

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 080**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/21</b>	(2006.01)
<b>C07C 37/00</b>	(2006.01)
<b>C07C 39/04</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)
<b>C12P 7/22</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/88</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2011 PCT/JP2011/076484**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12067174**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2011 E 11842421 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2641964**

54 Título: **Transformante de bacteria corineforme y método para producir fenol que usa el mismo**

30 Prioridad:

**18.11.2010 JP 2010258089**

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

**15.04.2020**

73 Titular/es:

**GREEN CHEMICALS CO., LTD. (100.0%)  
9-2, Kizugawadai, Kizugawa-shi  
Kyoto 619-0292, JP**

72 Inventor/es:

**YUKAWA, HIDEAKI y  
INUI, MASAYUKI**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 754 080 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

Transformante de bacteria corineforme y método para producir fenol que usa el mismo

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a una técnica para producir fenol. Más detalladamente, la presente invención se refiere a un transformante de bacteria corineforme construido por recombinación génica específica y por lo tanto dotado de una función de producción de fenol, y se refiere a un procedimiento eficiente de producción de fenol que usa el transformante.

10

**Antecedentes de la técnica**

En el contexto del calentamiento global y el agotamiento de los recursos fósiles, la producción de productos químicos usando recursos renovables, junto con la producción de biocombustibles, se reconoce como una industria emergente, la biorrefinería, que es un medio importante para hacer realidad una sociedad con bajas emisiones de carbono, y ha llamado la atención.

Sin embargo, la producción de biofenol usando recursos renovables es menos productiva en comparación con la producción de ácido láctico o etanol porque la reacción metabólica a partir de un sacárido de materia prima consiste en una gran cantidad de etapas. Además, por los motivos de que el fenol producido inhibe la proliferación bacteriana y que el fenol es citotóxico, se ha considerado imposible la producción industrial de fenol.

20

El uso importante de fenol son las resinas de fenol. Una resina de fenol, que se produce mediante condensación por adición de fenol y aldehído, es uno de los plásticos más antiguos, y con sus propiedades incluyendo una excelente resistencia al calor y durabilidad, se utiliza para diversos fines, tales como un material automotriz alternativo al metal, un material de sellado semiconductor y una placa de circuito incluso hoy en día. Debido a la reactividad extremadamente alta del fenol y el aldehído como materias primas y a la complicada estructura de red tridimensional de los polímeros de resina de fenol resultantes, se había considerado difíciles el diseño estructural preciso y el desarrollo para dar nanomateriales de los mismos y, por lo tanto, se habían aplicado para uso de alto valor añadido. Sin embargo, en los últimos años, la teoría de las propiedades físicas de polímeros y la simulación de los mismos se han desarrollado rápidamente, y por lo tanto, se ha hecho posible gradualmente crear materiales altamente funcionales a partir de resinas de fenol mediante el refinamiento de la estructura de la red. En estas circunstancias, la producción de resina de fenol en Japón también está aumentando año tras año.

25

30

35

El proceso de producción industrial de fenol actualmente empleado (proceso de cumeno) es un proceso típico que consume energía en la industria química que usa benceno y propileno derivados de petróleo como materias primas, y que requiere grandes cantidades de energía térmica y de disolvente. Por tanto, en vista de la conservación del medio ambiente global y la reducción de los gases de efecto invernadero, existe la necesidad urgente de desarrollar un proceso que ahorre energía, respetuoso con el medio ambiente que permita la producción de fenol a partir de recursos renovables y que pueda reducir las emisiones de dióxido de carbono y los productos de desecho, es decir, establecer tecnologías de producción de biofenol.

40

Hasta ahora no se han notificado bacterias productoras de fenol en la naturaleza.

45

Además, no se han conocido tecnologías de producción de fenol a base de bacterias recombinantes para lograr una productividad de fenol suficiente de manera práctica.

La tirosina fenol-liasa es una enzima que cataliza la síntesis de tirosina a partir de fenol, ácido pirúvico y amoníaco y la reacción inversa de los mismos (por ejemplo, PTL 1). PTL 2, por ejemplo, enseña la síntesis de tirosina a partir de fenol, ácido pirúvico y amoníaco con el uso de tirosina fenol-liasa derivada de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

50

Además, se sabe que la producción eficiente de tirosina fenol-liasa puede lograrse mediante la transformación de *Escherichia coli* con genes de tirosina fenol-liasa derivados de diversos seres vivos (PTL 3 a 5).

55

Wierckx *et al.*, ("Engineering of Solvent-Tolerant *Pseudomonas putida* S12 for Bioproduction of Phenol from Glucose", Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71 (12) :8221-8227) dan a conocer un transformante para la producción de fenol que se preparó mediante la introducción de un gen de tirosina fenol liasa de *Pantoea agglomerans* en *Pseudomonas putida* S12.

60

El documento WO 2009/154122 A1 da a conocer un transformante de bacteria corineforme preparado mediante transferencia de un gen exógeno que codifica para una proteína que tiene una función transportadora de azúcar al interior de una bacteria corineforme capaz de utilizar D-xilosa.

65

Sakai *et al.*, ("Effect of Lignocellulose-Derived Inhibitors on Growth of and Ethanol Production by Growth-Arrested *Corynebacterium glutamicum* R7", Appl. Environ. Microbiol., 2007, 73 (7) :2349-2353) dan a conocer estudios que muestran el efecto de inhibidores sobre la producción de etanol mediante *Corynebacterium glutamicum*.

5 El documento EP 2 639 306 A1, que representa un documento publicado más tarde, da a conocer un transformante productor de fenol construido mediante la transferencia de un gen que codifica para una enzima que tiene actividad 4-hidroxibenzoato decarboxilasa a *Corynebacterium glutamicum* como huésped.

10 El documento EP 2 615 170 A1, que también representa un documento publicado posteriormente, da a conocer un transformante de *Corynebacterium glutamicum* productor de fenol que contiene una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa, transformante que se usa en un proceso en el que el transformante reacciona en una mezcla de reacción que contiene un sacárido como fuente de carbono en condiciones reductoras.

### 15 **Lista de menciones**

[Bibliografía de patentes]

[PTL 1] Documento JP 2006-320238 A

20 [PTL 2] Documento JP 08-154675 A

[PTL 3] Documento JP 2005-278453 A

[PTL 4] Documento WO 90/04031

25 [PTL 5] Documento JP 04-218380 A

### **Sumario de la invención**

#### 30 **Problema técnico**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo capaz de producir eficientemente fenol a partir de tirosina, y un proceso para producir eficientemente fenol a partir de tirosina.

#### 35 **Solución al problema**

Los presentes inventores han llevado a cabo investigaciones incondicionales para lograr el objeto descrito anteriormente y han obtenido las siguientes conclusiones.

40 (i) Un transformante construido mediante la transferencia de un gen de tirosina fenol-liasa a una bacteria corineforme puede producir eficientemente fenol a partir de tirosina.

45 (ii) El transformante puede además producir eficientemente fenol en el caso de que el gen de fenol 2-monooxigenasa (poxF) en el cromosoma de la bacteria corineforme como huésped tenga una alteración o delección.

(iii) El transformante tiene una productividad de fenol particularmente mayor cuando la proliferación se inhibe sustancialmente en una mezcla de reacción en condiciones de reducción.

50 La presente invención, que se ha completado basándose en los hallazgos mencionados anteriormente, proporciona el siguiente transformante y proceso para producir fenol.

[1] Un transformante de *Corynebacterium glutamicum* PHE31 (número de registro: NITE BP-999).

55 [2] Un procedimiento para producir fenol, que comprende una etapa de permitir que un transformante productor de fenol de *Corynebacterium glutamicum* que comprende un gen que codifica para una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa reaccione en una mezcla de reacción que contiene tirosina, una sal de la misma o un éster de la misma en condiciones reductoras, y una etapa de recoger fenol de la mezcla de reacción, con la condición de que se excluya el caso en el que se usa una mezcla de reacción que contiene un sacárido como fuente de carbono.

60 [3] El procedimiento del anterior [2], en el que el gen que codifica para una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa es un gen de *Pantoea agglomerans*, un gen de *Citrobacter braakii*, un gen de *Desulfotobacterium hafniense*, un gen de *Chloroflexus aurantiacus*, un gen de *Nostoc punctiforme* o un gen de *Treponema Denticola*.

65 [4] El procedimiento del anterior [2] o [3], en el que el gen que codifica para una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa es ADN de los siguientes (a) o (b):

(a) un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 16, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 23, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 24, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 25, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26 o un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 27;

5 (b) un ADN que se hibrida con un ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria de cualquiera de los ADN de (a) en condiciones rigurosas y que codifica para un polipéptido que tiene actividad tirosina fenol-liasa.

10 [5] El procedimiento del anterior [2] a [4], en el que *Corynebacterium glutamicum* es un *Corynebacterium glutamicum* en el que se altera o deleciona un gen que codifica para una enzima que tiene actividad fenol 2-monooxigenasa en el cromosoma.

15 [6] El procedimiento del anterior [2] a [4], en el que el *Corynebacterium glutamicum* es *Corynebacterium glutamicum* R (FERM BP-18976), ATCC13032 o ATCC13869.

[7] El procedimiento del anterior [2] a [4], en el que el *Corynebacterium glutamicum* es una cepa de *Corynebacterium glutamicum* R (FERM BP-18976), ATCC13032 o ATCC13869 en la que se altera o deleciona un gen que codifica para una enzima que tiene actividad fenol 2-monooxigenasa en el cromosoma.

20 [8] El procedimiento del anterior [2] a [4], en el que el *Corynebacterium glutamicum* es un transformante de *Corynebacterium glutamicum* PHE31 que tiene el número de registro: NITE BP-999.

[9] El procedimiento del anterior [2], en el que el transformante no prolifera sustancialmente en la etapa de reacción.

25 [10] El procedimiento del anterior [2], en el que el potencial de oxidación-reducción de la mezcla de reacción en condiciones de reducción es de -200 mV a -500 mV.

### 30 Efectos ventajosos de invención

Con el uso del transformante de la presente invención, puede producirse fenol eficientemente a partir de tirosina.

35 Generalmente, el crecimiento de microorganismos se inhibe por un disolvente, tal como un fenol, debido a su citotoxicidad, y por lo tanto, la producción de fenol con el uso de microorganismos fue difícil. Según el procedimiento de la presente invención, sin embargo, la producción de fenol con el uso de microorganismos puede lograrse con una eficiencia suficiente de manera práctica.

### Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 muestra la construcción de un plásmido usado en los ejemplos.

La figura 2 muestra la influencia del fenol sobre la proliferación de diversos microorganismos en condiciones aerobias.

### 45 Descripción de realizaciones

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

#### (I) Transformante productor de fenol

50 El transformante de la presente invención capaz de producir fenol es un transformante construido mediante la transferencia de un gen que codifica para una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa a una bacteria corineforme como huésped.

#### Huésped

55 La bacteria corineforme es un grupo de microorganismos definidos en el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, vol. 8, 599 (1974), y no está particularmente limitada mientras prolifere en condiciones aerobias normales.

60 Los ejemplos específicos incluyen *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* y *Micrococcus*. Entre las bacterias corineformes, se prefiere *Corynebacterium*.

Los ejemplos de *Corynebacterium* incluyen *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium halotolerance* y *Corynebacterium alkanolyticum*.

65 Entre otros, se prefiere *Corynebacterium glutamicum* por seguridad y alta producción de fenol. Los ejemplos de cepas

preferidas incluyen *Corynebacterium glutamicum* R (FERM P-18976), ATCC13032, ATCC13869, ATCC13058, ATCC13059, ATCC13060, ATCC13232, ATCC13286, ATCC13287, ATCC13655, ATCC13745, ATCC13746, ATCC13761, ATCC14020, ATCC31831, MJ-233 (P-1497) y MJ-233AB-41 (FERM BP-1498). Entre otros, se prefieren las cepas R (FERM P-18976), ATCC13032 y ATCC13869.

Según la clasificación biológica molecular, los nombres de algunas especies de bacterias corineformes, como *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium divaricatum* y *Corynebacterium lilium* están estandarizados a *Corynebacterium glutamicum* (Liebl, W. et al., Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM 1412, and *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 255-260. (1991); y Kazuo Komagata et al., "Classification of the coryneform group of bacteria", Fermentation and industry, 45: 944-963 (1987)).

*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497) y MJ-233AB-41 (FERM BP-1498), etc. de la clasificación antigua también son adecuadas como *Corynebacterium glutamicum*.

Los ejemplos de *Brevibacterium* incluyen *Brevibacterium ammoniagenes* (por ejemplo, ATCC6872).

Los ejemplos de *Arthrobacter* incluyen *Arthrobacter globiformis* (por ejemplo, ATCC8010, ATCC4336, ATCC21056, ATCC31250, ATCC31738 y ATCC35698).

Los ejemplos de *Mycobacterium* incluyen *Mycobacterium bovis* (por ejemplo, ATCC19210 y ATCC27289).

Los ejemplos de *Micrococcus* incluyen *Micrococcus freudenreichii* (por ejemplo, n.º 239 (FERM P-13221)), *Micrococcus leuteus* (por ejemplo, n.º 240 (FERM P-13222)), *Micrococcus ureae* (por ejemplo, IAM1010) y *Micrococcus roseus* (por ejemplo, IFO3764).

Las bacterias corineformes pueden ser, y mucho menos una cepa natural, un mutante de las mismas o un recombinante artificial de las mismas. Los ejemplos de las mismas incluyen alteradores en los que se altera un gen de lactato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa o malato deshidrogenasa. El uso de un alterador como huésped puede mejorar la productividad de fenol y reducir la producción de subproductos.

Entre otros, se prefiere un alterador en el que se altera un gen de lactato deshidrogenasa. En el alterador, el gen de lactato deshidrogenasa se altera y se bloquea la ruta metabólica del ácido pirúvico al ácido láctico. Entre otros, se prefiere especialmente un alterador de la cepa *Corynebacterium glutamicum* R (FERM P-18976) en la que se altera el gen de lactato deshidrogenasa.

Tal alterador puede prepararse basándose en un proceso de ingeniería genética convencional. Tal alterador de lactato deshidrogenasa y el proceso de preparación del mismo se describen en el documento WO 2005/010182 A1.

Tal como se muestra en el ejemplo 3, los presentes inventores encontraron que las bacterias corineformes tienen una resistencia significativamente mayor al fenol en comparación con otros microorganismos. En este sentido, las bacterias corineformes se prefieren en la producción de fenol por el proceso de la presente invención.

Además, en comparación con otros microorganismos aerobios, las bacterias corineformes pueden producir más eficientemente sustancias en condiciones reductoras donde las bacterias no proliferan sustancialmente. En este sentido, también se prefieren las bacterias corineformes en la producción de fenol por el proceso de la presente invención.

#### 50 Gen de tirosina fenol-liasa (tpl)

La tirosina fenol-liasa es una enzima que cataliza una reacción en la que se produce fenol mediante la eliminación de ácido pirúvico y amoníaco de tirosina y la reacción inversa de la misma. La tirosina fenol-liasa también cataliza una reacción en la que se produce L-DOPA a partir de catecol y ácido pirúvico.

El gen que codifica para una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa puede ser de cualquier origen sin limitación particular, y se prefiere un gen derivado de *Pantoea agglomerans*, un gen derivado de *Citrobacter braakii*, un gen derivado de *Desulfitobacterium hafniense*, un gen derivado de *Chloroflexus aurantiacus*, un gen derivado de *Nostoc punctiforme* o un gen derivado de *Treponema denticola*. Entre otros, se prefiere más un gen derivado de *Pantoea agglomerans*.

Los ejemplos del gen derivado de *Pantoea agglomerans* incluyen el ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 16, los ejemplos del gen derivado de *Citrobacter braakii* incluyen el ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 23, los ejemplos del gen derivado de *Desulfitobacterium hafniense* incluyen el ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 24, los ejemplos del gen derivado de *Chloroflexus aurantiacus* incluyen el ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 25, los ejemplos del gen derivado de *Nostoc punctiforme*

incluyen el ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26 y los ejemplos del gen derivado de *Treponema denticola* incluyen el ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 27.

5 En la presente invención, puede usarse también un ADN que se hibrida con un ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria de la secuencia de bases de SEQ ID NO: 16, 23, 24, 25, 26 o 27 en condiciones rigurosas y que codifica para un polipéptido que tiene actividad tirosina fenol-liasa.

10 Las "condiciones rigurosas" usadas en el presente documento significan las condiciones generales, por ejemplo, las condiciones descritas en el documento *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, segunda edición, 1989, vol. 2, pág. 11. 45. Esto significa, en particular, condiciones en las que la hibridación se produce a una temperatura de 5 a 10°C por debajo de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de un híbrido perfecto.

15 La actividad tirosina fenol-liasa puede medirse mediante un método modificado del método descrito en J. Biol. Chem., 245, 1767-1772 (1970) "Materials and Methods". En resumen, mediante la adición de la enzima de prueba a un líquido para la prueba, se preparó una mezcla de reacción que contenía un tampón fosfato de potasio 50 mM a pH 8,0, L-Tyr 2,5 mM, piridoxal-fosfato 0,1 mM, glicerol al 20%, y se permitió que la mezcla reaccionara a 30°C durante 30 minutos (0, 5, 10, 20, 30 minutos). La reacción se detuvo mediante la adición de ácido clorhídrico 0,6 N (concentración final). Después de que la mezcla de reacción se sometiera a centrifugación y filtración por filtro, el fenol producido se analizó y cuantificó por HPLC (Cosmosil C18 AR11, fase móvil: el 20% de MeOH y el 0,07% de ácido perclorhídrico). La actividad específica se calculó basándose en la velocidad inicial de la reacción y la concentración de proteína (la cantidad de la enzima requerida para producir 1 µmol de fenol por minuto se definió como 1 unidad).

25 En la presente invención, también puede usarse un ADN que consiste en una secuencia de bases que tiene el 90% o más, preferiblemente el 95% o más, más preferiblemente el 98% o más de homología con la secuencia de bases de SEQ ID NO: 16, 23, 24, 25, 26 o 27 y que codifica para un polipéptido que tiene actividad tirosina fenol-liasa.

En la presente invención, se calculó la homología de secuencia de bases usando GENETYX Ver. 8 (fabricado por Genetyx).

30 El homólogo del ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 16, 23, 24, 25, 26 o 27 puede seleccionarse de una biblioteca de ADN de una especie diferente, por ejemplo, PCR o hibridación usando un cebador o una sonda diseñados basándose en estas secuencias de bases, según un método convencional, y como resultado, puede obtenerse un ADN que codifica para un polipéptido que tiene actividad tirosina fenol-liasa con una alta probabilidad.

### 35 Construcción de vector para transformación

El ADN que codifica tirosina fenol-liasa se amplifica mediante PCR y luego se clona en un vector adecuado que es replicable en un huésped.

40 El vector de plásmido puede ser cualquier vector de plásmido siempre y cuando comprenda un gen responsable de replicar de forma autónoma la función en una bacteria corineforme. Los ejemplos específicos del vector de plásmido incluyen pAM330 derivado de *Brevibacterium lactofermentum* 2256 (JP 58-67699 A; Miwa, K. *et al.*, Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol. Chem. 48:2901-2903 (1984); y Yamaguchi, R. *et al.*, Determination of the complete nucleotide sequence of the *Brevibacterium lactofermentum* plasmid pAM330 and the analysis of its genetic information. Nucleic Acids Symp. Ser. 16:265-267 (1985)); pHM1519 derivado de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13058 (Miwa, K. *et al.*, Cryptic plasmids in glutamic acid-producing bacteria. Agric. Biol. Chem. 48:2901-2903 (1984)) y PCry30 derivado de la misma (Kurusu, Y. *et al.*, Identification of plasmid partition function in coryneform bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57:759-764 (1991)); pCG4 derivado de *Corynebacterium glutamicum* T250 (JP 57-183799 A; y Katsumata, R. *et al.*, Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. J. Bacteriol., 159:306-311 (1984)), pAG1, pAG3, pAG14 y pAG50 derivados de la misma (JP 62-166890 A), y pEK0, pEC5 y pEKEx1 derivados de la misma (Eikmanns, B.J. *et al.*, A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing. Gene, 102:93-98 (1991)); etc.

55 Los ejemplos de un promotor preferido incluyen el promotor PgapA como promotor del gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa A (gapA), el promotor Pmdh como promotor del gen de malato deshidrogenasa (mdh) y el promotor PldA como promotor del gen de lactato deshidrogenasa A (ldhA), todos los cuales se derivan de *Corynebacterium glutamicum* R, y entre otros, se prefiere PgapA.

60 Los ejemplos de un terminador preferido incluyen el terminador rrnB T1T2 del operón de ARNr de *Escherichia coli*, el terminador trpA de *Escherichia coli* y el terminador trp de *Brevibacterium lactofermentum*, y entre otros, se prefiere el terminador rrnB T1T2.

### 65 Transformación

Como método de transformación, cualquier método conocido públicamente puede usarse sin limitación. Los ejemplos

de tal método conocido incluyen el método de cloruro de calcio/cloruro de rubidio, el método de fosfato de calcio, la transfección de DEAE-dextrano y la electroporación. Entre otros, se prefiere para una bacteria corineforme la electroporación, que puede realizarse por un método conocido (Kurusu, Y. *et al.*, Electroporation-transformation system for Coryneform bacteria by auxotrophic complementation. *Agric. Biol. Chem.* 54:443-447 (1990); y Vertes A.A. *et al.*, Presence of mrr- and mcr-like restriction systems in Coryneform bacteria. *Res.* 144:181-185 (1993)).

El transformante se cultiva usando un medio de cultivo generalmente usado para el cultivo de microorganismos. El medio de cultivo puede ser un medio natural o sintético que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, otras sustancias nutricionales, etc.

Los ejemplos de la fuente de carbono incluyen hidratos de carbono y alcoholes azucarados tales como glucosa, fructosa, sacarosa, manosa, maltosa, manitol, xilosa, arabinosa, galactosa, almidón, melaza, sorbitol y glicerol; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido glucónico; y alcoholes tales como etanol y propanol. Hidrocarburos, tales como parafina normal, etc. también pueden usarse como se desee. Estas fuentes de carbono pueden utilizarse solas o como mezcla de dos o más de las mismas. La concentración de estas fuentes de carbono en el medio de cultivo suele ser de aproximadamente el 0,1 al 10% en p/v.

Los ejemplos de la fuente de nitrógeno incluyen compuestos inorgánicos u orgánicos de amonio, tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio y acetato de amonio; urea; amoníaco acuoso; nitrato de sodio; y nitrato de potasio. Compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como licor de maceración de maíz, extracto de carne, peptona, N-Z-amina, hidrolizado de proteínas, aminoácidos, etc. también pueden usarse. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o como mezcla de dos o más de las mismas. La concentración de estas fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo varía según el tipo de compuesto nitrogenado, pero suele ser de aproximadamente el 0,1 al 10% en p/v.

Los ejemplos de las sales inorgánicas incluyen dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, nitrato de hierro (II), sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de cobalto y carbonato de calcio. Estas sales inorgánicas pueden utilizarse solas o como mezcla de dos o más de las mismas. La concentración de las sales inorgánicas en el medio de cultivo varía según el tipo de sales inorgánicas, pero suele ser de aproximadamente el 0,01 al 1% en p/v.

Los ejemplos de las sustancias nutricionales incluyen extracto de carne, peptona, polipeptona, extracto de levadura, levadura seca, licor de maceración de maíz, leche desnatada en polvo, hidrolizado de ácido clorhídrico de soja desgrasada y extracto de animales, plantas o microorganismos, y productos de degradación de los mismos. La concentración de las sustancias nutricionales en el medio de cultivo varía según el tipo de sustancias nutricionales, pero suele ser de aproximadamente el 0,1 al 10% en p/v. Además, pueden añadirse vitaminas según sea necesario. Los ejemplos de vitaminas incluyen biotina, tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6), ácido pantoténico, inositol, ácido nicotínico, etc.

El pH del medio de cultivo es preferiblemente de 5 a 8.

Los ejemplos del medio de cultivo microbiano preferible incluyen medio A (Inui, M. *et al.*, Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7:182-196 (2004)), medio BT (Omumasaba, C. A. *et al.*, *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8:91-103 (2004)), etc.

La temperatura del cultivo es de aproximadamente 15 a 45°C, y el período de cultivo es de aproximadamente 1 a 7 días.

#### Alteración o delección en el gen cromosómico del huésped

En la bacteria corineforme como huésped, el gen que codifica para una enzima que tiene actividad fenol 2-monooxigenasa (poxF) en el cromosoma tiene preferiblemente una alteración o delección para la producción eficiente adicional de fenol.

La sustitución de un gen en el cromosoma con el gen correspondiente que tiene una alteración o delección puede lograrse mediante la creación de un gen con mutación por delección para no permitir la producción de una proteína enzimática que funcione normalmente, y la transformación de una bacteria con un ADN que comprende el gen mutado para recombinación en la que se intercambian el gen en el cromosoma y el gen mutado. Una proteína enzimática codificada por un gen que tiene una alteración o delección, incluso cuando se produce, tiene una conformación diferente de la del tipo natural, y no tiene función o está reducida. La delección génica o la alteración génica por medio de tal reemplazo génico mediante recombinación homóloga ya se ha establecido, y los ejemplos de lo mismo incluyen un método que usa un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a la temperatura o un plásmido capaz de transferencia conyugal, y un método que usa un vector suicida que no tiene un origen de replicación que funciona en un huésped (patente estadounidense n.º 6303383 y documento JP 05-007491 A).

Específicamente, mediante el método descrito en el ejemplo 1, puede obtenerse una bacteria corineforme en la que se altera o elimina el gen de fenol 2-monooxigenasa (poxF).

5 (II) Procedimiento para producir fenol

El fenol puede producirse mediante un procedimiento que comprende una etapa de permitir que el transformante descrito anteriormente de la presente invención reaccione en una mezcla de reacción que contiene tirosina, y una etapa de recoger fenol de la mezcla de reacción.

10

Proliferación de microorganismos

Antes de la reacción, el transformante preferiblemente se cultiva y prolifera en condiciones aerobias a de aproximadamente 25 a 38°C durante de aproximadamente 12 a 48 horas.

15

Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el cultivo aerobio del transformante antes de la reacción puede ser un medio natural o sintético que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, otras sustancias nutricionales, etc.

20

Los ejemplos de la fuente de carbono que puede usarse incluyen sacáridos (monosacáridos tales como glucosa, fructosa, manosa, xilosa, arabinosa y galactosa; disacáridos tales como sacarosa, maltosa, lactosa, celobiosa, xilobiosa y trehalosa; polisacáridos tales como almidón; y melaza); alcoholes de azúcar tales como manitol, sorbitol, xilitol y glicerol; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido maleico y ácido glucónico; alcoholes tales como etanol y propanol; e hidrocarburos tales como parafina normal.

25

Estas fuentes de carbono pueden utilizarse solas o como mezcla de dos o más de las mismas.

30

Los ejemplos de la fuente de nitrógeno que pueden usarse incluyen compuestos de amonio inorgánicos u orgánicos, tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, nitrato de amonio y acetato de amonio; urea; amoníaco acuoso; nitrato de sodio; y nitrato de potasio. Compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como licor de maceración de maíz, extracto de carne, peptona, N-Z-amina, hidrolizado de proteínas, aminoácidos, etc. también pueden usarse. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o como mezcla de dos o más de las mismas. La concentración de estas fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo varía según el tipo de compuesto nitrogenado, pero suele ser de aproximadamente el 0,1 al 10% en p/v.

35

Los ejemplos de las sales inorgánicas incluyen dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, nitrato de hierro (II), sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de cobalto y borato de calcio. Estas sales inorgánicas pueden usarse solas o como mezcla de dos o más de las mismas. La concentración de las sales inorgánicas en el medio de cultivo varía según el tipo de sales inorgánicas, pero suele ser de aproximadamente el 0,01 al 1% en p/v.

40

Los ejemplos de las sustancias nutricionales incluyen extracto de carne, peptona, polipeptona, extracto de levadura, levadura seca, licor de maceración de maíz, leche desnatada en polvo, hidrolizado de ácido clorhídrico de soja desgrasada y extracto de animales, plantas o microorganismos, y productos de degradación de los mismos. La concentración de las sustancias nutricionales en el medio de cultivo varía según el tipo de sustancias nutricionales, pero suele ser de aproximadamente el 0,1 al 10% en p/v.

45

Además, pueden añadirse vitaminas según sea necesario. Los ejemplos de vitaminas incluyen biotina, tiamina (vitamina B1), piridoxina (vitamina B6), ácido pantoténico, inositol, ácido nicotínico, etc.

50

El pH del medio de cultivo es preferiblemente de aproximadamente 6 a 8.

55

Los ejemplos específicos del medio de cultivo preferible para bacterias corineformes incluyen medio A (Inui, M. *et al.*, Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7:182-196 (2004)), medio BT (Omumasaba, C. A. *et al.*, *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 8:91-103 (2004)), etc. Tal medio de cultivo puede usarse después de prepararse para contener un sacárido a una concentración en el intervalo mencionado anteriormente.

60

Mezcla de reacción

Como mezcla de reacción, puede usarse agua, una disolución tampón, un medio salino inorgánico, o similares, que contienen un precursor fenol (materia prima para fenol).

65

Como precursor, puede usarse tirosina (L-tirosina, D-tirosina, o una mezcla de las mismas), una sal de la misma, o un éster de la misma. Entre otros, se prefiere la L-tirosina, una sal de la misma, o un éster de la misma. Los ejemplos de la sal incluyen una sal de sodio, una sal de potasio y un clorhidrato. Los ejemplos del éster incluyen ésteres con alcoholes que tienen de 1 a 4 átomos de carbono. Dado que la tirosina es poco soluble en agua, preferiblemente se usa una sal de tirosina, y más preferida es una sal de sodio. Estos precursores pueden usarse solos o una mezcla de dos o más tipos.

La concentración de tirosina, una sal de la misma o un éster de la misma en la mezcla de reacción es preferiblemente de aproximadamente el 0,5 al 10% en p/v, más preferiblemente de aproximadamente el 1 al 7% en p/v y aún más preferiblemente de aproximadamente el 2 al 5% en p/v. Cuando la concentración se encuentra en el intervalo anterior, el fenol puede producirse eficientemente.

Los ejemplos de la disolución tampón incluyen un tampón fosfato, un tampón de Tris, un tampón carbonato, etc. La concentración de la disolución tampón es preferiblemente de aproximadamente 10 a 150 mM.

Los ejemplos del medio salino inorgánico incluyen un medio que contiene uno o más tipos de sales inorgánicas, incluyendo dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, nitrato de hierro (II), sulfato de manganeso, sulfato de zinc, sulfato de cobalto y carbonato de calcio. Entre otros, se prefiere un medio que contiene sulfato de magnesio. Un ejemplo específico del medio salino inorgánico incluye medio BT (Omumasaba, C. A. *et al.*, *Corynebacterium glutamicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms with opposite, ATP-dependent regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 8:91-103 (2004)), etc. La concentración de las sales inorgánicas en el medio de cultivo varía según el tipo de sales inorgánicas, pero suele ser de aproximadamente el 0,01 al 1% en p/v.

El pH de la mezcla de reacción es preferiblemente de aproximadamente 6 a 8. Durante la reacción, el pH de la mezcla de reacción se mantiene preferiblemente casi neutro, en particular a alrededor de 7 con el uso de amoníaco acuoso, hidróxido de sodio acuoso, o similares, bajo el control de un controlador de pH (por ejemplo, tipo: DT-1023 fabricado por Able).

#### Condiciones de reacción

La temperatura de reacción, es decir, la temperatura para mantener vivo el transformante durante la reacción es preferiblemente de aproximadamente de 20 a 50°C, y más preferiblemente de aproximadamente de 25 a 47°C. Cuando la temperatura está en el intervalo anterior, el fenol puede producirse eficientemente.

El período de reacción es preferiblemente de aproximadamente de 1 a 7 días, y más preferiblemente de aproximadamente de 1 a 3 días.

El cultivo puede ser un procedimiento discontinuo, un procedimiento de alimentación discontinua o un procedimiento continuo. Entre otros, se prefiere un procedimiento discontinuo.

#### <Condiciones reductoras>

La reacción puede realizarse en condiciones aerobias o condiciones reductoras, pero preferiblemente se realiza en condiciones reductoras. En condiciones reductoras, las bacterias corineformes no proliferan sustancialmente y pueden además producir eficientemente fenol.

Las "condiciones reductoras" se definen basándose en el potencial de oxidación-reducción de la mezcla de reacción. El potencial de oxidación-reducción de la mezcla de reacción es preferiblemente de aproximadamente -200 mV a -500 mV, y más preferiblemente de aproximadamente -250 mV a -500 mV.

Las condiciones reductoras de la mezcla de reacción pueden estimarse simplemente con el uso de indicador de resazurina (en condiciones reductoras, se observa decoloración de azul a incoloro). Sin embargo, para una medición precisa, se utiliza un medidor de potencial redox (por ejemplo, electrodos ORP fabricados por BROADLEY JAMES).

Como método de preparación de una mezcla de reacción en condiciones reductoras, cualquier método públicamente conocido puede usarse sin limitación. Por ejemplo, como medio líquido para la preparación de la mezcla de reacción, puede usarse una disolución acuosa para una mezcla de reacción en lugar de agua destilada o similar. Como referencia para la preparación de la disolución acuosa para una mezcla de reacción, por ejemplo, puede usarse el método para preparar un medio de cultivo para microorganismos estrictamente anaerobios, tales como microorganismos reductores de sulfato (Pfennig, N. *et al.*: The dissimilatory sulfate-reducing bacteria, en *The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Ed. de Starr, M. P. *et al.* Berlín, Springer Verlag, 926-940, 1981, o *Nogeikagaku Jikken-sho*, Ed. por Kyoto Daigaku Nogakubu Nogeikagaku Kyoshitsu, vol. 3, Sangyo Tosho, 1990, número 26), y tal método proporciona una disolución acuosa en condiciones reductoras deseadas.

Específicamente, mediante el tratamiento de agua destilada o similares con calor o a presión reducida para la eliminación de gases disueltos, puede obtenerse una disolución acuosa para una mezcla de reacción en condiciones reductoras. En este caso, para la eliminación de gases disueltos, especialmente oxígeno disuelto, puede tratarse agua destilada o similares a presión reducida de unos 10 mmHg o menos, preferiblemente de aproximadamente 5 mmHg o menos, más preferiblemente de aproximadamente 3 mmHg o menos, durante de aproximadamente 1 a 60 minutos, preferiblemente durante de aproximadamente 5 a 40 minutos.

Alternativamente, añadiendo un agente reductor adecuado (por ejemplo, ácido tioglicólico, ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, ácido mercaptoacético, ácido tiolacético, glutatión, sulfuro de sodio, etc.), puede prepararse una disolución acuosa para una mezcla de reacción en condiciones reductoras.

Estos métodos pueden combinarse adecuadamente para preparar una disolución acuosa eficaz para una mezcla de reacción en condiciones reductoras.

Se prefiere mantener las condiciones reductoras de la mezcla de reacción durante la reacción. Para el mantenimiento de condiciones reductoras, se prefiere que el oxígeno procedente del exterior del sistema de reacción no pueda entrar en el sistema en la mayor medida posible. Los ejemplos específicos del método empleado para este fin incluyen un método que comprende encapsular el sistema de reacción con gas inerte, tal como gas nitrógeno, gas dióxido de carbono, etc. En algunos casos, para permitir que las funciones metabólicas en las células de la bacteria aerobia de la presente invención funcionen de eficazmente durante la reacción, puede ser necesaria la adición de una disolución de diversos nutrientes o una disolución de reactivos para ajustar y mantener el pH del sistema de reacción. En tal caso, para una prevención más eficaz de la incorporación de oxígeno, resulta eficaz eliminar el oxígeno en las disoluciones que van a añadirse, por adelantado.

#### Recogida de fenol

A través del cultivo realizado de la manera anterior, se produce fenol en la mezcla de reacción. El fenol puede recogerse recogiendo la mezcla de reacción, y también es factible aislar fenol de la mezcla de reacción por un método conocido. Los ejemplos de tal método conocido incluyen destilación, el método de permeación de membrana y el método de extracción con disolvente orgánico.

#### **Ejemplos**

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle por medio de los ejemplos, pero la presente invención no se limita a los mismos.

#### Ejemplo 1

##### Clonación y expresión del gen de producción de fenol

##### (1) Extracción de ADN cromosómico de microorganismos

Para extraer ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* R (FERM P-18976), la bacteria se inoculó, con el uso de un asa de platino, en medio A (se disolvieron 2 g de  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ , 7 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 0,06% (p/v) +  $\text{MNSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 0,042% (p/v), 1 ml de disolución al 0,02% (p/v) de biotina, 2 ml de solución de tiamina al 0,01% (p/v), 2 g de extracto de levadura y 7 g de casaminoácido de ensayo de vitaminas en 1 l de agua destilada), que se complementó con glucosa al 50% (p/v) como fuente de carbono hasta una concentración final del 4%, y se cultivó con agitación a 33°C hasta la fase logarítmica de crecimiento. Después de recoger las células bacterianas, se recuperó el ADN cromosómico de las células recogidas con el uso de un kit de extracción de ADN (nombre comercial: Kit de aislamiento de ADN de tejido y células GenomicPrep, fabricado por Amersham) según el manual de instrucciones.

Para extraer ADN cromosómico de *Pantoea agglomerans* NBRC12686, se inoculó la bacteria en el medio NBRC No. 802 (se disolvieron 10 g de polipeptona, 2 g de extracto de levadura y 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 1 l de agua destilada) con el uso de un asa de platino, y se cultivó con agitación a 30°C hasta la fase logarítmica de crecimiento. Después de recoger las células bacterianas, se recuperó el ADN cromosómico de las células recogidas con el uso de un kit de extracción de ADN (nombre comercial: Kit de aislamiento de ADN de tejido y células GenomicPrep, fabricado por Amersham) según el manual de instrucciones.

##### (2) Construcción de vectores de clonación

##### Construcción del vector de clonación pCRB22

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de origen de replicación de ADN de pCASE1, un plásmido derivado de *Corynebacterium casei* JCM12072 (más adelante en el presente documento abreviado como pCASE1-ori) y un fragmento de ADN que comprende un vector de clonación pHSG298 (fabricado por Takara Bio, Inc.) se

amplificaron por el siguiente método de PCR.

En la PCR, se sintetizaron los siguientes conjuntos de cebadores basándose en SEQ ID NO: 1 (secuencia de pCASE1-ori) y SEQ ID NO: 2 (vector de clonación pHSG298) para la clonación de la secuencia de pCASE1-ori y del vector de clonación pHSG298, y se utilizaron.

Cebadores para la amplificación de la secuencia de PCE1-ORI

(a-1); 5'-AT AGATCT AGAACGTCCGTAGGGAGC-3' (SEQ ID NO: 3)

(b-1); 5'-AT AGATCT GACTTGTAGGGGAC-3' (SEQ ID NO: 4)

Los cebadores (a-1) y (b-1) tienen cada uno un sitio de enzima de restricción BglII añadido al mismo.

Cebadores para la amplificación del vector de clonación pHSG298

(a-2); 5'-AT AGATCT AGGTTCCCGACTGGGAAG-3' (SEQ ID NO: 5)

(b-2); 5'-AT AGATCT CGTGCCAGCTGCATTAATGA-3' (SEQ ID NO: 6)

Los cebadores (a-2) y (b-2) tienen cada uno un sitio de enzima de restricción BglII añadido al mismo.

Como ADN de molde, se utilizó el ADN total extraído de *Corynebacterium casei* JCM12072 obtenido de la Japan Collection of Microorganisms (JCM) y el vector de clonación pHSG298 (fabricado por Takara Bio, Inc.).

La PCR real se realizó con el uso de un ciclador térmico, GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems) y Takara LA Taq (fabricado por Takara Bio, Inc.) como reactivo de reacción en las condiciones descritas a continuación.

Mezcla de reacción:

TaKara LA Taq™ (5 unidades/μl)	0,5 μl
Tampón 10X LA PCR™ II (libre de Mg <sup>2+</sup> )	5 μl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 μl
Mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno)	8 μl
ADN de molde	5 μl (contenido de ADN: 1 μg o menos)
Los 2 cebadores anteriores*)	0,5 μl cada uno (conc. final : 1 μM)
Agua destilada estéril	25,5 μl

Los componentes anteriores se mezclaron y 50 μl de la mezcla de reacción se sometieron a PCR.

\*) Para la amplificación de la secuencia de pCASE1-ori, se usó una combinación de cebadores (a-1) y (b-1), y para la amplificación del vector de clonación pHSG298, una combinación de cebadores (a-2) y (b-2).

Ciclo de PCR:

Etapas de desnaturalización:	94°C, 60 segundos
Etapas de apareamiento:	52°C, 60 segundos
Etapas de extensión:	72°C
Secuencia de pCASE1-ori:	150 segundos
Vector de clonación pHSG298:	180 segundos

Un ciclo que consiste en las 3 etapas anteriores se repitió 30 veces.

Usando 10 μl de la mezcla de reacción producida anteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. En el caso de la secuencia de pCASE1-ori, se detectó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,4 kb. En el caso del vector de clonación pHSG298, se detectó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,7 kb.

10 μl del fragmento de ADN de aproximadamente 1,4 kb que comprende la secuencia de pCASE1-ori derivada de *Corynebacterium casei* y 10 μl del fragmento de ADN de aproximadamente 2,7 kb que comprende el vector de clonación pHSG298, ambos amplificados por la PCR anterior, se cortaron cada uno con el uso de la enzima de restricción BglII y se procesaron a 70°C durante 10 minutos para la desactivación de la enzima de restricción. Ambos se mezclaron, y se añadieron a los mismos 1 μl de disolución tampón 10X de ADN ligasa de T4 y 1 unidad de ADN ligasa de T4 (fabricada por Takara Bio, Inc.). Se añadió a lo mismo agua destilada estéril para que el volumen total fuera de 10 μl, y se permitió que la mezcla reaccionara a 15°C durante 3 horas para la ligación. Esto se denominó

Líquido de ligación A.

Con el uso del líquido de ligación A, se transformó *Escherichia coli* JM109 por el método de cloruro de calcio (Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)) y se aplicó al medio de agar LB (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,5% y agar al 1,5%) que contenía 50 µg/ml de kanamicina.

Se sometió una cepa en crecimiento en el medio de cultivo al cultivo líquido de la manera habitual. El ADN de plásmido se extrajo del cultivo y se cortó con el uso de la enzima de restricción BglII para confirmar el fragmento insertado. Como resultado, además de un fragmento de ADN de aproximadamente 2,7 kb del vector de clonación pHSG298, se confirmó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,4 kb de la secuencia pCASE-ori.

El vector de clonación que comprende la secuencia de pCASE1-ori se denominó pCRB22 .

Construcción del vector de clonación pCRB207

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de promotor del gen gapA que codifica para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (más adelante en el presente documento abreviado como PgapA) derivada de *Corynebacterium glutamicum* R y un fragmento de ADN que comprende una secuencia de terminador bidireccional rrnBT1T2 (más adelante en el presente documento abreviado como secuencia de terminador) derivada de un vector de clonación pKK223-3 (fabricado por Pharmacia) se amplificaron por el siguiente método.

En la PCR se sintetizaron los siguientes conjuntos de cebadores basándose en SEQ ID NO: 7 (secuencia de PgapA) y SEQ ID NO: 8 (secuencia de terminador) para la clonación de la secuencia de PgapA y la secuencia de terminador, y se utilizaron.

Cebadores para la amplificación de la secuencia de PgapA

(a-3); 5'-CTCT GTCGAC CCGAAGATCTGAAGATTCCTG-3' (SEQ ID NO: 9)

(b-3) ; 5'-CTCT GTCGAC GGATCC CCATGG

TGTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG-3' (SEQ ID NO: 10)

El cebador (a-3) tiene un sitio de enzima de restricción Sall añadido al mismo, y el cebador (b-3) tiene sitios de enzimas de restricción Sall, BamHI y NcoI añadidos al mismo.

Cebadores para la amplificación de la secuencia de terminador

(a-4); 5'-CTCT GCATGC CCATGG CTGTTTGCGCGGATGAGA-3' (SEQ ID NO: 11)

(b-4); 5'- CTCT GCATGC TCATGA AAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAAGG-3' (SEQ ID NO: 12)

El cebador (a-4) tiene sitios de enzimas de restricción SphI y NcoI añadidos al mismo, y el cebador (b-4) tiene sitios de enzimas de restricción SphI y BspHI añadidos al mismo.

Como ADN de molde, se utilizó el ADN cromosómico extraído de *Corynebacterium glutamicum* R (FERM P-18976) y el plásmido pKK223-3 (fabricado por Pharmacia).

La PCR real se realizó con el uso de un ciclador térmico, GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems) y Takara LA Taq (fabricado por Takara Bio, Inc.) como reactivo de reacción en las condiciones descritas a continuación.

Mezcla de reacción:

Takara LA Taq™ (5 unidades/µl)	0,5 µl
Tampón 10X LA PCR™ II (libre de Mg <sup>2+</sup> )	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 µl
Mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno)	8 µl
ADN de molde	5 µl (contenido de ADN: 1 µg o menos)
Los 2 cebadores anteriores*)	0,5 µl cada uno (conc. final: 1 µM)
Agua destilada estéril	25,5 µl

Los componentes anteriores se mezclaron, y 50 µl de la mezcla de reacción se sometieron a PCR.

\*) Para la amplificación de la secuencia de PgapA se utilizó una combinación de cebadores (a-3) y (b-3), y para la amplificación de la secuencia de terminador una combinación de cebadores (a-4) y (b-4).

## ES 2 754 080 T3

Ciclo de PCR:

Etapa de desnaturalización:	94°C, 60 segundos
Etapa de apareamiento:	52°C, 60 segundos
Etapa de extensión:	72°C
Secuencia de PgapA:	45 segundos
Secuencia de terminador:	30 segundos

Un ciclo que consisten en las 3 etapas anteriores se repitió 30 veces.

5 Utilizando 10  $\mu$ l de la mezcla de reacción producida anteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. En el caso de la secuencia de PgapA, se detectó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,6 kb. En el caso de la secuencia de terminador, se detectó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb.

10 10  $\mu$ l del fragmento de ADN de aproximadamente 0,6 kb que comprende la secuencia de PgapA derivada de *Corynebacterium glutamicum* R, que se amplificó por la PCR anterior, y el vector de clonación pCRB22 de aproximadamente 4,1 kb, se cortaron cada uno con el uso de la enzima de restricción Sall y se procesaron a 70°C durante 10 minutos para la desactivación de la enzima de restricción. Ambos se mezclaron, y se añadieron a los mismos 1  $\mu$ l de disolución tampón 10X de ADN ligasa de T4 y 1 unidad de ADN ligasa de T4 (fabricada por Takara Bio, Inc.). Se añadió agua destilada estéril a lo mismo para que el volumen total fuera de 10  $\mu$ l, y se permitió que la mezcla reaccionara a 15°C durante 3 horas para la ligación. Esto se denominó líquido de ligación B.

15 Con el uso del líquido de ligación B, se transformó *Escherichia coli* JM109 por el método de cloruro de calcio (Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)) y se aplicó al medio de agar LB (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,5% y agar al 1,5%) que contenía 50  $\mu$ g/ml de kanamicina.

20 Se sometió una cepa en crecimiento en el medio de cultivo al cultivo líquido de la manera habitual. El ADN de plásmido se extrajo del cultivo y se cortó con el uso de la enzima de restricción Sall para confirmar el fragmento insertado. Como resultado, además de un fragmento de ADN de aproximadamente 4,1 kb del vector de clonación pCRB22, se confirmó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,6 kb de la secuencia de PgapA.

25 El vector de clonación que comprende la secuencia de PgapA se denominó pcrB206.

30 10  $\mu$ l del fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb que comprende la secuencia de terminador derivada del plásmido pKK223-3, que se amplificó por la PCR anterior, se cortó con el uso de las enzimas de restricción NcoI y BSPHI, 2  $\mu$ l del vector de clonación pCRB206 anterior se cortaron con el uso de la enzima de restricción NcoI, y ambos se procesaron a 70°C durante 10 minutos para la desactivación de las enzimas de restricción. Ambos se mezclaron, y se añadieron a los mismos 1  $\mu$ l de disolución tampón 10X de ADN ligasa de T4 y 1 unidad de ADN ligasa de T4 (fabricada por Takara Bio, Inc.). Se añadió agua destilada estéril a lo mismo para que el volumen total fuera de 10  $\mu$ l, y se permitió que la mezcla reaccionara a 15°C durante 3 horas para la ligación. Este se denominó líquido de ligación C.

35 Con el uso del líquido de ligación C, se transformó *Escherichia coli* JM109 por el método de cloruro de calcio (Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)) y se aplicó al medio de agar LB (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,5% y agar al 1,5%) que contenía 50  $\mu$ g/ml de kanamicina.

40 Se sometió una cepa en crecimiento en el medio de cultivo a cultivo líquido de la manera habitual. El ADN de plásmido se extrajo del cultivo y se cortó con el uso de la enzima de restricción para confirmar el fragmento insertado. Como resultado, además de un fragmento de ADN de aproximadamente 4,7 kb del vector de clonación pCRB206, se confirmó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,4 kb de la secuencia de terminador.

45 El vector de clonación que comprende la secuencia de terminador rrnBT1T2 se denominó pCRB207.

### 50 Construcción del vector de clonación pCRB209

Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de promotor del gen de gapA (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa A) (más adelante en el presente documento abreviado como PGaPA) derivada de *Corynebacterium glutamicum* R se amplificó por el siguiente método.

55 En la PCR, se sintetizó el siguiente conjunto de cebadores basados en SEQ ID NO: 13 (PCRb207) para la clonación de la secuencia de pCRB207, y se utilizó.

Cebadores para la amplificación de la secuencia de PCRb207

(a-5); 5'-CTCT CATATG CTGTTTTGGCGGATGAGAG-3' (SEQ ID NO: 14)

(b-5); 5'-CTCT CATATG GTGTCTCCTCTAAAGATTGTAGG-3' (SEQ ID NO: 15)

5 Los cebadores (a-5) y (b-5) tienen cada uno un sitio de enzima de restricción NdeI añadido a los mismos.

Como ADN de molde, se utilizó el vector de clonación pCRB207 que comprende un promotor de gapA y una secuencia de terminador rrnBT1T2.

10 La PCR real se realizó con el uso de un ciclador térmico, GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems) y TaKara LA Taq (fabricado por Takara SHUZO) como reactivo de reacción en las condiciones descritas a continuación.

Mezcla de reacción:

15	Takara LA Taq™ (5 unidades/μl)	0,5 μl
	Tampón 10X LA PCR™ II (libre de Mg <sup>2+</sup> )	5 μl
	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 μl
	Mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno)	8 μl
	ADN de molde	5 μl (contenido de ADN: 1 μg o menos)
	Los 2 cebadores anteriores*)	0,5 μl cada uno (conc. final: 1μM)
	Agua destilada estéril	25,5 μl

Los componentes anteriores se mezclaron, y 50 μl de la mezcla de reacción se sometieron a PCR.

\*) Para la amplificación de la secuencia de PCRb207, se utilizó una combinación de cebadores (a-5) y (b-5).

Ciclo de PCR:

Etapa de desnaturalización:	94°C, 60 segundos
Etapa de apareamiento:	52°C, 60 segundos
Etapa de extensión:	72°C, 307 segundos

20 Un ciclo que consiste en las 3 etapas anteriores se repitió 30 veces.

Utilizando 10 μl de la mezcla de reacción producida anteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se detectó un fragmento de ADN de aproximadamente 5,1 kb que comprende el vector de clonación pCRB207.

25 10 μl del fragmento de ADN de aproximadamente 5,1 kb que comprende el gen derivado de pCRB207, que se amplificó por la PCR anterior, se cortó con el uso de la enzima de restricción NdeI y se procesó a 70°C durante 10 minutos para la desactivación de la enzima de restricción. A esto, se le añadieron 1 μl de disolución tampón 10X de ADN ligasa de T4 y 1 unidad de ADN ligasa de T4 (fabricada por Takara SHUZO). Se añadió agua destilada estéril a lo mismo para que el volumen total fuera de 10 μl, y se permitió que la mezcla reaccionara a 15°C durante 3 horas para la ligación.

30 Esto se denominó líquido de ligación D.

Con el uso del líquido de ligación D, se transformó *Escherichia coli* JM109 por el método de cloruro de calcio (Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)) y se aplicó al medio de agar LB (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,5% y agar al 1,5%) que contenía 50 μg/ml de kanamicina.

35 Se sometió una cepa en crecimiento en el medio de cultivo al cultivo líquido de la manera habitual. Se extrajo ADN de plásmido del cultivo y se cortó con el uso de la enzima de restricción NdeI para confirmar el sitio de enzima de restricción insertado.

40 El vector de clonación que comprende la secuencia de PgapA y la secuencia de terminador rrnBT1T2 se denominó PCrB209.

(3) Clonación del gen de producción de fenol

45 Clonación del gen de producción fenol derivado de *Pantoea agglomerans*

Un fragmento de ADN que comprende el gen de tpl que se derivó de *Pantoea agglomerans* y que codifica para un gen que tiene actividad tirosina fenol-liasa se amplificó por el método de PCR descrito a continuación.

50 En la PCR, se sintetizó el siguiente conjunto de cebadores basándose en SEQ ID NO: 16 (el gen de tpl de *Pantoea agglomerans*) con el uso de "394 DNA/RNA Synthesizer" fabricado por Applied Biosystems para la clonación del gen de tpl, y se utilizó. Cebadores para amplificación del gen de tpl

(a-6); 5'- CTCT CATATG AACTATCCTGCCGAGC-3' (SEQ ID NO: 17)

(b-6); 5'- CTCT CATATG TTAATAAAGTCAAAACGCGCAGTAAAG-3' (SEQ ID NO: 18)

5 Los cebadores (a-6) y (b-6) tienen cada uno un sitio de enzima de restricción NdeI añadido a los mismos.

Como ADN de molde para *Pantoea agglomerans*, se utilizó el ADN cromosómico extraído de *Pantoea agglomerans* NBRC12686 obtenido del NITE Biological Resource Center (NBRC).

10 La PCR real se realizó con el uso de un ciclador térmico, GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems) y TaKara LA Taq (fabricado por Takara Bio, Inc.) como reactivo de reacción en las condiciones descritas a continuación.

15 Mezcla de reacción:

Takara LA Taq™ (5 unidades/μl)	0,5 μl
Tampón 10X LA PCR™ II (libre de Mg <sup>2+</sup> )	5 μl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 μl
Mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno)	8 μl
ADN de molde	5 μl (contenido de ADN: 1 μg o menos)
Los 2 cebadores anteriores*)	0,5 μl cada uno (conc. final: 1 μM)
Agua destilada estéril	25,5 μl

Los componentes anteriores se mezclaron, y 50 μl de la mezcla de reacción se sometieron a PCR.

\*) Para la amplificación del gen de *tpl* de *Pantoea agglomerans*, se utilizó una combinación de cebadores (a-6) y (b-6).

Ciclo de PCR:

Etapa de desnaturalización:	94°C, 60 segundos
Etapa de apareamiento:	52°C, 60 segundos
Etapa de extensión:	72°C,
Gen de <i>tpl</i> de <i>Pantoea agglomerans</i>	82 segundos

20 Un ciclo que consiste en las 3 etapas anteriores se repitió 30 veces.

Con el uso de 10 μl de la mezcla de reacción producida anteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Como resultado, se detectó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,4 kb del gen de *tpl* de *Pantoea agglomerans*.

25

(4) Construcción del plásmido de expresión del gen de producción de fenol, clonación del gen de producción de fenol en pCRB209

30 10 μl del fragmento de ADN de aproximadamente 1,4 kb que comprende el gen de *tpl* derivado de *Pantoea agglomerans* amplificado por la PCR en el anterior (3) y 2 μl del vector de clonación PCrB209 que comprende el promotor PgapA se cortaron cada uno con el uso de la enzima de restricción NdeI, y se procesaron a 70°C durante 10 minutos para la desactivación de la enzima de restricción. Se mezclaron ambos, y se añadieron a los mismos 1 μl de disolución tampón 10X de ADN ligasa de T4 y 1 unidad de ADN ligasa de T4 (fabricada por Takara Bio, Inc.). Se

35 añadió a lo mismo agua destilada estéril para que el volumen total fuera de 10 μl, y se permitió que la mezcla reaccionara a 15°C durante 3 horas para la ligación. El líquido resultante se denominó líquido de ligación E.

Con el uso del líquido de ligación E obtenido se transformó, *Escherichia coli* JM109 por el método de cloruro de calcio (Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)) y se aplicó al medio de agar LB (polipeptona a 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,5% y agar al 1,5%) que contenía 50 μg/ml de kanamicina.

40

Se sometió una cepa en crecimiento en el medio de cultivo al cultivo líquido de la manera habitual. Se extrajo ADN plásmido del cultivo y se cortó con el uso de la enzima de restricción para confirmar el fragmento insertado. Como resultado, además de un fragmento de ADN de aproximadamente 5,1 kb del plásmido PCrB209, se confirmó un

45 fragmento insertado de aproximadamente 1,4 kb del gen de *tpl* derivado de *Pantoea agglomerans* (líquido de ligación E).

El plásmido que comprende el gen de *tpl* derivado de *Pantoea agglomerans* se denominó pCRB209-*tpl*/PA (figura 1).

(5) Construcción de plásmido para la alteración génica cromosómica de *Corynebacterium glutamicum*

Construcción de plásmido para la alteración del gen de *poxF* de *Corynebacterium glutamicum*

5 Un fragmento de ADN requerido para la construcción de un plásmido para la alteración sin marcadores del gen de *poxF* en el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum* se amplificó por el método de PCR tal como se describe a continuación.

10 En la PCR, se sintetizaron los siguientes conjuntos de cebadores basados en la secuencia de *Corynebacterium glutamicum* R con el uso de "394 DNA/ARN Synthesizer" fabricado por Applied Biosystems, y se utilizaron.

Cebadores para amplificación de la región *poxF*-1

15 (a-7); 5'-CTCT TCTAGA TACGTCCTAACACCCGAC-3' (SEQ ID NO: 19)

(b-7); 5'-GACCAACCATTGCTGACTTGCATCCATAGTCAGGCTTC-3' (SEQ ID NO: 20)

El cebador (a-7) tiene un sitio de enzima de restricción XbaI añadido al mismo.

20 Cebadores para amplificación de la región *poxF*-2

(a-8); 5'-AAGTCAGCAATGGTTGGTC-3' (SEQ ID NO: 21)

25 (b-8); 5'-CTCT TCTAGA TGATCAGTACCAAGGGTGAG-3' (SEQ ID NO: 22)

El cebador (b-8) tiene un sitio de enzima de restricción XbaI añadido al mismo.

Como ADN de molde se utilizó el ADN cromosómico extraído de *Corynebacterium glutamicum* R.

30 La PCR real se realizó con el uso de un ciclador térmico, GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems) y TaKara LA Taq (fabricado por Takara Bio, Inc.) como reactivo de reacción en las condiciones descritas a continuación.

Mezcla de reacción:

35	Takara LA Taq™ (5 unidades/μl)	0,5 μl
	Tampón 10X LA PCR™ II (libre de Mg <sup>2+</sup> )	5 μl
	MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 μl
	Mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno)	8 μl
	ADN de molde	5 μl (contenido de ADN: 1 μg o menos)
	Los 2 cebadores anteriores*)	0,5 μl cada uno (conc. final: 1 μM)
	Agua destilada estéril	25,5 μl

Los componentes anteriores se mezclaron, y 50 μl de la mezcla de reacción se sometieron a PCR.

\*) Para la amplificación de la región *poxF*-1, se utilizó una combinación de cebadores (a-7) y (b-7), y para la amplificación de la región *poxF*-2, una combinación de cebadores (a-8) y (b-8).

Ciclo de PCR:

Etapa de desnaturalización:	94°C, 60 segundos
Etapa de apareamiento:	52°C, 60 segundos
Etapa de extensión:	72°C,
Región <i>poxF</i> -1	50 segundos
Región <i>poxF</i> -2	50 segundos

40 Un ciclo que consiste en las 3 etapas anteriores se repitió 30 veces.

Utilizando 10 μl de la mezcla de reacción producida anteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Alrededor de 0. Se detectó un fragmento de ADN de aproximadamente 0,8 kb en el caso de la región *poxF*-1 de *Corynebacterium glutamicum*, y un fragmento de ADN de aproximadamente 0,8 kb en el caso de la región *poxF*-2.

45 Posteriormente, 1 μl de cada uno del fragmento de la región *poxF*-1 y el fragmento de la región *poxF*-2, los cuales se amplificaron por la PCR anterior, se mezclaron y se sometieron a PCR para ligación.

## ES 2 754 080 T3

La PCR real se realizó con el uso de un ciclador térmico, GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems) y TaKara LA Taq (fabricado por Takara Bio, Inc.) como reactivo de reacción en las condiciones descritas a continuación.

### 5 Mezcla de reacción:

Takara LA Taq™ (5 unidades/μl)	0,5 μl
Tampón 10X LA PCR™ II (libre de Mg <sup>2+</sup> )	5 μl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 μl
Mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno)	8 μl
Los 2 cebadores anteriores*)	1 μl cada uno
Agua destilada estéril	29,5 μl

Los componentes anteriores se mezclaron, y 50 μl de la mezcla de reacción se sometieron a PCR.

\*) Se utilizaron un fragmento de la región *poxF-1* y un fragmento de la región *poxF-2*.

### Ciclo de PCR:

Etapas de desnaturalización:	95°C, 20 segundos
Etapas de apareamiento:	52°C, 5 segundos
Etapas de extensión:	72°C, 50 segundos

10

Un ciclo que consiste en las 3 etapas anteriores se repitió 30 veces.

Además, utilizando, como ADN de molde, el fragmento obtenido en el que se ligaron *poxF-1* y *poxF-2*, se amplificó por PCR un fragmento de delección de *poxF*.

15

La PCR real se realizó con el uso de un ciclador térmico, GeneAmp PCR System 9700 (fabricado por Applied Biosystems) y TaKara LA Taq (fabricado por Takara Bio, Inc.) como reactivo de reacción en las condiciones descritas a continuación.

### 20 Mezcla de reacción:

Takara LA Taq™ (5 unidades/μl)	0,5 μl
Tampón 10X LA PCR™ II (libre de Mg <sup>2+</sup> )	5 μl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	5 μl
Mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno)	8 μl
ADN de molde	5 μl (contenido de ADN: 1 μg o menos)
Los 2 cebadores anteriores*)	0,5 μl cada uno (conc. final: 1 μM)
Agua destilada estéril	25,5 μl

Los componentes anteriores se mezclaron, y 50 μl de la mezcla de reacción se sometieron a PCR.

\*) Para la amplificación del fragmento de delección de *poxF*, se utilizó una combinación de cebadores (a-7) y (b-8).

### Ciclo de PCR:

Etapas de desnaturalización:	95°C, 20 segundos
Etapas de apareamiento:	52°C, 5 segundos
Etapas de extensión:	72°C, 50 segundos

25

Un ciclo que consiste en las 3 etapas anteriores se repitió 30 veces.

Utilizando 10 μl de la mezcla de reacción producida anteriormente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y se detectó un fragmento de aproximadamente 1,6 kb del fragmento de delección de *poxF*.

30

10 μl del fragmento de ADN de aproximadamente 1,7-kb del fragmento de delección de *poxF* derivado de *Corynebacterium glutamicum* R, que se amplificó por la PCR anterior, y 2 μl de un plásmido PCRA725 de aproximadamente 4,4 kb para transfección de genes cromosómicos sin marcadores (J. Mol. Microbiol. Biotechnol., vol. 8, 243-254, 2004 (documento JP 2006-124440 A) se cortaron cada uno con el uso de la enzima de restricción XbaI, y se procesaron a 70°C durante 10 minutos para la desactivación de la enzima de restricción. Se mezclaron ambos, y se añadieron a los mismos 1 μl de disolución tampón 10X de ADN ligasa de T4 y 1 unidad de ADN ligasa de T4 (fabricada por Takara Bio, Inc.). Se añadió agua destilada estéril a lo mismo para que el volumen total fuera de 10 μl, y se permitió que la mezcla reaccionara a 15°C durante 3 horas para la ligación. Esto se denominó líquido de ligación F.

35

Con el uso del líquido de ligación F, se transformó *Escherichia coli* JM109 por el método de cloruro de calcio (Journal of Molecular Biology, 53, 159 (1970)) y se aplicó al medio de agar LB (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 0,5% y agar al 1,5%) que contenía 50 µg/ml de kanamicina.

Se sometió una cepa de crecimiento en el medio de cultivo al cultivo líquido de la manera habitual. Se extrajo ADN de plásmido del cultivo y se cortó con el uso de la enzima de restricción XbaI para confirmar el fragmento insertado. Como resultado, además de un fragmento de ADN de aproximadamente 4,4 kb del plásmido PCra725, se confirmó un fragmento insertado de aproximadamente 1,7 kb del gen de delección de *poxF* derivado de *Corynebacterium glutamicum* (líquido de ligación F).

El plásmido que comprende el gen de delección de *poxF* derivado de *Corynebacterium glutamicum* se denominó PCRA725-*poxF*/CG.

#### (6) Construcción de cepa en la que se altera un gen asociado con la degradación del fenol

El vector PCRA725 para la transfección de genes cromosómicos sin marcadores es un plásmido que no puede replicarse dentro de *Corynebacterium glutamicum* R. Con el uso del plásmido PCRA725-*poxF*/CG, se realizó la transformación de *Corynebacterium glutamicum* R por electroporación (Agric. Biol. Chem., vol. 54, 443-447 (1990) y Res. Microbiol., vol. 144, 181-185 (1993)), y la cepa se aplicó al medio de agar A (medio líquido A y agar al 1,5%) que contenía 50 µg/ml de kanamicina. La cepa de cruzamiento individual obtenida en el medio anterior se aplicó al medio de agar BT (2 g de (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO, 7 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 ml de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0,06% (p/v) + MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O al 0,042% (p/v), 1 ml de disolución de biotina al 0,02% (p/v), 2 ml de disolución de tiamina disuelta en 1 l de agua destilada y agar al 1,5%) que contenía sacarosa al 10% (p/v).

En el caso de una cepa que tiene un único cruzamiento del plásmido PCRA725-*poxF*/CG con la región homóloga en el cromosoma, la cepa muestra resistencia a kanamicina resultante de la expresión del gen de resistencia a kanamicina en el PCRA725-*poxF*/CG y la mortalidad en un medio de cultivo que contiene sacarosa resultante de la expresión del gen de *sacR-sacB* de *Bacillus subtilis*. En el caso de una cepa que tiene un cruzamiento doble del plásmido PCRA725-*poxF*/CG, la cepa muestra sensibilidad a la kanamicina resultante de la pérdida del gen de resistencia a la kanamicina en el PCRA725-*poxF* /CG y la capacidad de crecimiento en un medio de cultivo que contiene sacarosa resultante de la pérdida del gen de *sacR-sacB*. La alteración de genes cromosómicos sin marcadores muestra sensibilidad a la kanamicina y capacidad de crecimiento en un medio de cultivo que contiene sacarosa. Se seleccionó, por tanto, una cepa que mostró sensibilidad a la kanamicina y capacidad de crecimiento en un medio de cultivo que contenía sacarosa.

El alterador del gen de *poxF* sin marcadores obtenido de *Corynebacterium glutamicum* R se denominó *Corynebacterium glutamicum* Δ*poxF*.

#### (7) Construcción de cepa transgénica para gen de producción de fenol

Con el uso del plásmido descrito anteriormente pCRB209-*tpl*/PA, se realizó la transformación de *Corynebacterium glutamicum* Δ*PoxF* por electroporación (Agric. Biol. Chem., vol. 54, 443 a 447 (1990) y Res. Microbiol., vol. 144, 181-185 (1993)), y la cepa se aplicó al medio de agar A que contenía 50 µg/ml de kanamicina.

Se sometió una cepa en crecimiento en el medio de cultivo al cultivo líquido de la manera habitual. Se extrajo ADN de plásmido del cultivo y se cortó con el uso de la enzima de restricción para confirmar el plásmido insertado. Como resultado, se confirmó la transfección del plásmido anteriormente construido pCRB209-*tpl*/PA.

La cepa obtenida se denominó *Corynebacterium glutamicum* PHE31.

*Corynebacterium glutamicum* PHE31 se depositó en el Incorporated Administrative Agency National Institute of Technology and Evaluation, NITE Patent Microorganisms Depository (2-5-8 Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818 Japón) con el número de registro NITE BP-999 el 2 de noviembre de 2010.

#### Ejemplo 2

Experimento de producción de fenol utilizando la cepa transgénica con gen de producción de fenol de *Corynebacterium glutamicum* y el alterador de la ruta de formación de subproductos de *Corynebacterium glutamicum*

El *Corynebacterium glutamicum* PHE31 (el alterador de gen de *poxF* cromosómico sin marcadores transfectado con el plásmido de expresión de gen de producción de fenol pCRB209-*tpl*/PA) preparado en el ejemplo 1 se aplicó al medio de agar A (se suspendieron 2 g de (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO, 7 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 ml de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0,06% (p/v) + MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O al 0,042% (p/v), 1 ml de disolución de biotina al 0,02% (p/v), 2 ml de disolución de tiamina al 0,01% (p/v), 2 g de extracto de levadura, 7 g de casaminoácido de ensayo

de vitaminas, 40 g de glucosa y 15 g de agar en 1 l de agua destilada) que contenía kanamicina, y se dejó reposar en la oscuridad a 28°C durante 20 horas.

5 Se inoculó un asa de inoculación del *Corynebacterium glutamicum* PHE31 hecho crecer en una placa como anteriormente en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de medio líquido A que contenía 50 µg/ml de kanamicina, y se cultivó de manera aerobia con agitación a 28°C durante 15 horas.

10 El *Corynebacterium glutamicum* PHE31 hecho crecer en las condiciones anteriores se inoculó en un matraz cónico de 2 L que contenía 500 ml de medio líquido A que contenía 50 µg/ml de kanamicina, y se cultivó de manera aerobia con agitación a 28°C durante 15 horas.

15 Las células bacterianas cultivadas y proliferadas como anteriormente se recogieron por centrifugación (5.000Xg a 4°C durante 15 minutos). Las células bacterianas obtenidas se suspendieron en 50 ml de medio líquido BT (-urea) (sulfato de amonio al 0,7%, dihidrogenofosfato de potasio al 0,05%, hidrogenofosfato de dipotasio al 0,05%, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,05%, sulfato de hierro heptahidratado al 0,0006%, sulfato de manganeso hidratado al 0,00042%, biotina al 0,00002% y clorhidrato de tiamina al 0,00002%) por lo que la concentración final de la célula bacteriana fue del 10%. A una botella de medio de 100 ml se transfirió la suspensión celular, se añadió sal disódica de L-tirosina como sustrato y se permitió que la reacción procediera en condiciones reductoras (el ORP de la mezcla de reacción: -450 mV) en un baño de agua mantenido a 33°C con agitación. En cuanto a la adición de sal disódica de L-tirosina, se añadió sal disódica de L-tirosina 40 mM a las 0, 1, 3 y 10 horas después del inicio de la reacción.

20 Se centrifugó una muestra de la mezcla de reacción (15.000Xg a 4°C durante 10 minutos) y se utilizó el sobrenadante obtenido para la determinación cuantitativa de fenol.

25 Como resultado, en la reacción en condiciones reductoras, *Corynebacterium glutamicum* PHE31 había producido 34 mM de fenol en 24 horas.

### Ejemplo 3

30 Prueba de idoneidad como huésped para la producción de fenol, influencia del fenol sobre la proliferación aerobia

35 Se realizó una prueba de inhibición del crecimiento en cultivo aerobio para examinar la influencia del fenol sobre *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*. Se notifica que *Pseudomonas putida* S12, que se utilizó para la prueba, es una cepa resistente a los disolventes. En el informe, se da a conocer una tecnología sin precedentes que usa la cepa como huésped en la producción de fenol.

40 Se aplicó *Corynebacterium glutamicum* R al medio de agar A (se suspendieron 2 g de (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO, 7 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 ml de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0,06% (p/v) + MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O al 0,042% (p/v), 1 ml de disolución de biotina al 0,02% (p/v), 2 ml de solución de tiamina al 0,01% (p/v), 2 g de extracto de levadura, 7 g de casaminoácido de ensayo de vitaminas, 40 g de glucosa y 15 g de agar en 1 l de agua destilada) y se dejó reposar en la oscuridad a 33°C durante 15 horas.

45 Se inoculó un asa de inoculación de *Corynebacterium glutamicum* R hecho crecer en una placa como anteriormente en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de medio líquido A (se suspendieron 2 g de (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO, 7 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 ml de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 0,06% (p/v) + MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O al 0,042% (p/v), 1 ml de disolución de biotina al 0,02% (p/v), 2 ml de disolución de tiamina al 0,01% (p/v), 2 g de extracto de levadura, 7 g de casaminoácido de ensayo de vitaminas y 40 g de glucosa en 1 l de agua destilada) y se cultivó de manera aerobia con agitación a 33°C durante 13 horas.

50 El *Corynebacterium glutamicum* R hecho crecer en las condiciones anteriores se inoculó en 100 ml de medio líquido A de tal manera que la concentración inicial de células bacterianas fuera DO<sub>610</sub>=0,05, se añadió fenol al mismo tiempo de tal manera que la concentración final fuera de 0, 0,16, 0,2, 0,24 o 0,32 mM, y se realizó cultivo aerobio con agitación a 33°C. El crecimiento de células bacterianas se determinó mediante la medición de absorbancia a DO<sub>610</sub>.

55 Se aplicó *Escherichia coli* JM109 al medio de agar LB (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 0,5% y agar al 1,5%) y se dejó reposar en la oscuridad a 37°C durante 15 horas.

60 Se inoculó un asa de inoculación de *Escherichia coli* JM109 hecho crecer en una placa como anteriormente en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de medio líquido LB (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 0,5%), y se realizó cultivo aerobio con agitación a 37°C durante 13 horas.

65 La *Escherichia coli* JM109 hecha crecer en las condiciones anteriores se inoculó en 100 ml de medio líquido LB de tal manera que la concentración inicial de células bacterianas fuera DO<sub>610</sub>=0,05, se añadió fenol al mismo tiempo de tal manera que la concentración final fuera de 0, 0,16 o 0,20 mM, y se realizó cultivo aerobio con agitación a 37°C. El crecimiento de las células bacterianas se determinó mediante la medición de absorbancia a DO<sub>610</sub>.

Se aplicaron *Pseudomonas putida* F1 y S12 al medio de agar LB (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 0,5% y agar al 1,5%) y se dejaron reposar en la oscuridad a 30°C durante 15 horas.

5 Se inoculó un asa de inoculación de cada una de las *Pseudomonas putida* F1 y S12 hechas crecer en una placa como anteriormente en un tubo de ensayo que contenía 10 ml de medio líquido LB (+glucosa) (polipeptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 0,5% y glucosa al 0,4%) y se realizó cultivo aerobio con agitación a 30°C durante 13 horas.

10 Las *Pseudomonas putida* F1 y S12 hechas crecer en las condiciones anteriores se inocularon cada una en 100 ml de medio líquido LB (+glucosa) de tal manera que la concentración inicial de células bacterianas fuera  $DO_{610}=0,05$ , se añadió fenol al mismo tiempo de tal manera que la concentración final fuera de 0, 0,10 o 0,20 mM, y se realizó cultivo aerobio con agitación a 30°C. El crecimiento de las células bacterianas se determinó mediante la medición de absorbancia a  $DO_{610}$ . La figura 2 muestra los resultados del análisis de la influencia de la adición de fenol sobre la proliferación aerobia.

15 La proliferación de *Escherichia coli* se vio afectada significativamente por fenol al 0,16% y completamente inhibida por fenol al 0,20%.

20 *Pseudomonas putida* F1 y *Pseudomonas putida* S12, que se notificó como una cepa resistente a disolventes, mostraron una tendencia similar, y la proliferación de las mismas se vio afectada significativamente por fenol al 0,10% y completamente inhibida por fenol al 0,20%.

25 Por el contrario, la proliferación de *Corynebacterium glutamicum* apenas se vio afectada por fenol al 0,16%, que afectó significativamente a la proliferación de *Escherichia coli*. Incluso en presencia de fenol al 0,20%, que inhibió completamente la proliferación de *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*, *Corynebacterium glutamicum* mostró un crecimiento favorable. Además, *Corynebacterium glutamicum* fue capaz de proliferar en presencia de fenol al 0,24%.

30 Por tanto, se mostró que *Corynebacterium glutamicum* tiene una mayor resistencia al fenol en comparación con *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*, y es altamente adecuado como huésped en la producción de fenol.

### Aplicabilidad industrial

Según el procedimiento de la presente invención, puede producirse fenol a partir de tirosina con una eficiencia práctica usando microorganismos.

35

### Lista de secuencias

<110> Green Fenol Technology Research Association

40 <120> Transformante del grupo corineforme de bacterias y método de producción de fenol usando los mismos

<130> C01F3971

<150> Documento JP2010-258089

45 <151> 18-11-2010

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.1

50

<210> 1

<211> 1195

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223>pCASE1-ori

<400> 1

60

ES 2 754 080 T3

atgaaaaccg accgtgcacg ctcgtgtgag aaagtcagct acatgagacc aactacccgc 60  
 cctgagggac gctttgagca gctgtggctg ccgctgtggc cattggcaag cgatgacctc 120  
 cgtgagggca tttaccgcac ctcacggaag aacgcgctgg ataagcgcta cgtcgaagcc 180  
 aatcccgcag cgctctctaa cctcctggtc gttgacatcg accaggagga cgcgcttttg 240  
 cgctctttgt gggacagggg ggactggaga cctaacgcgg tggttgaaaa ccccttaaac 300  
 gggcacgcac acgctgtctg ggcgctcgcg gagccattta cccgcaccga atacgcaaaa 360  
 cgcaagcctt tggcctatgc cgcggctgtc accgaaggcc tacggcgctc tgtc gatggc 420  
 gatagcggat actccgggct gatcaccaaa aaccccgcgc aactgcatg ggatagtcac 480  
 tggatcaccg ataagctgta tacgctcgat gagctgcgct tttggctcga agaaaccggc 540  
 tttatgccgc ctgctcctg gaggaaaacg cggcggttct cgccagttgg tctaggtcgt 600  
 aattgcgcac tctttgaaag cgcacgtacg tgggcatatc gggaggtcag aaagcatttt 660  
 ggagacgctg acggcctagg ccgcgcaatc caaaccaccg cgcaagcact taaccaagag 720  
 ctgtttgatg aaccactacc tgtggccgaa gttgactgta ttgccaggtc aatccataaa 780  
 tggatcatca ccaagtcacg catgtggaca gacggcgcgc ccgtctacga cgccacattc 840  
 accgcaatgc aatccgcacg cgggaagaaa ggctggcaac gaagcgcctga ggtgcgtcgt 900  
 gaggctggac atactctttg gaggaacatt ggctaagggtt tatgcacggt atccacgcaa 960  
 cggaaaaaca gcccgcgagc tggcagaacg tgccggtatg tcggtgagaa cagctcaacg 1020  
 atggacttcc gaaccgcgtg aagtgttcat taaacgtgcc aacgagaagc gtgctcgcgt 1080  
 ccaggagctg cgcgccaaag gtctgtccat gcgcgctatc gcggcagaga ttggttgctc 1140  
 ggtgggcacg gttcaccgct acgtcaaaga agttgaagag aagaaaaccg cgtaa 1195

5 <210> 2  
 <211> 2675  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> pHSG298  
 <400> 2

ES 2 754 080 T3

gaggtctgcc tcgtgaagaa ggtggtgctg actcatacca ggcctgaatc gccccatcat 60  
ccagccagaa agtgagggag ccacggttga tgagagcttt gttgtaggtg gaccagttgg 120  
tgattttgaa cttttgcttt gccacggaac ggtctgcggt gtcgggaaga tgcgtgatct 180  
gatccttcaa ctcagcaaaa gttcgattta ttcaacaaag ccacgttgtg tctcaaaatc 240  
tctgatgtta cattgcacaa gataaaaata tatcatcatg aacaataaaa ctgtctgctt 300  
acataaacag taatacaagg ggtggtatga gccatattca acgggaaacg tcttgctcga 360  
agccgcgatt aaattccaac atggatgctg atttatatgg gtataaatgg gctcgcgata 420  
atgtcgggca atcaggtgcg acaatctatc gattgtatgg gaagcccgat gcgccagagt 480  
tgtttctgaa acatggcaaa ggtagcgttg ccaatgatgt tacagatgag atggtcagac 540  
taaactggct gacggaatth atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc cgtactcctg 600  
atgatgcatg gttactcacc actgcgatcc ccgggaaaac agcattccag gtattagaag 660  
aatatcctga ttcaggtgaa aatattggtg atgcgctggc agtggtcctg cgccggttgc 720  
atcagattcc tgtttgtaat tgtcctttta acagcgatcg cgtatttcgt ctcgctcagg 780  
cgcaatcacg aatgaataac ggtttggttg atgcgagtga ttttgatgac gagcgtaatg 840  
gctggcctgt tgaacaagtc tggaaagaaa tgcataagct tttgccattc tcaccggatt 900  
cagtcgtcac tcatggtgat ttctcacttg ataaccttat ttttgacgag gggaaattaa 960  
taggttgat tgatggtgga cgagtcggaa tcgcagaccg ataccaggat cttgccatcc 1020  
tatggaactg cctcggtgag ttttctcctt cattacagaa acggcttttt caaaaatag 1080  
gtattgataa tcctgatatg aataaattgc agtttcattt gatgctcgat gagtttttct 1140  
aatcagaatt ggttaattgg ttgtaacact ggcagagcat tacgctgact tgacgggacg 1200  
gcggtttgt tgaataaatc gcattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg ggaagggcga 1260  
tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaaag ggggatgtgc tgcaaggcga 1320  
ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacggt gtaaaacgac ggccagtgcc 1380  
aagcttgcac gcctgcaggt cgactctaga ggatccccgg gtaccgagct cgaattcgta 1440  
atcatgtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata 1500  
cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta 1560

ES 2 754 080 T3

attgcggttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgctcgtgcc gctgcattaa 1620  
 tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg gcgaactttt gctgagttga 1680  
 aggatcagat cacgcatctt cccgacaacg cagaccgttc cgtggcaaag caaaagttca 1740  
 aatcagtaa ccgtcagtgc cgataagttc aaagttaaac ctggtgttga taccaacatt 1800  
 gaaacgctga tcgaaaacgc gctgaaaaac gctgctgaat gtgcgagctt cttccgcttc 1860  
 ctcgctcact gactcgctgc gctcggctcg tccgctgcgg cgagcggat cagctcactc 1920  
 aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc 1980  
 aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag 2040  
 gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc 2100  
 gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt 2160  
 tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 2220  
 ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcggttcgct ccaagctggg 2280  
 ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagccoga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct 2340  
 tgagtccaac ccggttaagac acgacttate gccactggca gcagccactg gtaacaggat 2400  
 tagcagagcg aggtatgtag gcgggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg 2460  
 ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa 2520  
 aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgt 2580  
 ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 2640  
 tacggggtct gacgctcagt ggaacgatcc gtcga 2675

<210> 3  
 <211> 25  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR

10 <400> 3  
 atagatctag aacgtccgta ggagc 25

<210> 4  
 15 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Cebador de PCR

<400> 4  
 atagatctga cttggttacg atggac 26

25 <210> 5  
 <211> 27

ES 2 754 080 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 5 <223> Cebador de PCR

<400> 5  
 atagatctag gttcccgac tggaaag 27

10 <210> 6  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 6  
 atagatctcg tgccagctgc attaatga 28

20 <210> 7  
 <211> 551  
 <212> ADN  
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

25 <400> 7

ccgaagatct gaagattcct gatacaaatt ctgttgtgac ggaagatttg ttggaagaaa 60

tctagtcgct cgtctcataa aaacgaccga gcctattggg attaccattg aagccagtgt 120

gagttgcatc aactggcctt caaatctgag actttacttt gtggattcac gggggtgtag 180

tgcaattcat aattagcccc attcggggga gcagatcgcg gcgcgaacga tttcagggtc 240

gttccctgca aaaactatct agcgcgaagtg ttggaaatgc ccccgctctgg ggtcaatgtc 300

tatTTTTgaa tgtgTTTgta tgatTTTgaa tccgctgcaa aatctTTgtt tccccgctaa 360

agttggggac aggttgacac ggagttgact cgacgaatta tccaatgtga gtaggTTTgg 420

tgcgtgagtt ggaaaatttc gccatactcg cccttggggtt ctgtcagctc aagaattctt 480

gagtgaccga tgctctgatt gacctaactg cttgacacat tgcatttcct acaatcttta 540

gaggagacac a 551

30 <210> 8  
 <211> 425  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Terminador rrnBT1T2

<400> 8  
 ctgTTTggc ggatgagaga agatttcag cctgatacag ataaatcag aacgcagaag 60

ES 2 754 080 T3

	cggtctgata aacagaatt tgcctggcgg cagtagcgcg gtggtccac ctgacccat	120
	gccgaactca gaagtgaaac gccgtagcgc cgatggtagt gtgggggtctc cccatgcgag	180
	agtagggaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc	240
	gttttatctg ttgtttgtcg gtgaacgctc tcctgagtag gacaaatccg ccgggagcgg	300
	atltgaacgt tgcaagcaa cggcccggag ggtggcgggc aggacgcccg ccataaactg	360
	ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg cttttttgcg tttctacaaa	420
	ctctt	425
5	<210> 9 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 9 ctctgtcgac ccgaagatct gaagattcct g	31
15	<210> 10 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 10 ctctgtcgac ggatcccat ggtgtgtctc ctctaaagat tgtagg	46
25	<210> 11 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador de PCR	
35	<400> 11 ctctgcatgc ccatggctgt tttggcggat gagaga	36
40	<210> 12 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador de PCR	
	<400> 12 ctctgcatgc tcatgaaaga gttttagaa acgcaaaaag g	41
50	<210> 13 <211> 5118 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 754 080 T3

<220>

<223> pCRB207

<400> 13

5

```

agatctaggt ttccccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag      60
ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga      120
attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgaattcgag      180
ctcggtagccc ggggatcctc tagagtcgac ccgaagatct gaagattcct gatacaaatt      240
ctgtttgtgac ggaagatttg ttggaagaaa tctagtcgct cgtctcataa aaacgaccga      300
gcctattggg attaccattg aagccagtgt gagttgcatc aacttggett caaatctgag      360
actttacttt gtggattcac gggggtgtag tgcaattcat aattagcccc attcggggga      420
gcagatcgcg gcgcgaacga tttcaggttc gttccctgca aaaactatth agcgcgaagtg      480
ttggaaatgc ccccgctggt ggtcaatgtc tatttttgaa tgtgtttgta tgattttgaa      540
tccgctgcaa aatctttggt tccccgctaa agttggggac aggttgacac ggagttgact      600
cgacgaatta tccaatgtga gtaggtttgg tgcgtgagtt ggaaaatttc gccatactcg      660
cccttggggt ctgtcagctc aagaattctt gagtgaccga tgctctgatt gacctactg      720
cttgacacat tgcatttcct acaatcttta gaggagacac accatggctg ttttggcgga      780
tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aatcagaac gcagaagcgg tctgataaaa      840
cagaatttgc ctggcggcag tagcgcggtg gtcccacctg accccatgcc gaactcagaa      900
gtgaaacgcc gtagcggcga tggtagtggt gggctctccc atgcgagagt agggaaactgc      960
caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagactgg gcctttcgtt ttatctgttg     1020
tttgtcggtg aacgctctcc tgagtaggac aatccgccg ggagcggatt tgaacgttgc     1080
gaagcaacgg cccggagggt ggcgggcagg acgcccgcca taaactgcca ggcacaaat     1140
taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc tttcatgggg     1200
atccgtcgac ctgcaggcat gcaagcttgg cactggccgt cgttttacia cgtcgtgact     1260
gggaaaaccc tggcgttacc caacttaatc gccttgcagc acatccccct ttcgccagct     1320
ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg     1380
gcgaatgcga tttattcaac aaagccgccg tcccgtcaag tcagcgtaat gctctgccag     1440
tgttacaacc aattaaccaa ttctgattag aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc     1500
aatttattca tatcaggatt atcaatacca tatttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa     1560
ggagaaaact caccgaggca gttccatagg atggcaagat cctggtatcg gtctgcgatt     1620

```

ES 2 754 080 T3

ccgactcgtc caacatcaat acaacctatt aatttcccct cgtcaaaaat aaggttatca 1680  
 agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa tccggtgaga atggcaaaag cttatgcatt 1740  
 tctttccaga cttgttcaac aggccagcca ttacgctcgt catcaaaaatc actcgcacatca 1800  
 accaaaccgt tattcattcg tgattgcgcc tgagcgagac gaaatacgcg atcgcctgta 1860  
 aaaggacaat tacaacacag aatcgaatgc aaccggcgca ggaacactgc cagcgcacatca 1920  
 acaatatttt cacctgaatc aggatattct tctaatacct ggaatgctgt tttcccgggg 1980  
 atcgcagtggt tgagtaacca tgcacatca ggagtacgga taaaatgctt gatggctcga 2040  
 agaggcataa attccgctcag ccagtttagt ctgaccatct catctgtaac atcattggca 2100  
 acgctacctt tgccatgttt cagaaacaac tctggcgcat cgggcttccc atacaatcga 2160  
 tagattgtcg cacctgattg cccgacatta tcgcgagccc atttataccc atataaatca 2220  
 gcatccatgt tggaatttaa tcgcggttc gagcaagacg tttcccgtt gaaatggctc 2280  
 ataacacccc ttgtattact gtttatgtaa gcagacagtt ttattgttca tgatgatata 2340  
 tttttatctt gtgcaatgta acatcagaga ttttgagaca caacgtggct ttgttgaata 2400  
 aatcgaactt ttgctgagtt gaaggatcag atcacgcac tcccgcaca cgcagaccgt 2460  
 tccgtggcaa agcaaaagt caaaatcacc aactggcca cctacaaca agctctcacc 2520  
 aaccgtggct ccctcacttt ctggctggat gatggggcga ttcaggcctg gtatgagtca 2580  
 gcaacacctt cttcacgag cagacctctc gacggagttc cactgagcgt cagaccccgt 2640  
 agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca 2700  
 aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt ttgtttgcc gatcaagagc taccaactct 2760  
 ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc ttctagtgta 2820  
 gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc tcgctctgct 2880  
 aatcctgta ccagtggtct ctgccagtg cgataagtcg tgccttaccg ggttgactc 2940  
 aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggt cgtgcacaca 3000  
 gccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg agctatgaga 3060  
 aagcggcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc gcagggctcg 3120  
 aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt atagtcctgt 3180  
 cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag 3240  
 cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggccttt gctggccttt 3300  
 tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt 3360  
 tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt cagtgagcga 3420  
 ggaagcggaa gaagctcgca cattcagcag cgtttttcag cgcgttttcg atcaacgttt 3480  
 caatgttgg atcaacacca ggtttaactt tgaacttatc ggcactgacg gttactgatt 3540

ES 2 754 080 T3

ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct gcgttgtcgg gaagatgcgt gatctgatcc 3600  
 ttcaactcag caaaagtctg ccaatacgc aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc 3660  
 attaatgcag ctggcacgag atctgacttg gttacgatgg actttgaaca cgccgagggt 3720  
 gactaaaccg ctggatttac gcggttttct tctcttcaac ttctttgacg tagcggtgaa 3780  
 ccgtgcccac cgagcaacca atctctgccg cgatagcgcg catggacaga cctttggcgc 3840  
 gcagctcctg gacgcgagca cgcttctcgt tggcacgttt aatgaacact tcacgcggtt 3900  
 cggaagtcca tcgttgagct gttctcaccg acataccggc acgttctgcc agctcgcggg 3960  
 ctgtttttcc gttgcgtgga taacgtgcat aaaccttagc caatgttctc ccaaagagta 4020  
 tgtccagcct cacgacgcac ctcagcgtt cgttgccagc ctttcttccc gcgtgcggat 4080  
 tgcattgcgg tgaatgtggc gtcgtagacg gcggcgccgt ctgtccacat gcgtgacttg 4140  
 gtgatgatcc atttatggat tgacctggca atacagtcaa cttcggccac aggtagtggg 4200  
 tcatcaaaca gctcttggtt aagtgcttgc gcggtggtt ggattgcgcg gcctaggccg 4260  
 tcagcgtctc caaaatgctt tctgacctcc cgatatgcc acgtacgtgc gctttcaaag 4320  
 agtgcgcaat tacgacctag accaactggc gagaaccgcc gcgttttctc ccaggacgca 4380  
 ggcggcataa agccggtttc ttcgagccaa aagcgcagct catcgagcgt atacagctta 4440  
 tcggtgatcc agtgactatc ccatgcagtg tgctcggggg ttttggatgat cagcccggag 4500  
 tatccgctat cgccatcgac agagcgccgt aggccttcgg tgacagccgc ggcataggcc 4560  
 aaaggcttgc gtttggcgta ttcggtgcgg gtaaattggct ccgcgagcgc ccagacagcg 4620  
 tgtgcgtgcc cgtttaaggg gttttcaacc accgcgttag gtctccagtc ctccctgtcc 4680  
 caciaagagc gcaaaagcgc gtcctcctgg tcgatgtcaa cgaccaggag gttagagagc 4740  
 gcgtcgggat tggcttcgac gtagcgtta tccagcgcgt tcttccgtga ggtgcggtaa 4800  
 atgccctcac ggaggtcatc gcttgccaat ggccacagcg gcagccacag ctgctcaaag 4860  
 cgtccctcag ggcgggtagt tggctctcatg tagctgactt tctcacacga gcgtgcacgg 4920  
 tcggttttca ttcataatac gacatttaac caagtcatg gtttccccgg tttccggggg 4980  
 ttccccgaa gaacccttcc agtgcgagcg aagcgagctc ctttggccgg cgccccctcag 5040  
 gtagccctct aaggctccca gggctccgcc cctccctgag gttggctcaa gcctcctggt 5100  
 ggctcctacg gacgttct 5118

<210> 14  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR

5

10

ES 2 754 080 T3

<400> 14  
ctctcatatg ctgttttggc ggatgagag 29

5 <210> 15  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador de PCR

<400> 15  
ctctcatatg gtgtctctc taaagattgt agg 33

15 <210> 16  
<211> 1371  
<212> ADN  
<213> *Pantoea agglomerans*

20 <400> 16

atgaactatc ctgccgagcc tttccgcatt aaaagtgttg aaaccgtatc aatgatctca 60  
cgcgatgagc gtgttaaaaa aatgcaagaa gcgggctata acacgttttt actgaattca 120  
aaggatatct acatcgatct gctgacagac agcgggtacaa atgccatgag tgacaagcag 180  
tgggcagggga tgatgattgg tgatgaagcc tacgcaggca gtgaaaactt ctaccatctc 240  
gaaaaaacgg tgaagagtt gtttggtttc aaacacatcg ttccaacca ccagggacgc 300  
ggggcggaaa acctgctctc gcagctggcc attaagcccg gtcaatatgt cgcaggaaat 360  
atgtacttta caacaacccg cttccatcag gaaaaaatg gcgcaacctt tgtggatatt 420  
gtccgcgatg aagcacatga cgccagcctg aatctcccct ttaaaggtaa tattgacctg 480  
aataaattag cgacgctcat taaagaaaaa ggcgccgaga acatcgccta tatctgcctt 540  
gcggtcaccg tgaatctggc ggggtgggcag cctgtttcaa tggcgaatat gcgtgccgta 600  
catgaaatgg ccagcacgta tggcattaag atctattacg atgctacccg ttgcgttgaa 660  
aatgcctatt ttatcaaaga gcaggaggcg ggctacgaga acgtcagtat caaagatatc 720  
gtgcatgaaa tgttcagcta tgccgatggg tgcacatga gcggtaaaaa agattgtctg 780  
gtgaatatcg gcggcttctt gtgtatgaac gatgaggaga tgttctcagc ggcaaaagag 840  
ttggttgctg tttatgaagg tatgccgtca tacggcgggc tggccggtcg ggatatggaa 900  
gcaatggcta ttgggctacg tgaagccatg cagtatgaat atattgaaca tcgggtcaaa 960  
caggtgcgct atctgggcga taaactccgt gaagccggcg taccattgt tgaaccgacg 1020  
ggcggacatg cggtatctct tgatgctcgt cgtttctgtc cacacctgac gcaggatcag 1080  
ttccctgcgc agagcctggc agccagcatc tatatggaaa ccggcgtgcg aagtatggaa 1140  
cgtggaattg tttccgcccg tcgtagcaag gaaacggggg agaaccatag ccccaaactg 1200

ES 2 754 080 T3

gagacggtac gtctcactat tccacgccgt gtttacctt acgcgcacat ggatggtatt 1260

gccgatggca tcattaaact gtaccagcat aaagaagata ttcgtggtct gacgtttggt 1320

tacgaaccta aacaacttcg cttctttact gcgcggtttg actttattta a 1371

<210> 17  
 <211> 26  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR

10 <400> 17  
 ctctcatatg aactatcctg ccgagc 26

<210> 18  
 <211> 38  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Cebador de PCR

<400> 18  
 ctctcatatg ttaaataaag tcaaaacgcg cagtaaag 38

<210> 19  
 <211> 29  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 30 <223> Cebador de PCR

<400> 19  
 ctcttctaga tacgtcctaa acacccgac 29

35 <210> 20  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 20  
 45 gaccaacat tgctgacttg cgtatccata gtcaggcttc 40

<210> 21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 21  
 55 caagtcagca atggttggtc 20

<210> 22

ES 2 754 080 T3

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

5 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 22  
 ctcttctaga tgatcagtac caagggtag 30

10 <210> 23  
 <211> 1371  
 <212> ADN  
 <213> *Citrobacter braakii*

15 <400> 23

atgaattatc cggcagaacc cttccgtatt aaaagcgttg aaactgtatc tatgatcccg 60

cgtgatgaac gccttaagaa aatgcaggaa gcgggataca atactttcct gttaaattcg 120

aaagatattt atattgacct gctgacagac agtggcacca acgcaatgag tgacaagcag 180

tgggccggca tgatgatggg tgatgaagcc tacgcgggca gcgaaaactt ctatcatctg 240

gaaagaaccg tgcaggaact gttcggcttt aaacatattg ttcctactca ccaggggagc 300

ggcgcagaaa acctgttatc gcagctggca attaaaccgg ggcaatatgt tgccgggaat 360

atgtatttca ctaccacccg ttatcaccag gaaaaaatg gtgcggtggt tgtcgatatc 420

gttcgtgatg aagcgcacga tgccggtctg aatattgctt ttaaaggtga tatcgatctt 480

aaaaaattac aaaagctgat tgatgaaaaa ggcgccgaga atattgccta tatttgctg 540

gcagtcacgg ttaacctcgc aggcgggag ccggtctcca tggctaacat gcgcgcggtg 600

cgtgaactga ctgcagcaca tggcattaaa gtgttctacg acgctacccg ctgcgtagaa 660

aacgcctact ttatcaaaga gcaagagcag ggctttgaga acaagagcat cgcagagatc 720

gtgcatgaga tgttcagcta cgccgacggt tgtacatga gtggtaaaaa agactgtctg 780

gtgaatatcg gcggttcct gtgcatgaac gatgacgaaa tgttctcttc tgccaaagag 840

ttagtcgttg tttacgaagg tatgccatct tacggcggcc tggccggacg cgacatggaa 900

gccatggcga ttggtctgcg cgaagccatg cagtatgagt acatcgagca ccgcgtgaag 960

caggttcgct atctgggcga caagctgaaa gccgctggtg taccgattgt tgaaccggtg 1020

ggcggtcacg cggatttcct cgatgcgcgt cgcttctgtg agcatctgac gcaggacgag 1080

ttccccggcg aaagcctggc tgccagtatc tatgtggaaa ccggcgtacg tagtatggag 1140

cgcggaatta tctctgcggg ccgtaataac gtgaccggtg aacaccacag gccgaaactg 1200

gaaaccgtgc gtctgactat tccacgccgc gtttatactt acgcgcatat ggatgtggtg 1260

gctgacggta ttattaaact ttaccagcac aaagaagata ttcgcgggct gaagtttatt 1320

20 tacgagccga agcagctccg tttctttact gcacgctttg actatatcta a 1371

ES 2 754 080 T3

<210> 24  
 <211> 1374  
 <212> ADN  
 <213> *Desulfitobacterium hafniense*

5

<400> 24

```

atgaaaacct atcctgcaga accttttaga attaaagtcg tggaaacccgt tcggtcggatg      60
aagcggggcag aacgtgaagc ggccatgaaa gaagcaggct acaacacttt tttgctgaag      120
agtgaggatg tctatattga tctgctcaca gattccggca ctactgccat gagcgataaa      180
caatgggccc gtatgatgat cggtgatgaa gcctatgccg ggagcaggaa tttcctgcac      240
ctggatcggg tggttaaaga atattatggc ttcaagcaca tggtccttac tcatcaagga      300
cggggggcgg aaaacctgct ctcccggctg atgattaaac ccggggatta tgtgcccggc      360
aatatgtatt ttaccaccac aagataccat caggaagcca acggagctac cttcagagat      420
attatcattg atgaagccca tgactcagcc aaccggcatc ctttcaaagg aaatatcgat      480
ctcaggaaac tccagacctt aatcgatgaa gtaggcgcgg agaagattcc ttacatctgc      540
cttgccgtta ctgtcaatct ggccggagga cagcccgttt ctctggaaaa catgaaggcg      600
gtccatgagc ttgccacaaa acacggcatc aagggtgttt ttgacgctac ccgctgtgtg      660
gagaacgctt acttcatcaa gaagcgggaa gcagactacc aggacaagac catcaaagaa      720
attctcttgg agatgatgag ctatgccgac ggagccacca tgtcgggtaa aaaagattgt      780
atgggtcaata tcggcggttt tctggccatg aatgatgatg aattgttcct cagggttaaa      840
gaactggtgg tggctcttga aggaatgcct tcttacggcg gcatggccgg ccgggacatg      900
gaagccatgg ccatcgggat tacggaatcg gtggattatg cttatattga acaccgtgtg      960
gagcaggtgg cctatcttgc cgatcagctt ttagcggcgg gggttcccat tgtggaaccg     1020
gtgggcggcc atgccgtctt ccttgatgcc agacggtttt tgccccacct tgagcaggac     1080
cacttcccgg cacaggctct ggccgccc aa ttatatatag aatccggggg acgctctatg     1140
gaaagaggaa tcatctccgc cggacgtgat cttaaaacag gggaaaaccg ccatcctaaa     1200
ctggagctgg taaggctgac gattccccgc cgggtttata cttacgctca tatggacatc     1260
gtggccagag cggttattga gctttaccag caaagggaga ccatcaaagg gcttaaattt     1320
gtttacgaac cggaaatgct tcgtttcttc accgccagat ttgaacacat ttga           1374
    
```

10

<210> 25  
 <211> 1419  
 <212> ADN  
 <213> *Chloroflexus aurantiacus*

15

<400> 25

ES 2 754 080 T3

atgcaggaac aagactaccc ccgtacaatg gggcaacaat tcggtcggcg gtcgtgggcc 60  
 gagccgtgga agatcaagat ggttgagccg ctgcgcgtga ccagccgggc cgaacgcgag 120  
 gcggcgctga aggctgccgg ttacaacacg tttctgctgc gttctgaaga tgtctatatac 180  
 gatctgctta ccgatagtgg taccaatgcc atgagcgcacc ggcaatgggc agccctgatg 240  
 atgggcgacg aggcatacgc cgggagccgc agtttttatc gcctggaagc aactgtccaa 300  
 caggtgatg gctaccgcca cattattccc acccatcagg ggcggggcgc cgagcatctg 360  
 atcagtcagg tcgctatccg ccgtgggcag tatgttcccg gcaatatgta tttcacaacc 420  
 accgcctgc accaggagct gggcgggtggc atctttgttg atgtgattat tgacgaagcg 480  
 cacgatcccc aaagccagta tccgtttaa ggcaacgtcg atctcgaaa actacaggcg 540  
 ctgattgata aggttggccc gcaacagatt gcctatatca gtctggcccg taccgtcaac 600  
 atggctggtg ggcagccggc cagtatggct aacgtccgtg ccttacgcgc attatgtgat 660  
 cggtagcggg tgccgatctt tctcgattcc acacgcttgg ttgagaatgc ctttttcatc 720  
 aaagaacgtg aaccgggcta tgccgaacaa agaatcgccg cgattgtccg cgagttttgc 780  
 agttacaccg atggcgcatg gatgagcgca aagaaggacg cgctggtgaa catcggtggc 840  
 tggttagcgc tcaacgatga tcaactcgcc gatgaagccc gcaatctggt ggtggtgtac 900  
 gaagggttgc acacctacgg cggcatggcc gggcgtgata tggaggcgct ggcggtcggg 960  
 attgaggagt cgctgcaaga ggattacatc cgtgcccgc tccggtcagg gcgctacctc 1020  
 ggcgaactgc tcctcgactg ggacatcccc atcgtagttc cgattggcgg tcacgcgatc 1080  
 tttctggatg cacgccggtt ctatccgcac ctgccgcaag acctcttccc tgcccagacc 1140  
 ctggccgccc agttgtacct cgattcaggg gtgcgggcta tggaaacgcg tattgccagc 1200  
 gccggacgcg atcccaagac cgggcagaa tactatccca aactggaatt aaccggctg 1260  
 accatcccgc gccgtgttta tactcaggcc cacatggatg ttgtggccga gtcggtgaag 1320  
 gcagtgtacg atcaacgtca tcaggcccgt ggcctgcgga tggcttacga accacggtac 1380  
 ctccgcttct tccaggcccg gtttgaaccg gtggaatga 1419

<210> 26  
 <211> 1404  
 <212> ADN  
 <213> *Nostoc punctiforme*

<400> 26

atgaccgatg ccaagcaaac ttctccgcgc cgccgtcgct cttgggcaga gccatataaa 60  
 attaaggtgg ttgagccatt aaaaattact actcgcgctg aacgcgaaca ggcgatcgca 120  
 caagcggggtt acaatacttt tctactacgt tctgaagatg tctatattga tttgctcact 180

ES 2 754 080 T3

gatagcggca cttcagccat gagcgattat cagtgggcag ggatgatgct gggatgatgaa 240  
gcttatgccg gcagcaaaaa tttttacaat ttagaagcaa gtatccaaaa gtattacggc 300  
tatcgccata ttgtacctac tcaccaaggg cgtgggtgcag aaaatattct ttctcaaata 360  
ctgatcaaac caggagacta catacctggc aatatgtatt tcaccacaac caggttgcat 420  
caggagttag ctggcggcac ttttgtcgat gtgattattg atgaagccca cgatgcccaa 480  
tcaactgcac catttaaggg taatgtagac ttacaaaagc ttacagacct aattgagcga 540  
gttggggcag aacgtattcc ctatattagc gttgccggaa cctggaatat ggctggcggg 600  
cagccgattt ctatggctaa cctgcggggc gtacatcagt tagcccaaac ctacggatc 660  
cgcattattc ttgatgccac ccgcgctgtg gaaaacgctc actttatcca acagcgagag 720  
gaggattatt ccagccaagc gatcgctacc atcttacgcg aattttgctc ctataccgac 780  
ggttgcacca tgagcggtaa gaaggatgca ctggttaaca tcggcggttg gctggctctt 840  
aatgactata atctttacga agaagcacgt aacttaatag taatttatga aggtctacat 900  
acttacggtg gtatggctgg ccgggacatg gaagctatgg cacgaggtat agaagaatca 960  
gttcaagacg atcatattcg tgcccgtgtc ggtcaggttg agtatcttgg acaaaagctt 1020  
ttagattggg gtattccaat tgttgtgccg attggcggtc atgccattta tttagatgcc 1080  
aaacgctttt taccacaaat tcccgaagc caatttccgg cacaacgtct agcagcagaa 1140  
ctgtatctag aggcaggcat tcgggcaatg gaacggggca tcgtttccgc agggcgcaat 1200  
aaagaaacag gcgataatta ttatccagag ttagaattag tccgtttaac tattccacgc 1260  
cgtgtttaca ctcaggctca catggatctg actgctgaag cagttgaaga agtttatcat 1320  
aatcgcgac gcctacgcgg actcaaaatg atttatgagc cgaagtatct ccgtttcttt 1380  
caagcaagat ttgaattgca gtaa 1404

<210> 27

<211> 1380

5 <212> ADN

<213> *Treponema denticola*

<400> 27

atggatatta aaaattatcc tgccggaacct tttagaatta aggttgtaga aactgttaag 60  
atgatcgata aggatcaaag agcaaagggt gccaaagaag ccggttataa taccttcctt 120  
attaattcgg aagatgttta tatcgacctt cttaccgact ccggaacaaa cgccatgagc 180  
gataaacaat gggccggaat gatgatagga gatgaagcct atgccggaag ccgcaacttt 240  
catcacttgg aagaaacggt tcaagagatt ttcggcttta agcatcttgt gccgacctat 300  
caaggccgcg gtgccgaaaa ccttctttca aggatagcca ttaaaccggg tcaatatgta 360  
cccggcaaca tgtattttac cactaccaga taccatcagg aagcaaacgg cggtatcttc 420

10

ES 2 754 080 T3

gtggatatca	taaacgatga	tgctcatgat	gcaggcaaaa	atgttccttt	taaaggcgac	480
atcgacttga	acaagcttga	aaagcttata	aaagaaaagg	gagccgaaaa	tatagcctat	540
gtatgtttgg	ctgttacggt	aaaccttgca	ggcggtcagc	ccgtttctat	gaagaacatg	600
aaggccgtcc	gtgagcttac	aaaaaagcac	ggcatcaagg	tattctacga	tgcaacccgc	660
tgtgtagaaa	acgcctactt	tatcaaagaa	caagaagccg	gttatgccga	caagtctatc	720
aaagaaatcg	taagagaaat	gttcagctat	gcagacggat	gtacatgag	cggtaaaaaa	780
gactgtatcg	taaacatcgg	aggcttcctc	tgtatgaacg	atgaagatct	tttccaagct	840
gcaaaagaat	tcgttgttgt	atgtgaaggt	atgccttcat	acggcgggat	ggcaggacgc	900
gatatggaag	ctatggctat	cggtctaaaa	gaagctctcc	agtttgaata	catcgaacac	960
cgaatcaagc	aggtccgcta	tttaggcgac	aagctcttgg	aagccggagt	tcctattatt	1020
gagcccgtag	gaggacatgc	agtatttctt	gatgcaagac	gcttctgtcc	tcactttaag	1080
caaaccgaat	ttcccgcaca	ggccctagcc	gcagagcttt	atatcgaatc	gggagttaga	1140
agtatggaac	gcggtatcgt	ttctgcagga	cgcgatccca	aaacaaggga	aaaccacgta	1200
ccaagcttg	aaacagtccg	cttaacaatt	ccgcgccgtg	tttatacata	taaacacatg	1260
gacattgtag	cagatgccgt	tattaaattg	tacaaacaca	aggaagtat	aaaaggatta	1320
aagttcgttt	acgaacctaa	acaactccgc	ttctttacgg	cacgctttga	gcatatctaa	1380

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir fenol, que comprende una etapa de permitir que un transformante productor de fenol de *Corynebacterium glutamicum* que comprende un gen que codifica para una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa reaccione en una mezcla de reacción que contiene tirosina, una sal de la misma o un éster de la misma en condiciones reductoras, y una etapa de recoger fenol de la mezcla de reacción, con la condición de que se excluya el caso en el que se utiliza una mezcla de reacción que contiene un sacárido como fuente de carbono.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el gen que codifica para una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa es un gen de *Pantoea agglomerans*, un gen de *Citrobacter braakii*, un gen de *Desulfitobacterium hafniense*, un gen de *Chloroflexus aurantiacus*, un gen de *Nostoc punctiforme* o un gen de *Treponema denticola*.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el gen que codifica para una enzima que tiene actividad tirosina fenol-liasa es el ADN de los siguientes (a) o (b):
  - (a) un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 16, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 23, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 24, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 25, un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 26 o un ADN que consiste en la secuencia de bases de SEQ ID NO: 27;
  - (b) un ADN que se hibrida con un ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria de cualquiera de los ADN de (a) en condiciones rigurosas y que codifica para un polipéptido que tiene actividad tirosina fenol-liasa.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el *Corynebacterium glutamicum* es un *Corynebacterium glutamicum* en el que se altera o deleciona un gen que codifica para una enzima que tiene actividad fenol 2-monooxigenasa en el cromosoma.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el *Corynebacterium glutamicum* es ATCC13032 o ATCC13869.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el *Corynebacterium glutamicum* es una cepa de ATCC13032 o ATCC13869 en la que se altera o deleciona un gen que codifica para una enzima que tiene actividad fenol 2-monooxigenasa en el cromosoma.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el transformante no prolifera sustancialmente en la etapa de reacción.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el potencial de oxidación-reducción de la mezcla de reacción en condiciones reductoras es de -200 mV a -500 mV.

Fig. 1

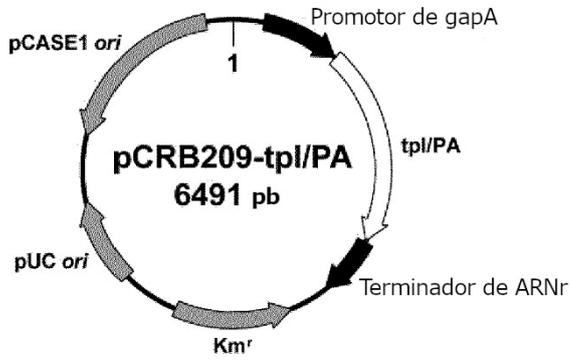


Fig. 2

