaccga aaccgcaaga accgacaaa 720  
 catcaatatg attacgatgc cgcgacggtc tatggcttcc tgaaacagtt tggctctgaa 780  
 aaagagatta aactgaacat tgaagctaac cacgcgacgc tggcaggtca ctctttccat 840  
 catgaaatag ccaccgcat tgcgcttggc ctgttcgggt ctgtcgacgc caaccgtggc 900  
 gatgcgcaac tgggctggga caccgaccag ttcccgaaaca gtgtggaaga gaatgcgctg 960  
 gtgatgtatg aaattctcaa agcagggcgt ttaccaccog gtggtctgaa cttcgatgcc 1020  
 aaagtacgtc gtcaaagtac tgataaatat gatctgtttt acggtcatat cggcgcgatg 1080  
 gatacgatgg cactggcgct gaaaattgca gcgcgcatga ttgaagatgg cgagctggat 1140  
 aaacgcatcg cgcagcgta ttccggctgg aatagcgaat tgggcccagca aatcctgaaa 1200  
 ggccaaatgt cactggcaga tttagccaaa tatgtcagg aacatcattt gtctccgggtg 1260  
 catcagagtg gtgccagga acaactggaa aatctggtaa accattatct gttcgacaaa 1320  
 taacggctaa ctgtgcagtc cgttgcccg gttatcggta gcgataccgg gcattttttt 1380  
 aaggaacgat cgatatgtat atcgggatag atcttggcac ctcgggcgta aaagttatit 1440  
 tgctcaacga gcaggggtgag gtggttgctg cgcaaaccgga aaagctgacc gtttcgccc 1500  
 cgcattccact ctggctggaa caagaccggg aacagtgggt gcaggcaact gatcgcgcaa 1560  
 tgaaagctct gggcgatcag cattctctgc aggacgttaa agcattgggt attgccggcc 1620  
 agatgcacgg agcaaccttg ctggatgctc agcaaccggg gttacgcctt gccatititgt 1680  
 ggaacgacgg gcgctgtgcg caagagtgca ctttctgga agcgcgagtt ccgcaatcgc 1740  
 ggggtgattac cggcaacctg atgatgccc gatttactgc gcctaaattg ctatgggttc 1800  
 agcggcatga gcgggagata ttccgtcaaa tcgacaaagt attattaccg aaagattact 1860  
 tgcgtctgcg tatgacgggg gagtttgcca gcgatatgct tgacgcagct ggcaccatgt 1920

ES 2 654 809 T3

ggctggatgt cgcaaagcgt gactggagt acgtcatgct gcaggcttgc gacttatctc 1980  
 gtgaccagat gcccgatta tacgaaggca gcgaaattac tgggtgcttg ttacctgaag 2040  
 ttgcgaaagc gtggggtatg gcgacggtgc cagttgtcgc aggcggtggc gacaatgcag 2100  
 ctggtgcagt tgggtgaggga atggttgatg ctaatcaggc aatgttatcg ctggggacgt 2160  
 cgggggtcta ttttgctgtc agcgaagggt tcttaagcaa gccagaaagc gccgtacata 2220  
 gcttttgcca tgcgctaccg caacgttggc atttaatgtc tgtgatgctg agtgcagcgt 2280  
 cgtgtctgga ttgggcccgcg aaattaaccg gcctgagcaa tgtcccagct ttaatcgtg 2340  
 cagctcaaca ggctgatgaa agtgccgagc cagtttggtt tctgccttat ctttccggcg 2400  
 agcgtacgcc acacaataat ccccaggcga agggggtttt ctttggtttg actcatcaac 2460  
 atggcccaaa tgaactggcg cgagcagtcg tggaaaggcgt gggttatgcg ctggcagatg 2520  
 gcatggatgt cgtgcatgcc tgcggtatta aaccgcaaag tgttacgttg attgggggcg 2580  
 gggcgcgtag tgagtactgg cgtcagatgc tggcggatat cagcggtcag cagctcgatt 2640  
 accgtacggg ggggatgtg gggccagcac tgggcgcagc aaggctggcg cagatcgcg 2700  
 cgaatccaga gaaatcgctc attgaattgt tgcgcaact accgttagaa cagtcgcatc 2760  
 taccagatgc gcagcgttat gccgcttacc agccacgacg agaaacgttc cgtcgctct 2820  
 atcagcaact tctgccatta atggcgtaaa cgttatcccc tgctgaccg ggtgggggat 2880  
 aattcacatc tatatatctc agtaattaat taatatttag tatgaattta ttctgaaaat 2940  
 catttgtaa tggcattttt cagttttgtc tttcgttggg tactcgtaat gtatcgtg 3000  
 tagatatgga gatcgttatg aaaacctcaa agactgtggc aaaactatta tttgttgcg 3060  
 gggcgctggt ttatctggtt gggctatgga tctcatgcc attgttaagt ggaaaaggct 3120  
 attttcttg cgtgttaatg acagc 3145

5 <210> 14  
 <211> 318  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> pcj7 promotor

<400> 14

agaaacatcc cagcgcact aatagggagc gttgacctc cttccacgga cggtaatcg 60  
 gagtgccata aaccgcatgc ggcttaggct ccaagatagg ttctgcgagg cgggtaatg 120  
 catcttcttt agcaacaagt tgaggggtag gtgcaaataa gaacgacata gaaatcgtct 180  
 cctttctggt ttaatacaac atacaccacc acctaaaaat tccccgacca gcaagttcac 240  
 agtattcggg cacaatatcg ttgccaaaat attgtttcgg aatatcatgg gatacgtacc 300

15 caacgaaagg aacacat 318

<210> 15  
 <211> 23  
 <212> ADN

ES 2 654 809 T3

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> pcj7 cebador  
 5 <400> 15  
 aatctagaaa catcccagcg cta 23  
 <210> 16  
 <211> 29  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> pcj7 cebador  
 15 <400> 16  
 aaactagtca tatgtgttc cttcgttg 29  
 <210> 17  
 <211> 2844  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> xylAB(Er)  
 <400> 17  
 atgcaagcct attttgaaca gatcgaaaaa gttcgttatg aaggtagcca aagcagtaat 60  
 cccttcgcct ttcgtcaacta caatcccgat caggaaattc tcggtaaacg tatggcggac 120  
 catttgcggt ttgccgtcgc ttattggcac acgttctgct ggaacggctc ggatatgttc 180  
 ggcgtcggat cctttgcccg gccgtggcag cagtcggggc atgctgctgga actggcgaag 240  
 cgcaaagcgg atatcgcat cgaattcttt caaaaactaa gcgtgcctta ctactgcttt 300  
 catgacgtcg atgtcgcgcc ggaaggaac tcgctgaaag aatatctgca taacattgcg 360  
 gtgatcaccg atgtgctggc ggaaaagcag caggatagcg gcgtgaagct gctgtggggc 420  
 accgctaact gcttcaccaa tccccgctat ggcgcaggcg cggccaccaa tcctgatcca 480  
 gatgtgtttg cctgggctgc tacgcaggtg ttcacggcaa tgaacgcgac caaaacactg 540  
 ggcggtgaaa actatgtgct gtggggcggg cgcgagggt atgaaactct gctcaatacc 600  
 gacctgcgtc aggagcgtga gcaaattggc cgctttatgc aaatggttgt cgagcataaa 660  
 cacaaaatcg gttttcaggg cacactgctc attgaaccga aaccgcagga accgactaaa 720

ES 2 654 809 T3

catcagtacg attacgatgt cgccactggt tatggcttcc tgaaacagtt tgggctggaa 780  
 aaagagatta aagtcaacgt ggaagccaac cacgcgacgc ttgctgggca ttcattccac 840  
 catgagatcg ccaccgctgt cgcgctgggc gtttctggat cggtcgatgc caatcgcggc 900  
 gaccctcagc ttggctggga caccgatcag ttccttaaca gcgtggaaga aaacacgctg 960  
 atcatgtatg aaattctcaa ggcaggcggc ttcacgacag gtgggctgaa ctttgatgcc 1020  
 aaagtctgtc gccagagcac cgatcgctat gaccttttcc atgcgcatat cggcgcgatg 1080  
 gatacaatgg cactggcgtc caaggctgct gccagaatga ttgaagatga taagctcaat 1140  
 caattggtcg ccaagcgtc tgcgggctgg aacggtgaac taggtcagca aattctgcaa 1200  
 ggcaacgcgt cgetggaatc gctggctcag tatgcggaaa gccatcaact ggcaccacag 1260  
 caccagagcg gccagcagga actgctggaa aatctggtta accgccatct atttggttag 1320  
 tgcggtacgc ttgcctgcta cggcaggtta aaaaactgcc gtagcataag gttatcagga 1380  
 gcgactatgt atatcggat tgatctgggc acttccggtg ttaaagccat cttactggat 1440  
 gaaacaggag aggtgatcgc cagccatagc gccgcgctga gcatttctcg tccgcatccg 1500  
 ctttggtcgg agcaagcgc tgaggactgg tggcaggcaa cagaccaagc gctacaagca 1560  
 ttggcagcaa cacacagcct tcgcgccgtg aaagcgtcgg ggttgaccgg gcaaatgcac 1620  
 ggggcaacct tgctggacgc tcaccagaac attctgcgac ctgcgatcct ttggaatgac 1680  
 ggacgtagcg cggcgcgatg ccgaacgctg gaacagttgg tgctacctc gcgccagatt 1740  
 accggcaacc tgatgatgcc gggctttact gctccaaac taaaatgggt gcaggaaaac 1800  
 gaaagcgata tctttcgcca aatcgacaag gtctctgctgc caaaagacta tctccgctgg 1860  
 cgtctgacag ggaatttgc cagcgatagc tccgatcggc ctggaaccct ctggctggac 1920  
 gtcgccaaac gggattggag cgatgctctg ctggaagcct gctcgtgag ccgtgaacac 1980  
 atgccacgc tgatgaagg caaccagatt accggttacc tgcgacctga catcgccagt 2040  
 cgctgggta tggatcccgt ccccgttatt gctggcggtg gggataacgc agcaggcgcg 2100  
 attggcgtcg ggctgtatca aaccggctcag gcgatgctgt ctctcggcac atccggcgtt 2160  
 tatttcgccg tcagcgacgg ttttctcagt aatcctcagc atgccgtcca cagcttttgc 2220  
 catgcgctgc caaatacctg gcacctgatg tccgtgatgt taagcgcggc gtctgccta 2280  
 gattgggtcg cccgcctgac acacgccgag agcgtgcccg cactggtgca ggaagtgcgc 2340  
 tcaatgccag ccgatgacac gataacgccg gtgtggtttt tgccctatct ttctggcgag 2400  
 cgtacaccgc acaacaatcc tgatgcaaaa ggcgcattct gggggctcac ccaccagcac 2460  
 ggcgcgcgag agctggcaaa agcgggtgctg gaaggcgtgg gatttgcgct tgccgatggg 2520  
 atggacgcac tgcatatgac tgggctaaaa ccgatagca tcacgctaata tggcgggtggc 2580

ES 2 654 809 T3

gcacgtagcg actattggcg gcaaatggtg gcagatatca gtggtcaaac tctggaatac 2640  
 cgcacgggcy gcgatgtcgg cccagcgctg ggtgccgcc gtctggcaca aatcgctatg 2700  
 catccccata cgccactggc agaactcttg ccgccgctac cgatggagca ggttcatcag 2760  
 ccgaataccc agcgccacgc cgactatgcc gagcgtaggc gcacatttaa aacgctctac 2820  
 caacagctta gtccgctgat gttag 2844

<210> 18  
 <211> 3122  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> xylAB(Er) fragmento

<400> 18

atgcaagcct attttgaaca gatcgaaaaa gttcgttatg aaggtagcca aagcagtaat 60  
 cccttcgcct ttcgtcacta caatcccgat caggaaattc tcggtaaacg tatggcggac 120  
 catttgcggtt ttgccgtcgc ttattggcac acgttctgct ggaacggctc ggatatgttc 180  
 ggcgtcggat cctttgcccg gccgtggcag cagtcgggcy atgcgctgga actggcgaag 240  
 cgcaaagcgg atatcgcat cgaattctt caaaaactaa gcgtgcctta ctactgcttt 300  
 catgacgtcg atgtcgcgcc ggaaggaac tcgctgaaag aatatctgca taacattgcy 360  
 gtgatcaccg atgtgctggc ggaaaagcag caggatagcy gcgtgaagct gctgtggggc 420  
 accgctaact gcttcaccaa tccccgctat ggcgcaggcy cggccaccaa tctgatcca 480  
 gatgtgtttg cctgggctgc tacgcaggty ttcacggcaa tgaacgcgac caaaactg 540  
 ggcggtgaaa actatgtgct gtggggcggg cgcgaagggt atgaaactct gctcaatacc 600  
 gacctgcgctc aggagcgtga gcaaatggc cgctttatgc aaatggttgt cgagcataaa 660  
 cacaaaatcy gttttcaggg cactgctc attgaaccga aaccgcagga accgactaaa 720  
 catcagtacy attacgatgt cgccactggt tatggcttcc tgaaacagtt tgggctggaa 780  
 aaagagatta aagtcaacgt ggaagccaac cacgcgacgc ttgctgggca ttcattccac 840  
 catgagatcy ccaccgctgt cgcgctgggc gttttcggat cggctgatgc caatcgcggc 900  
 gaccctcagc ttggctggga caccgatcag ttccctaaca gcgtggaaga aaacacgctg 960  
 atcatgtatg aaattctcaa ggcaggcggc ttcacgacag gtgggctgaa ctttgatgcc 1020  
 aaagttcgtc gccagagcac cgatcgctat gaccttttcc atgcgcatat cggcgcgatg 1080  
 gatacaatgy cactggcgtc caaggctgct gccagaatga ttgaagatga taagctcaat 1140  
 caattggtcy ccaagcgtc tgcgggctgy aacggtgaa taggtcagca aattctgcaa 1200  
 ggcaacgcgt cgctggaatc gctggctcag tatgcggaaa gccatcaact ggcaccacag 1260

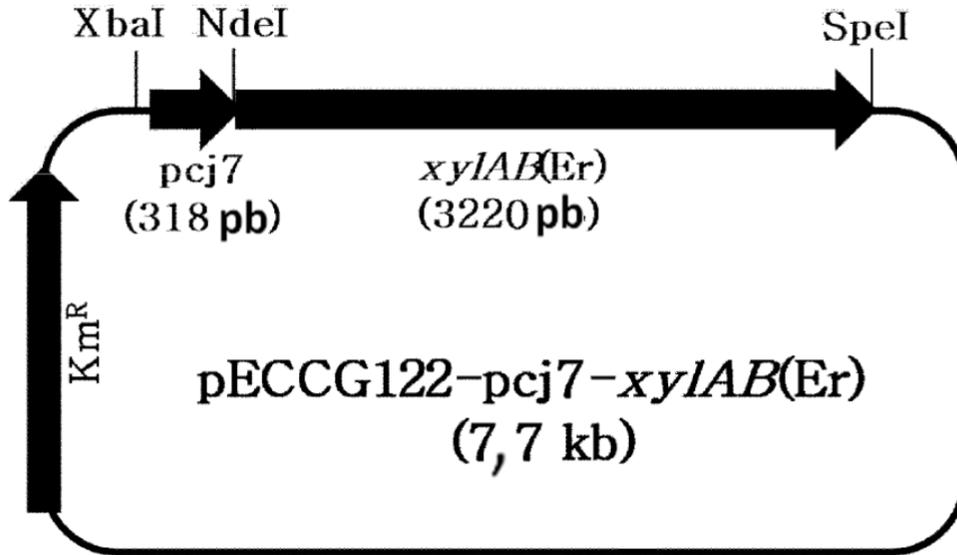
ES 2 654 809 T3

caccagagcg gccagcagga actgctggaa aatctggtta accgccatct atttggetag 1320  
tgcggtacgc ttgcctgcta cggcaggta aaaaactgcc gtagcataag gttatcagga 1380  
gcgactatgt atatcggtat tgatctgggc acttccgggtg ttaaagccat cttactggat 1440  
gaaacaggag aggtgatcgc cagccatagc gccgcgctga gcatttctcg tccgcatccg 1500  
ctttggtcgg agcaagcgcc tgaggactgg tggcaggcaa cagaccaagc gctacaagca 1560  
ttggcagcaa cacacagcct tcgcgccgtg aaagcgctgg ggttgaccgg gcaaatgcac 1620  
ggggcaacct tgctggacgc tcaccagaac attctgcgac ctgcgatcct ttggaatgac 1680  
ggacgtagcg cggcgcaatg ccgaacgctg gaacagttgg tgccctacctc gcgccagatt 1740  
accggcaacc tgatgatgcc gggctttact gctcccaaac taaaatgggt gcaggaaaac 1800  
gaaagcgata tctttcgcca aatcgacaag gtccctgctgc caaaagacta tctccgctgg 1860  
cgtctgacag ggggaatttgc cagcgatatg tccgatgcgg ctggaaccct ctggetggac 1920  
gtcgccaaac gggattggag cgatgctctg ctggaagcct gctcgtgag ccgtgaacac 1980  
atgcccacgc tgtatgaagg caaccagatt accggttatc tgcgacctga catcgccagt 2040  
cgctgggta tggatcccgt ccccgttatt gctggcgggtg gggataacgc agcaggcgcg 2100  
attggcgtcg ggctgtatca aaccggtcag gcgatgctgt ctctcggcac atccggcgtt 2160  
tatttcgccg tcagcgacgg ttttctcagt aatcctcagc atgccgtcca cagcttttgc 2220  
catgcgctgc caaatacctg gcacctgatg tccgtgatgt taagcgcggc gtccctgccta 2280  
gattgggtcg cccgcctgac acacgccgag agcgtgcccg cactggtgca ggaagtgcgc 2340  
tcaatgccag ccgatgacac gataacgcc a gtgtggtttt tgccctatct ttctggcgag 2400  
cgtacaccgc acaacaatcc tgatgccaaa ggcgcattct gggggctcac ccaccagcac 2460  
ggccgcgag agctggcaaa agcgggtgctg gaaggcgtgg gatttgcgct tgccgatggg 2520  
atggacgcac tgcatatgac tgggctaaaa cccgatagca tcacgctaata tggcgggtggc 2580  
gcacgtagcg actattggcg gcaaatggtg gcagatatca gtgggtcaaac tctggaatac 2640  
cgcacgggcy gcgatgtcgg cccagcgtg ggtgccgccc gtctggcaca aatcgctatg 2700  
catccccata cgccactggc agaactcttg ccgccgtac cgatggagca ggttcacag 2760  
ccgaataccc agcgccacgc cgactatgcc gagcgtagge gcacatttaa aacgctctac 2820  
caacagctta gtccgctgat gtagcacctg tcgtccggta caccggacgg gtagtcaact 2880  
caccagcgc cgcacatcaa tcttctgtaa agccatcgaa agcagcagge tggcggccag 2940  
cgcgatggtg aagacataga agatatcgag aaccggatga tccggcagca tcacatcatg 3000  
cgtacgtaga tagtgaatga tcaacgcgtg gaaaccgtaa atcgccagcg aatgacgcga 3060  
aatggtggca aaaccggta agatccgctg gctaaagtag tacttaaca ccacaaaag 3120  
gc 3122

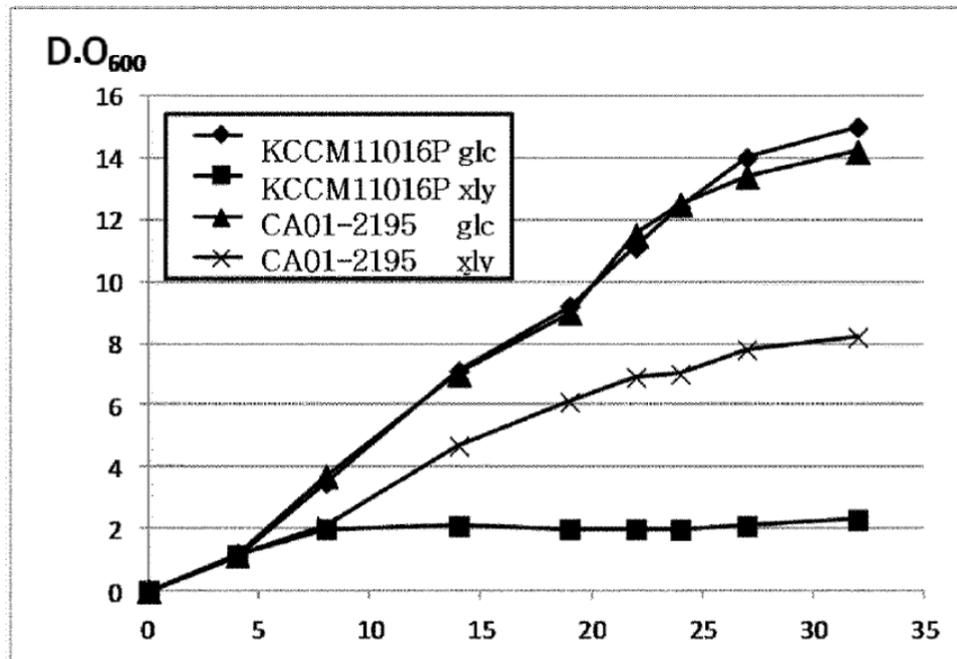
**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo de *Corynebacterium* sp. modificado capaz de producir L-lisina utilizando xilosa, en el que el microorganismo comprende la xilosa isomerasa (XylA) y xilulocinasa (XylB) derivadas de *Erwinia carotovora*, en el que la XylA comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tiene un 95 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en el que XylB comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia de aminoácido que tiene un 90 % o más de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que XylA es codificada por una secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 3, y XylB es codificada por una secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 4.
3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*.
4. Un procedimiento de producción del microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la introducción de las actividades de XylA y XylB se lleva a cabo insertando un polinucleótido que incluye las secuencias de nucleótidos que codifican XylA y XylB en un cromosoma, introduciendo un sistema de vector que incluye el polinucleótido en el microorganismo, corriente arriba de las secuencias de nucleótido que codifican XylA y XylB, introduciendo XylA y XylB con un promotor modificado, o introduciendo las secuencias de nucleótido modificadas que codifican XylA y XylB.
5. Un procedimiento de producción de L-lisina, que comprende las etapas de:
- (i) cultivar un microorganismo de *Corynebacterium* sp. modificado capaz de producir L-lisina utilizando xilosa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un medio de cultivo que contiene como una fuente de carbono para obtener un caldo de cultivo; y
  - (ii) recuperar L-lisina del caldo de cultivo.

[FIG. 1]



[FIG. 2]



[FIG. 3]

