



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 281 088**

(51) Int. Cl.:
C12P 13/08 (2006.01)
C07K 14/34 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **96946220 .9**
(86) Fecha de presentación : **18.12.1996**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0868527**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **07.10.1998**

(54) Título: **Procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos mediante un aumento de la actividad de vehículos de exportación.**

(30) Prioridad: **22.12.1995 DE 195 48 222**

(73) Titular/es: **Forschungszentrum Jülich GmbH
52425 Jülich, DE**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

(72) Inventor/es: **Vrlijc, Marina;
Eggeling, Lothar y
Sahm, Hermann**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 281 088 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

Procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos mediante un aumento de la actividad de vehículos de exportación.

La invención se refiere a un procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos según las reivindicaciones 1 a 20, genes de exportación según las reivindicaciones 21 a 26, genes reguladores según la reivindicación 27 y 28, estructuras génicas según las reivindicaciones 29 y 30, vectores según la reivindicación 31 a 33, células transformadas según la reivindicación 34 a 40, proteínas de membrana según la reivindicación 41 y 42 así como a usos según la reivindicación 43 a 48.

Los aminoácidos son de gran interés económico, siendo múltiple el uso de aminoácidos: así se necesita por ejemplo L-lisina, tal como también L-treonina, y L-triptófano como aditivo de alimento para animales, L-glutamato como aditivo de condimentos, L-isoleucina y L-tirosina en la industria farmacéutica, L-arginina y L-isoleucina como medicamento, o L-glutamato y L-fenilalanina como sustancia de partida para la síntesis de productos químicos finos.

Un procedimiento preferido para la producción de estos aminoácidos más diversos es la producción biotecnológica por medio de microorganismos; entonces, de esta manera se obtiene directamente la forma ópticamente activa y biológicamente eficaz del aminoácido respectivo, y pueden utilizarse materias primas baratas y simples. Como microorganismos se utilizan por ejemplo *Corynebacterium glutamicum* y sus subespecies relacionadas *flavum* y subespecies *lactofermentum* (Liebl *et al.*, Int J System Bacteriol (1991) 41:255-260) tales como también *Escherichia coli* y bacterias relacionadas.

Estas bacterias producen los aminoácidos pero normalmente sólo en la cantidad necesaria para el crecimiento, de tal modo que no se segrega ni forma ningún aminoácido en exceso. Esto se basa en que la biosíntesis de los aminoácidos en la célula se controla de múltiples maneras. En consecuencia, se conocen ya procedimientos más diversos, para aumentar la formación de producto mediante la interrupción de los mecanismos de control. En el caso de estos procesos se utilizan por ejemplo análogos de aminoácidos, para interrumpir la regulación eficaz de la biosíntesis. Así se describe un procedimiento en el que se usan las cepas de *Corynebacterium*, que son resistentes frente a análogos de L-tirosina y L-fenilalanina (documentos JP 19037/1976 y 39517/1978). También se describen procedimientos en los que se utilizan bacterias resistentes contra análogos de L-lisina o también L-treonina, para superar los mecanismos de control (documento EP 0 205 849 B1, solicitud de patente del RU GB 2 152 509 A).

Además se conocen también microorganismos contruidos mediante técnicas de ADN recombinante, en los que también se suprime la regulación de la biosíntesis, clonándose y expresándose los genes que codifican las enzimas esenciales que ya no pueden inhibirse por retroalimentación. Así se conoce por ejemplo una bacteria recombinante que produce L-lisina con aspartato cinasa resistente a la retroalimentación, codificada en el plásmido (documento EP 0 381 527). Además se describe una bacteria recombinante que produce L-fenilalanina con prenatodeshidrogenasa resistente a la retroalimentación (documento JP 124375/1986, documento EP 0 488 424). Además se consiguieron también rendimientos elevados de aminoácidos mediante la sobreexpresión de genes que no codifican para enzimas sensibles a la retroalimentación de la síntesis de aminoácidos. Así por ejemplo, se mejora la formación de Lisina mediante la síntesis elevada de la dihidropicolinasintasa (documento EP 0 197 335). También se consigue una mejor formación de treonina mediante la síntesis elevada de la treoninadeshidratasa.

Ensayos adicionales para obtener un aumento de la producción de aminoácidos apuntan a una mejor preparación de los metabolitos primarios celulares del metabolismo central. Así se conoce que la sobreexpresión que se consigue mediante técnicas recombinantes de la transcetolasa posibilita una mejor formación de producto de L-triptófano, L-tirosina o L-fenilalanina (documento EP 0 600 463 A2). Además, la reducción de la actividad de fosfoenolpiruvato-carboxilasa en *Corynebacterium* conduce a una mejor formación de aminoácidos aromáticos (documento EP 0 3331 145).

Estos múltiples ensayos para obtener un aumento de la productividad están dirigidos en general a superar entonces la limitación de la síntesis citosólica de los aminoácidos. Pero también, como una limitación adicional, se tiene en cuenta fundamentalmente la exportación de los aminoácidos formados en el interior de la célula en el medio de cultivo. Por tanto, hay planteamientos aislados para mejorar esta exportación y con esto la rentabilidad de la producción de aminoácidos. Así se ha elevado la permeabilidad celular en el caso de *Corynebacterium* mediante, deficiencia de biotina, tratamiento con penicilina o detergente. Sin embargo, estas ayudas para la extracción fueron exitosas exclusivamente en el caso de la producción de glutamato, mientras que no pudo mejorarse la síntesis de otros aminoácidos de esta manera. También se han desarrollado cepas de bacterias en las que la actividad del sistema de secreción se eleva debido a una mutación física o química. De ese modo se obtuvo, por ejemplo, una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que es adecuada especialmente para la producción de L-lisina mediante una mejor actividad de secreción (documento DE 42 03 320).

Todos los ensayos realizados hasta ahora para obtener un aumento de la secreción de aminoácidos formados en el interior de la célula se caracterizan en total porque puede conseguirse un flujo más elevado de aminoácidos debido a los procedimientos escogidos no específicos o no dirigidos solamente por azar. En la solicitud de patente alemana número 195 23279.8-41 se describe únicamente un procedimiento que permite aumentar de manera muy selectiva la secreción de aminoácidos formados en el interior de la célula, aumentando la expresión de los genes que codifican

la importación de aminoácidos. El conocimiento que sirve de base a esta estrategia, que la célula usa proteínas de importación para la exportación de aminoácidos, como también el hecho de que los microorganismos de la naturaleza no forman ni segregan aminoácidos en exceso, sugiere la suposición de que para el transporte de aminoácidos no existen en absoluto proteínas o genes de exportación específicos, sino que los aminoácidos se excretan de la célula a través de otros sistemas de exportación.

Los sistemas de exportación conocidos hasta ahora exportan iones metálicos venenosos, antibióticos tóxicos y toxinas de alto peso molecular. Estos sistemas de exportación están constituidos de manera relativamente compleja: por regla general son proteínas de membrana que participan en la membrana citoplasmática, que sin embargo provocan solamente una reacción parcial de la exportación, de tal modo que, seguramente, son necesarias proteínas auxiliares extracitoplasmáticas, adicionales para el transporte (Dinh, T. *et al.*, A family of extracytoplasmic proteins that allow-transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1994, 176: 3825-3831). Además se sabe que en el caso del sistema de exportación dependiente de sec son esenciales al menos 6 componentes proteicos diferentes para las proteínas extracelulares. Este estado de la técnica sugiere que, de la misma manera los sistemas responsables de la exportación de aminoácidos, pero hasta ahora desconocidos, se componen de varios componentes proteicos, o que varios genes son responsables de la exportación de aminoácidos. Una indicación para esto podrían ser los diversos mutantes defectuosos en la exportación de lisina descritos por Vrljic *et al.* (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027).

Se encontró sorprendentemente ahora, que para la exportación de aminoácidos en cada caso sólo es responsable un único gen específico, de modo que por primera vez se proporciona un procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos en el que se aumenta de manera controlada la expresión del gen de exportación y/o la actividad del vehículo de exportación de un microorganismo que produce los correspondientes aminoácidos. El aumento de la actividad o expresión, del vehículo de exportación que resulta de este modo de procedimiento conduce a una tasa de secreción elevada, de modo que se aumenta la exportación del correspondiente aminoácido. Los microorganismos modificados de tal modo acumulan también un porcentaje elevado del correspondiente aminoácido en el medio de cultivo.

Para obtener un aumento de la actividad del vehículo de exportación se aumenta especialmente la actividad endógena de un microorganismo que produce aminoácidos. Por ejemplo, puede conseguirse un aumento de la actividad enzimática, efectuando una conversión del sustrato más elevada mediante la modificación del centro catalítico o suprimiendo la acción de los inhibidores enzimáticos. También puede provocarse una actividad enzimática mediante el aumento de la síntesis enzimática, por ejemplo mediante amplificaciones génicas o mediante la interrupción de factores que reprimen la biosíntesis enzimática. La actividad endógena del vehículo de exportación se aumenta mediante una mutación del gen de exportación endógeno. Las mutaciones de este tipo pueden producirse o bien de manera no dirigida según procedimientos clásicos, tales como por ejemplo mediante radiación UV o sustancias químicas desencadenantes de mutaciones, o bien de manera controlada por medio de procedimientos de tecnología de genes tales como delección (delecciones), inserción (inserciones) y/o intercambio(s) de nucleótidos.

La expresión del gen de exportación se aumenta mediante el aumento del número de copias génicas y/o mediante el refuerzo de los factores reguladores, que influyen de manera positiva en la expresión del gen de exportación. Así puede tener lugar un refuerzo de los elementos reguladores preferiblemente en el plano de la transcripción, aumentándose especialmente las señales de transcripción. Esto puede efectuarse por ejemplo, aumentando la actividad del promotor mediante el cambio de la secuencia promotora intercalada en el gen estructural o intercambiando el promotor completamente por promotores más eficaces. También puede llevarse a cabo un refuerzo de la transcripción mediante la influencia correspondiente de un gen regulador asociado al gen de exportación, tal como se expone a continuación de manera adicional. Sin embargo, además es posible el refuerzo de la traducción, mejorándose por ejemplo la estabilidad del ARNm.

Para obtener un aumento del número de copias génicas se incorpora el gen de exportación en un constructo génico o en un vector, preferiblemente en un vector con número de copias más pequeño. El constructo génico contiene especialmente secuencias génicas reguladoras asociadas al gen de exportación, preferiblemente aquellas que refuerzan la expresión génica. Las secuencias génicas reguladoras presentan especialmente una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos indicada en la tabla 1 o sus variaciones de alelo o una secuencia de nucleótidos del nucleótido 954 al 82 según la tabla 2 o una secuencia de ADN fundamentalmente de acción similar. Las variaciones de alelo o las secuencias de ADN de acción similar presentan especialmente derivados funcionales que pueden obtenerse mediante delección (delecciones), inserción (inserciones) y/o sustitución (sustituciones) de nucleótidos a partir de las correspondientes secuencias, conservándose sin embargo la función o actividad de proteína reguladora o incluso elevándose: así, mediante la mutación de la secuencia génica reguladora puede influenciarse la eficacia de la unión de la proteína reguladora sobre el ADN del gen de exportación que ha de regularse, de tal modo que se refuerza la transcripción y por consiguiente se aumenta la expresión génica. Además, pueden estar asignadas al gen de exportación como secuencias reguladoras, pero también como los denominados "potenciadores" ("enhancer"), que producen también una expresión del gen de exportación elevada a través de una mejor interacción entre la ARN polimerasa y el ADN.

Para la incorporación del gen de exportación en el constructo génico se aísla preferiblemente el gen de exportación a partir de una cepa de microorganismos del género *Corynebacterium*, y con el constructo génico que contiene el gen de exportación se transforma una cepa de microorganismos que produce los correspondientes aminoácidos,

especialmente *Corynebacterium*. El aislamiento y transformación del correspondiente gen de transporte tiene lugar según procedimientos habituales: en el caso del aislamiento y clonación de un gen de transporte a partir de *Corynebacterium* es adecuado por ejemplo el procedimiento de la complementación homóloga de un mutante defectuoso de exportación (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Si no es posible la clonación directa del gen estructural, inicialmente puede efectuarse también la inserción de secuencias de vectores en el gen de transporte para aislarlo después a través de "rescate en plásmido" en forma de fragmentos inactivos. Para el procedimiento según la invención son adecuados especialmente genes de *C. glutamicum* ATCC 13032 o *C. glutamicum* subespecie. *flavum* ATCC 14067 o también *C. glutamicum* subespecie *lactofermentum* ATCC 13869. Tras el aislamiento de los genes y su recombinación *in vitro* con vectores conocidos (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684-688; Gene 102 (1991) 93-98), se lleva a cabo la transformación en las cepas que producen aminoácidos mediante electroporación (Liebl *et al.* (1989) FEMS Microbiol Lett 65: 299-304) o conjugación (Schäfer *et al.* (1990) J Bacteriol 172: 1663-1666). Para la transferencia se utilizan preferiblemente vectores con número de copias reducido. Como células huésped se utilizan preferiblemente productores de aminoácidos de este tipo, que están desregulados en la síntesis de los correspondientes aminoácidos y/o que contienen un porcentaje elevado en metabolitos del metabolismo central.

Tras el aislamiento pueden obtenerse genes de exportación con secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos indicada en la tabla 3 o sus variaciones de alelo o que presentan la secuencia de nucleótidos del nucleótido 1016 al 1726 según la tabla 2 o una secuencia de ADN fundamentalmente de acción similar. También en el presente documento las variaciones de alelo o secuencias de ADN de acción similar comprenden especialmente derivadas funcionales en el sentido indicado anteriormente para las secuencias reguladoras. En el procedimiento según la invención se utilizan preferiblemente estos genes de exportación.

Una o varias secuencias de ADN pueden estar intercaladas y/o conectadas al gen de exportación con o sin promotor intercalado o con o sin reguladores asociados, de tal modo que el gen está contenido en una estructura génica.

Mediante la clonación de genes de exportación pueden obtenerse plásmidos o vectores que contienen el gen de exportación y (tal como se mencionó anteriormente) que son adecuados para la transformación de un productor de aminoácidos. Las células que pueden obtenerse mediante transformación, en las que se trata preferiblemente de células transformadas de *Corynebacterium*, contienen el gen en forma que puede replicarse, es decir en copias adicionales del cromosoma, integrándose las copias génicas mediante recombinación homóloga en cualquier posición del genoma, y/o en un plásmido o vector.

Se conoce un gran número de secuencias que codifican una función desconocida de proteínas de membrana. Mediante la preparación de genes de exportación según la invención, tales como por ejemplo del gen de exportación con la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1016 hasta el 1766 según la tabla 2, o con las correspondientes proteínas de exportación, como por ejemplo el gen con la secuencia de aminoácidos según la tabla 1, pueden identificarse ahora proteínas de membrana cuya función es el transporte de aminoácidos mediante la comparación de secuencias. El gen de exportación identificado con esto puede utilizarse a continuación para la mejora de la producción de aminoácidos según el procedimiento según la invención.

Las proteínas de membrana conocidas del estado de la técnica presentan por regla general 12 hélices transmembrana, en parte también 4. Se encontró ahora sorprendentemente que las proteínas de membrana adecuadas o responsables de la exportación de aminoácidos presentan 6 hélices transmembrana (compárese por ejemplo con la secuencia expuesta en la tabla 3 de una proteína de exportación en la que las 6 zonas transmembrana están señaladas mediante subrayado). Con esto se encuentra en este caso una clase de proteínas de membrana hasta ahora todavía no descrita y por consiguiente nueva.

Ejemplos de realización

a) Clonación de un gen de exportación y clonación de un regulador de *Corynebacterium glutamicum*

Se aisló ADN cromosómico de *C. glutamicum* R127 (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) tal como se describe por Scharzer *et al.* (Bio/Technology (1990) 9: 84-87). Se escindió con la enzima de restricción Sau3A y se separó mediante centrifugación en gradiente de sacarosa tal como se describe por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Se analizaron las fracciones individuales mediante electroforesis en gel para determinar su tamaño y se utilizó la fracción con un tamaño de fragmento de aproximadamente 6-10 kb para la ligación con el vector pJC1. Para esto, se linealizó y desfosforiló el vector pJC1 con BamHI. Se ligaron cinco ng del mismo con 20 ng de los fragmentos cromosómicos de 6-10 kb. Se transformó el mutante NA8 de defecto de exportación (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) con la mezcla básica de ligación total mediante electroporación (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304). Se seleccionaron los transformantes en LBHIS (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299-304) con 15 µg de kanamicina por ml. Se sometieron estos transformantes a análisis en plásmidos extensos, poniéndose por separado 200 de los 4500 clones obtenidos en total, y determinándose su porcentaje y tamaño en el plásmido. En promedio, un plásmido recombinante portaba aproximadamente la mitad de los clones resistentes a kanamicina sometidos a ensayo con un inserto de tamaño promedio de 8 kb. Con esto se obtuvo una probabilidad de 0,96 con respecto a la presencia de cada gen cualquiera x de *C. glutamicum* en el banco de genes construido. Se sometieron a prueba por separado todos los 4500 transformantes obtenidos para determinar la recuperación de la secreción de lisina. Para esto se utilizó el sistema descrito por Vrljic para obtener la inducción de la segregación de L-lisina en *Corynebacterium glutamicum* (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027). Para esto se produjeron

las denominadas placas de indicador de medio mínimo, que contenían 20 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g de urea, 1 g de KH_2PO_4 , 1 g de K_2HPO_4 , 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 42 g ácido morfolinopropanosulfónico, 1 ml de CaCl_2 (1 g/100 ml), 750 ml de agua destilada, 1 ml de sales de trazas de Cg, 1 ml de biotina (20 mg/100 ml), pH 7, glucosa al 4%, 1,8 mg de ácido protocatéquico, 1 mg de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mg de $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 mg de CuSO_4 , 0,002 mg de $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 20 g de agar-agar, así como 10^7 células/ml del mutante 49/3 de *C. glutamicum* auxotrófico para lisina, por litro. Se picaron por separado todos los 4500 transformantes originales por medio de palillos de dientes en las placas de indicador, con cada uno de los controles del NA8 no segregado originalmente (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) y de la cepa de partida R127. Paralelamente, se inocularon 2 placas respectivamente, de las que sólo una contenía además L-metionina, para inducir de ese modo la segregación de lisina. Se incubaron las placas de indicador a 30°C, y se sometieron a ensayo tras 15, 24 y 48 horas. En total se obtuvieron 29 clones que mostraban un cuadrante de crecimiento en una placa de indicador mezclada con metionina mediante la cepa de indicación 49/3. Se aislaron los clones, y después se sometieron a prueba de nuevo, tal como se describió anteriormente, para determinar la recuperación del cuadrante de crecimiento. De esta manera se obtuvieron los dos clones NA8 pMV8-5-24 y NA8 pMV6-3, que tenían la capacidad de recuperarse para segregar lisina.

Se realizaron preparaciones de plásmidos de estos clones, tal como se describe por Schwarzer *et al.* (Bio/Technology (1990) 9: 84-87). Mediante la retransformación en NA8, se comprobó el efecto asociado al plásmido de la segregación de L-lisina. Se sometieron a análisis de restricción ambos plásmidos. El plásmido pMV8-5-24 portaba un inserto de 8,3 kb, y el pMV6-3 uno de 9,5 kb. La figura 1 muestra el mapa físico del inserto.

b) Subclonación de un fragmento de ADN que reconstituye la exportación de lisina

Del inserto del plásmido pMV6-3 se produjeron subclones individuales con el uso de los sitios de corte de restricción determinados. Así se ligó el fragmento XhoI-SalI de 3,7 kb, el fragmento BamHI de 2,3 kb y el fragmento BamHI de 7,2 kb con el correspondiente vector pJC1 tratado y cortado (Mol Gen Genet (1990) 220: 478-480). Se transformó directamente *C. glutamicum* NA8 con los productos de ligación, se sometieron a prueba los transformantes tal como se describió anteriormente para determinar la recuperación de la segregación de lisina y se comprobó la presencia del subclon mediante la preparación de plásmidos y análisis de restricción. De esta manera se obtuvo la cepa con el plásmido pMV2-3 como subclon más pequeño (figura 1). Este fragmento que facilita la exportación de lisina contiene como inserto el fragmento BamHI-de 2,3 kb de pMV6-3.

c) Secuencia del gen de exportación de lisina *lysE* y su regulador *lysG*

Se realizó la secuencia de nucleótidos del fragmento BamHI de 2,3 kb según el procedimiento de terminación de la cadena didesoxi de Sanger *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74: 5463-5467), y las reacciones de secuencia con el kit de secuenciación Auto-Read de Pharmacia (Uppsala, Suecia). El análisis electroforético tuvo lugar con el dispositivo de secuencia de ADN de fluorescencia láser automático (A.L.F.) de Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, EE.UU.). Se analizó la secuencia de nucleótidos obtenida con el paquete de programa HUSAR (Versión 3.0) del centro de investigación del cáncer alemán (Deutschen Krebsforschungszentrums) (Heidelberg). La secuencia de nucleótidos y el resultado del análisis se reproducen en la tabla 2. El análisis dio dos marcos de lectura completamente abiertos (ORF) en el trozo de ADN secuenciado. ORF1 codifica para una proteína con una longitud de 236 aminoácidos, ORF2 para una con una longitud de 290 aminoácidos. La proteína derivada de ORF1 muestra un conglomerado de aminoácidos hidrófobos, tal como es característico para proteínas de membrana continua. El análisis detallado de la distribución de los aminoácidos hidrófobos e hidrófilos con el programa PHD.HTM (Protein Science (1995) 4: 521-533) se muestra en la tabla 3. De aquí se obtiene que la proteína contiene seis zonas de hélice hidrófobas, que atraviesan la membrana. Por consiguiente, en el caso de esta proteína, se trata del exportador buscado del aminoácido L-lisina. El correspondiente gen se denomina por ello a continuación como *lysE*. Se marca en la tabla 2 de manera correspondiente. ORF2 se transcribe en dirección contraria con respecto a ORF1. El análisis de secuencias muestra que ORF2 tiene alta identidad con los genes reguladores, que se agrupan como una familia (Ann Rev Microbiol (1993) 597-626). Los genes de esta familia regulan la expresión de los genes más diversos que participan en los procesos catabólicos y anabólicos de manera positiva. A continuación, ORF2 se denomina por ello como *lysG* (Govern = Regular). Debido a esta asignación y porque *lysE* sólo podía clonarse (véase a)) y subclonarse (véase b)) junto con *lysG*, *lysG* es el regulador de *lysE* y por consiguiente también participa en la exportación de lisina. En la tabla 2 o tabla 1 también se muestra el gen *lysG* y su secuencia de aminoácidos derivada.

d) Identificación de una proteína de membrana desconocida de *Escherichia coli* mediante comparación de secuencias

Con las secuencias establecidas según la tabla 3, pueden examinarse los bancos de secuencias que ya existen para asignar de ese modo una función a las proteínas derivadas de las zonas secuenciadas. De manera correspondiente, se compara la secuencia de aminoácidos del exportador de lisina de *C. glutamicum* con la utilización del paquete de programa HUSAR (versión 3.0) del centro de investigación del cáncer alemán (Deutschen Krebsforschungszentrums) (Heidelberg) con las secuencias de proteínas derivadas de todas las secuencias de ADN depositadas. Para obtener una única secuencia de función hasta ahora desconocida de *E. coli* se obtuvo una alta homología del 39,3% de aminoácidos idénticos y el 64,9% de aminoácidos similares. En la figura 2 se muestra la comparación. Con esto, el marco de lectura abierto no caracterizado hasta el momento de *E. coli* se identifica por medio de este procedimiento como un gen de exportación de aminoácidos.

e) Aumento de la exportación de L-lisina acumulada intracelularmente

Se transformó la cepa *C. glutamicum* NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027) con el plásmido pMV2-3, y se compararon las segregaciones de L-lisina de las cepas. Para esto, se pusieron NA8 y NA8pMV2-3 en medio complejo, tal como se describe en Vrljic *et al.* (J Bacteriol (1995) 177: 4021-4027), y el medio de fermentación CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) se inoculó por separado respectivamente. El medio contenía además L-metionina 5 mM, para inducir la biosíntesis de L-lisina intracelular. Tras el cultivo durante 24 horas a 30°C en la mesa sacudidora de rotación a 140 rpm, se realizó la determinación de L-lisina en el exterior e interior de la célula. Para la determinación en el interior de la célula se realizaron centrifugaciones en aceite de silicona (Methods Enzymology LV (1979) 547-567); la determinación de los aminoácidos tuvo lugar por medio de cromatografía líquida de alta resolución (J Chromat (1983) 266: 471-482). Estas determinaciones se realizaron a tiempos distintos, tal como se indica en la figura 3. De manera correspondiente al procedimiento usado, se segrega y se acumula de manera aumentada la L-lisina acumulada en el interior de la célula de ese modo mediante pMV2-3. De manera correspondiente, se reduce fuertemente también según lo esperado la L-lisina existente en el interior de la célula. Por consiguiente, el uso del exportador descrito y descubierto representa un procedimiento para mejorar la formación de L-lisina determinada.

f) Aumento de la acumulación de L-lisina mediante *lysE* o *LysEG*

Se ligó en pZ1 el fragmento PvuII-HindII de 1173 pb que porta el *lysE* correspondiente de la información de secuencia del subclon pMV2-3, que contiene el fragmento BamHI de 2374 pb secuenciado en pJC1 (véase la figura 1) (Appl Env Microbiol(1989) 55: 684-688), y de ese modo se obtuvo el plásmido *plysE*. Se introdujo este plásmido, así como el plásmido pMV2-3 que porta la *lysElysG* mediante electroporación en la cepa d de *C. glutamicum*, detectándose zonas cromosómicas. En primer lugar, las cepas obtenidas de *C. glutamicum* d pMV2-3, *C. glutamicum* d *plysE*, *C. glutamicum* pJC1 se disponen tal como se describió en e) en el medio complejo, después se cultivaron en medio mínimo de producción CGXII junto con glucosa al 4% y L- metionina 5 mM, y se tomaron muestras para la determinación de L-lisina acumulada. Como puede apreciarse en la figura 4, se consigue mediante *lysElysG* un aumento de la acumulación de lisina en comparación con los controles. El *plysE* alcanza una acumulación extraordinariamente aumentada de 4,8 mediante este procedimiento hasta 13,2 mM de L-lisina.

30 **Leyendas de las tablas y las figuras**

Tabla 1: La secuencia de aminoácidos del regulador del exportador de lisina de *Corynebacterium glutamicum*, con el motivo de hélice-giro-hélice típico de las proteínas de unión a ADN.

35 Tabla 2 (tres lados): la secuencia de nucleótidos de la zona que codifica para el regulador de la exportación de lisina y del exportador de lisina de *C. glutamicum*.

40 Tabla 3: La secuencia de aminoácidos del exportador de lisina de *Corynebacterium glutamicum*, con las hélices transmembranas identificadas TMH1 a TMH6.

Figura 1: Los fragmentos de ADN obtenidos mediante la clonación en pMV6-3 y pMV8-5-24, que provocan la secreción de lisina, así como el subclon pMV2-3 producido a partir de pMV6-3, que se secuenció y provoca también la secreción de lisina. B, BamHI; Sm, SmaI; Sc, SacI; S1, Sall; H, HindII; X, XhoI.

45 Figura 2: Comparación de la secuencia de aminoácidos derivada de *LysE* de *C. glutamicum* (arriba) con un producto génico de función hasta el momento desconocida de *Escherichia coli* (abajo) que se identifica como vehículo de exportación.

Figura 3: Aumento de la exportación de lisina mediante pMV2-3 con *C. glutamicum* de NA8. Arriba, los controles con segregación y acumulación en el interior de la célula reducida de lisina hasta aproximadamente 150 mM. Abajo la alta segregación causada por pMV2-3 con acumulación sólo reducida en el interior de la célula de aproximadamente 30 mM.

55 Figura 4: El aumento de la acumulación de lisina en *C. glutamicum* mediante *lysElysG* (pMV2-3) (curva media), y la acumulación limitada mediante *lysE* (*plysE*) (curva superior).

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 1

1	MNPIQLDTLL	SIIDEGSFEG	ASLALSISPS	AVSQRVKALE	HHVGRVLVSR
	<u>Motivo hélice-giro-hélice</u>				
51	TQPAKATEAG	EVLVQAARKM	VLLQAE	TKAQ	LSGR
101	TWFPPVFNEV	ASWGGATL	TL	RLEDEA	HTLS
151	CEVVELGTMR	HLAIA	TPSLR	DAYMVD	GKLD
201	DGRVDG	VPVGR	RRVSIV	PSAE	GFGEAIR
251	LLDEIPIDTP	MYWQ	RWRLES	RS	LARLTDAV

ES 2 281 088 T3

TABLA 2

5	GGTAAACGACTTCACAATGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCCGCTTCTTCACCTTTTTC	60
		120
10	GGACTTCGAAAAGTCTTCATTGATTCCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG - P R L G E I A A D V V A	
		180
15	CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGTCCGCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T	
		240
20	CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCCTAGTGAAGAGGACGAAAATCGTACCCTCGTCGAAC D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q	
		300
25	CCAAAGCCCTTCTTCAGGGGTTGGTTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTGGGAAGGCG T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A	
		360
30	GCTGCCCTGTTACCTATGCGCGGACGCGGGGTGCTCTGGTAGCTGCGCGGGCAGGTCCAG S P V I S V R R R G V P Q D V R G D L D	
		420
35	TGCCAGAACTTCGTGTAGAAACCTGGCTTCGCATTCTGCCCGTAGCGTCGGGTTAGATC R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L	
		480
40	AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCCGCGTA K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M	
		540
45	CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAATCGAAGTGCCCAATGGCGAGG T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G	
		600
50	ATTTTGTAGAGGTGCGGCGTCGTTCTATTACACACGCGAAGTAGAAGGTTGCGGTGCGA L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T	
		660
55	CTCGCAACGAGGTGGGGTCTTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTTGGTACACCTATC L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L	
		720
60	GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAAGTCGTTCCGCGAGGTCTATCAACGCG S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A	
		780
65	AAATCAAGACGAACGTCGTTGTGGTAAAAGGCGCGACGAACGTGTTCTGAAAGTGGGCG K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A	
		840
70	AAGCCAACGAAACCGGCCAACCACGCGCTATGGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L	
		900
75	TCGAAATTGCGCGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTTACCTTTCCCGATTCTCCGCGGAAG A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E	

65

TABLA 2 (continuación)

55

60

65

TABLA 3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

1	<u>MVIMEIFITG LLLGASLLLS IGPQNVLVK QGIKREGLIA VLLVCLISDV</u>	
		TMH1
51	<u>FLFIAGTLGV DLLSNAPIV LDIMRWGGIA YLLWEAYMEA KDAMTNKVEA</u>	TMH2
		TMH3
101	<u>PQIIIEETEPT VPDDTPLGGS AVATDTRNRV RVEVSVDKQR VVVKPMLMAI</u>	
151	<u>VLTWLNPNAV LDAFVFIGGV GAQYGDTGRW IEAAGAFAS LIWFPLVGFG</u>	
		TMH4
201	<u>AAALSRPLSS PKVWRWINVV VAVVMTALAI KILNMG</u>	TMH5
		TMH6

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos, en el que se aumenta la actividad del vehículo de exportación específica para los correspondientes aminoácidos de LysE con una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 2 y/o la expresión del gen de exportación específica para los correspondientes aminoácidos de lysE con la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1016 hasta el 1726 según SEC ID No 1 de un microorganismo que produce los correspondientes aminoácidos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la expresión génica del vehículo de exportación lysE se aumenta mediante un aumento del número de copias génicas.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque para obtener un aumento del número de copias génicas el gen de exportación lysE se incorpora en un constructo génico.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el gen de exportación lysE se incorpora en un constructo génico que contiene la secuencia génica reguladora asignada para el gen de exportación.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la secuencia génica reguladora lysG con una secuencia de aminoácidos según SEC ID No 5 es una de las secuencias génicas reguladoras.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la secuencia génica reguladora lysG presenta una secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1421 hasta el 2293 según SEC ID No 3.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 6, **caracterizado** porque un microorganismo que produce los correspondientes aminoácidos se transforma con el constructo génico que contiene el gen de exportación lysE.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado** porque un microorganismo del género *Corynebacterium* se transforma con el constructo génico que contiene el gen de exportación lysE.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado** porque se utiliza un microorganismo para la transformación en el que se desregulan las enzimas que participan en la síntesis de los correspondientes aminoácidos.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado** porque se utiliza un microorganismo para la transformación, que contiene un porcentaje elevado de metabolitos del metabolismo central.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 10, **caracterizado** porque el gen de exportación lysE se aísla a partir de una cepa de microorganismos del género *Corynebacterium*.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque se aumenta la expresión del gen de exportación lysE mediante el refuerzo de las señales de transcripción.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores para la producción de L-lisina.
14. Gen de exportación lysE que codifica un vehículo de exportación de aminoácidos LysE con una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 2.
15. Gen de exportación según la reivindicación 14, con la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1016 hasta el 1726 según SEC ID No 1.
16. Gen de exportación según una de las reivindicaciones 14 ó 15 que comprende secuencias génicas reguladoras.
17. Gen de exportación según la reivindicación 16, **caracterizado** porque la secuencia génica reguladora lysG presenta una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 5.
18. Gen de exportación según la reivindicación 17, **caracterizado** porque la secuencia génica reguladora lysG presenta una secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1421 hasta el 2293 según SEC ID No 3.
19. Un gen regulador lysG adecuado para la regulación de un gen de exportación lysE que codifica un vehículo de exportación de aminoácidos con una secuencia de nucleótidos según SEC ID No 1, con una secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 5
20. Gen regulador según la reivindicación 19 con la secuencia de nucleótidos desde el nucleótido 1421 hasta el 2293 según SEC ID No 3.
21. Constructo génico que contiene un gen de exportación según una de las reivindicaciones 14 a 16.

ES 2 281 088 T3

22. Constructo génico según la reivindicación 21 que contiene además una secuencia génica reguladora según la reivindicación 19 ó 20.

23. Vector que contiene un gen de exportación según una de las reivindicaciones 14 a 16 o un constructo génico según la reivindicación 21.

24. Vector según la reivindicación 23, que contiene además una secuencia génica reguladora según la reivindicación 19 ó 20 o una constructo génico según la reivindicación 22.

25. Célula transformada que contiene un gen de exportación según una de las reivindicaciones 14 a 16 en forma que puede replicarse o un constructo génico según la reivindicación 21.

26. Célula transformada según la reivindicación 25 que contiene un vector según la reivindicación 23.

27. Célula transformada según la reivindicación 25 ó 26 **caracterizada** porque pertenece al género de *Corynebacterium*.

28. Célula transformada según una de las reivindicaciones 25 a 27, **caracterizada** porque en ésta están desreguladas las enzimas que participan en la síntesis de los aminoácidos, que se extrae de la célula por medio del vehículo de exportación codificado por el gen de exportación lysE transferido en la célula transformada.

29. Célula transformada según una de las reivindicaciones 25 a 28 **caracterizada** porque contiene un elevado porcentaje de metabolitos del metabolismo central.

30. Célula transformada según una de las reivindicaciones 25 a 29 que contiene además una secuencia génica reguladora lysG según la reivindicación 19 ó 20 en forma que puede replicarse o un constructo génico según la reivindicación 22.

31. Célula transformada según la reivindicación 30 que contiene un vector según la reivindicación 24.

32. Un vehículo de exportación de aminoácidos LysE con 6 hélices transmembrana, codificado por un gen de exportación lysE con la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID No 2.

33. Uso del gen de exportación lysE con una de las secuencias de nucleótidos según SEC ID No 1 para el aumento de la producción de aminoácidos de microorganismos.

34. Uso según la reivindicación 33, **caracterizado** porque se utiliza el gen de exportación lysE cuya expresión génica del vehículo de exportación lysE se aumenta mediante un aumento del número de copias génicas y/o mediante el uso de factores reguladores que influyen de manera positiva en la expresión del gen de exportación.

35. Uso según la reivindicación 33 ó 34 **caracterizado** porque se transforma el microorganismo que produce aminoácidos con un constructo génico que contiene el gen de exportación lysE.

36. Uso según la reivindicación 35, **caracterizado** porque el constructo génico porta además secuencias génicas reguladoras.

37. Uso según una de las reivindicaciones 33 a 36, **caracterizado** porque se utiliza el gen de exportación lysE de *Corynebacterium*.

38. Uso según una de las reivindicaciones 33 a 37, **caracterizado** porque se utiliza *Corynebacterium* como microorganismo que produce aminoácidos.

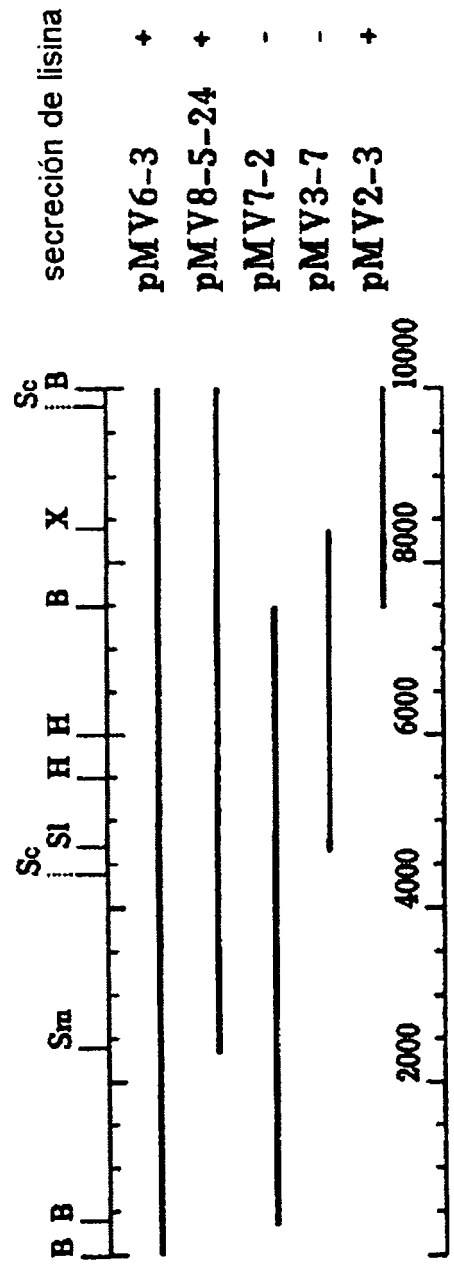


Figura 1

CgLyse 1 MVIMEIFITGLLLGASLLLSIGPQNVLVIKQGIKREGLIAVLLVCLISDV 50
 EcYgga 1MILPLGPQNAFVMNQIRROYHIMIALLC AISDL 34

CgLyse 51 FLFIAGTLGVDLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWFAVMAAKDAMTNKVEA 100
 EcYgga 35 VLICAGIFGGSALLMQSPWLLALVTWGGVAFLLWYGFGAFKTAMSSNIE. 83

CgLyse 101 PQIIIEETEPTVPDDTPLGGSAVATDTRNRVRVEVSVDKORVWVKPMLMAI 150
 EcYgga 84LASAEVMKQGRWK.....IIATMLAV 104

CgLyse 151 VLTWLNPNAYLDAFVFIGGVGAQYGDTGRWIFAAAGAFAASLIWFFLVGFG 209
 EcYgga 105 ..TWLNPHVYLDTFVVLGSLGGQLDVEPKRWFGTISASFLWFFGLALL 152

CgLyse 201 AAALSRLSSPKVWRWINVVAVVMTALAIKLMMG..... 236
 EcYgga 153 AAWLAPRLRTAKAQRIINLVVGCVMWFIALQLARDGIAHAQALFS 197

Figura 2

Complementación del defecto de exportación

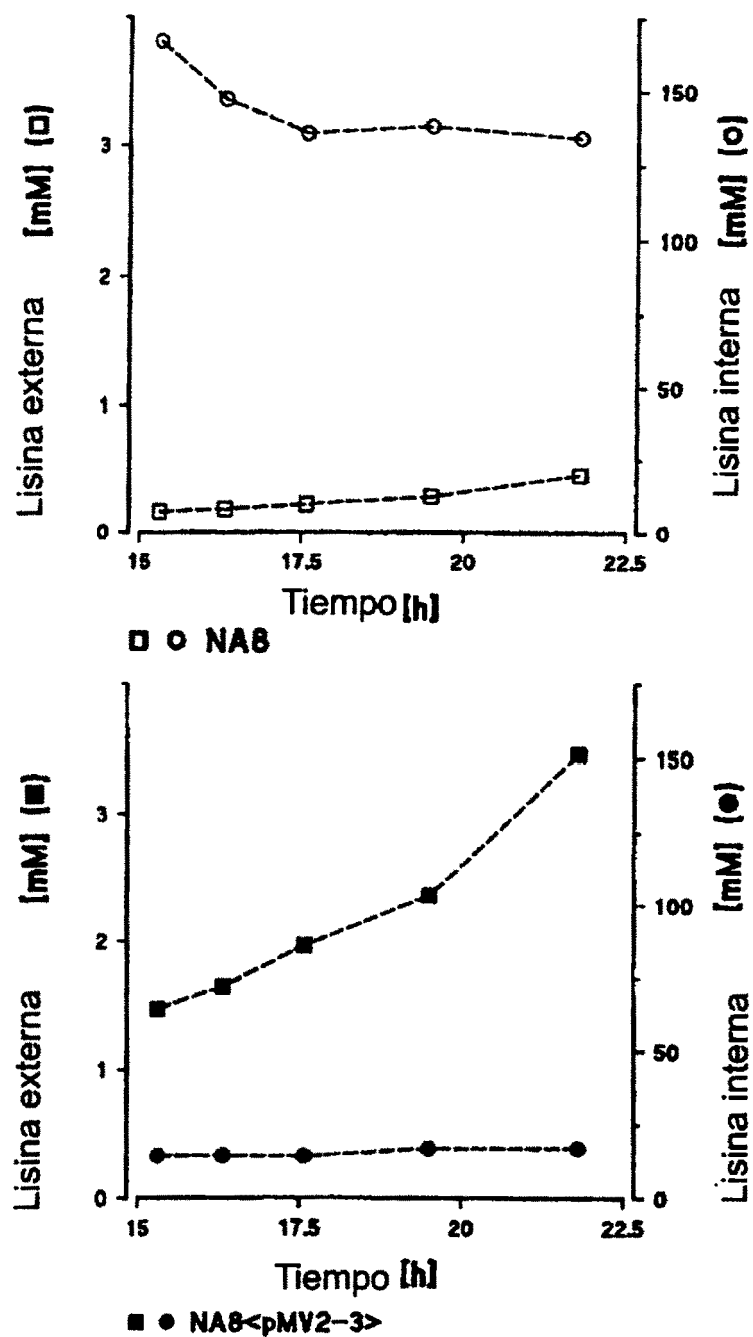


Figura 3

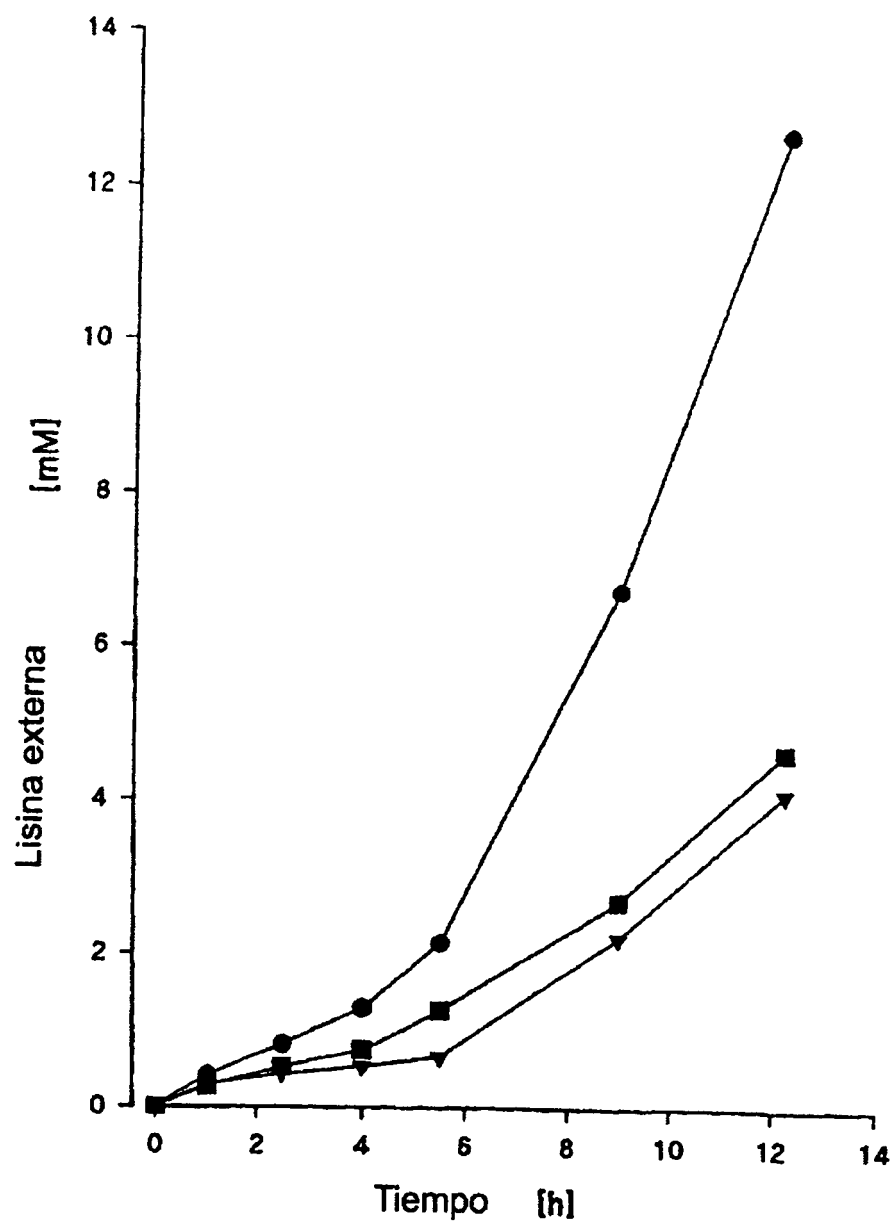


Figura 4

ES 2 281 088 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Forschungszentrum Jülich GmbH

5 <120> Procedimiento para la producción microbiana de aminoácidos mediante aumento de la actividad de vehículos de exportación

<130> 1

10 <140> PCT/DE96/02485

<141> 18-12-1996

<160> 5

15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

20 <211> 2374

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

25 <220> (LysE)

<221> gen

<222> CDS (1016)..(1726)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 281 088 T3

<400> 1

```

5      ccatttgctg aagggtgttac tctgcctggc ccaattcctg cgggcgaaga agtgaaaaac 60
      cctgaacctt ttcagaagta actaaggccg caatccctcg attgctgcat caacgacggc 120
10     gtctgtgagt ctagctagag atctagattc caggcgccat cgttgccaat acateggtgt 180
      gtcaatgggt atctcatcga ggaggatcac ttctcctgct tttagcatgg gagcagcttg 240
      ggtttcggga agaagtcccc aaccaaggcc tcggcgaatt gcctcaccaa aaccttcgcg 300
15     cgacgggaca atggatacgc gcctgcgccc cacaggacca tcgacgcgcc cgtccaggtc 360
      acggtcttga agcacatctt tgggaccgaa gcgtaagacg ggcatcgag cccaatctag 420
20     tttcccatca accatgtagg catcccgcaa tgaggggggt gcaatggcca agtggcgcat 480
      ggttccaagt tctactactt cacatcccgc cacgggatta gcttcacggg ttaccgctcc 540
      taaaacatct ccacgccgca gcaaggataa tgtgtgcgct tcattttcca agcgcagcgt 600
25     gagcgttgct ccaccccaag aagctacctc gttgaacacg ggaggaaacc atgtggatag 660
      cgaatctgcg ttgatggcga tggttaacgg gatttcagca aggcgtccag atagtgcgc 720
30     tttagtttct gcttgacgca acaccatttt ccgcgctgct tgcacaagga cttcaccgcg 780
      ttcggttgct ttggccgggt gggcgcgcga taccaacact cgaccacgt gatgctcgag 840
35     agctttaacg cgctgactca ccgccgaggg ggaaatggaa agggctaagg aggcgccttc 900

      gaagctgcct tcatcaatga ttgagagcaa agtgtccagt tgaatggggg tcatgaagct 960
40     atattaaacc atgttaagaa ccaatcattt tacttaagta cttccatagg tcacg atg 1018
                                           Met
                                           1
      gtg atc atg gaa atc ttc att aca ggt ctg ctt ttg ggg gcc agt ctt 1066
45
50
55
60
65

```

ES 2 281 088 T3

Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser Leu
 5 5 10 15
 5 tta ctg tcc atc gga ccg cag aat gta ctg gtg att aaa caa gga att 1114
 Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly Ile
 20 25 30
 10 aag cgc gaa gga ctc att gcg gtt ctt ctc gtg tgt tta att tct gac 1162
 Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 35 40 45
 15 gtc ttt ttg ttc atc gcc gcc acc ttg gcc gtt gat ctt ttg tcc aat 1210
 Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser Asn
 50 55 60 65
 20 gcc gcg ccg atc gtg ctc gat att atg cgc tgg ggt gcc atc gct tac 1258
 Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala Tyr
 70 75 80
 25 ctg tta tgg ttt gcc gtc atg gca gcg aaa gac gcc atg aca aac aag 1306
 Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn Lys
 85 90 95
 30 gtg gaa gcg cca cag atc att gaa gaa aca gaa cca acc gtg ccc gat 1354
 Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro Asp
 100 105 110
 35 gac acg cct ttg gcc ggt tcc gcg gtg gcc act gac acg cgc aac cgg 1402
 Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn Arg
 115 120 125
 40 gtg cgg gtg gag gtg agc gtc gat aag cag cgg gtt tgg gta aag ccc 1450
 Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys Pro
 130 135 140 145
 45 atg ttg atg gca atc gtg ctg acc tgg ttg aac ccg aat gcg tat ttg 1498
 Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr Leu
 150 155 160
 50 gac gcg ttt gtg ttt atc gcc gcc gtc gcc gcg caa tac gcc gac acc 1546
 Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp Thr
 165 170 175
 55 gga cgg tgg att ttc gcc gct gcc gcg ttc gcg gca agc ctg atc tgg 1594
 Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile Trp
 180 185 190
 60 ttc ccg ctg gtg ggt ttc gcc gca gca gca ttg tca cgc ccg ctg tcc 1642
 Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu Ser
 195 200 205
 65 agc ccc aag gtg tgg cgc tgg atc aac gtc gtc gtg gca gtt gtg atg 1690
 Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val Met
 210 215 220 225
 70 acc gca ttg gcc atc aaa ctg atg ttg atg ggt tag ttttcgcggg 1736
 Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
 230 235
 75 ttttgaatc ggtggccttc gcccaaatgt tgatgccggc gtcgtgggaa atctcatcga 1796
 80 tcgcctccaa ctggcgctca gaaaactcca agttgttgag tgaatcaagg ctgttgctca 1856

ES 2 281 088 T3

```

gctgctcaac tgacgaagca ccaatcaatg cactgggtcac ggtatccgcg ccgtactctc 1916
cttgctcgcg cagcaoccat gcaagcgcca tctgcgcaag tgactgcccg cgttccctggg 1976
cgatgtcatt gagcttgccg accatatcaa tattgttcac gttcaacatg ccctcagaca 2036
gggacttacc ctggctggcg cgggaacctt ctggaattcc atcgagatat ttgtccgtga 2096
gcaggccctg cgcaagtggg gagaaagcaa tgacgccaag accattggtg gcagctgact 2156
gcaacaagtt ctcaccgtca tcgcccgggt cctccaccca acgattaatg atggaatagc 2216
ttggctgatg aatcagaagc gggcagccct cctccgccaat gaactcagcc gcctccgctg 2276
tgagctctgg accgtaggaa gaaataccca cgtaaagagc ctttccagac gcaacaatgt 2336
cacgcaatgc gtacatgggt tcttccaaag gagtatct 2374

```

<210> 2

<211> 236

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220> (LysE)

ES 2 281 088 T3

<400> 2

```

5      Met Val Ile Met Glu Ile Phe Ile Thr Gly Leu Leu Leu Gly Ala Ser
      1          5          10          15

      Leu Leu Leu Ser Ile Gly Pro Gln Asn Val Leu Val Ile Lys Gln Gly
      20          25          30

10     Ile Lys Arg Glu Gly Leu Ile Ala Val Leu Leu Val Cys Leu Ile Ser
      35          40          45

      Asp Val Phe Leu Phe Ile Ala Gly Thr Leu Gly Val Asp Leu Leu Ser
      50          55          60

15     Asn Ala Ala Pro Ile Val Leu Asp Ile Met Arg Trp Gly Gly Ile Ala
      65          70          75          80

      Tyr Leu Leu Trp Phe Ala Val Met Ala Ala Lys Asp Ala Met Thr Asn
      85          90          95

      Lys Val Glu Ala Pro Gln Ile Ile Glu Glu Thr Glu Pro Thr Val Pro
      100         105         110

25     Asp Asp Thr Pro Leu Gly Gly Ser Ala Val Ala Thr Asp Thr Arg Asn
      115        120        125

      Arg Val Arg Val Glu Val Ser Val Asp Lys Gln Arg Val Trp Val Lys
      130        135        140

30     Pro Met Leu Met Ala Ile Val Leu Thr Trp Leu Asn Pro Asn Ala Tyr
      145        150        155        160

      Leu Asp Ala Phe Val Phe Ile Gly Gly Val Gly Ala Gln Tyr Gly Asp
      165        170        175

35     Thr Gly Arg Trp Ile Phe Ala Ala Gly Ala Phe Ala Ala Ser Leu Ile
      180        185        190

40

      Trp Phe Pro Leu Val Gly Phe Gly Ala Ala Ala Leu Ser Arg Pro Leu
      195        200        205

45     Ser Ser Pro Lys Val Trp Arg Trp Ile Asn Val Val Val Ala Val Val
      210        215        220

      Met Thr Ala Leu Ala Ile Lys Leu Met Leu Met Gly
      225        230        235

```

<210> 3

<211> 2374

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220> (complemento para <210> 1)

<221> no cierto

<222> CDS (2)..(652)

<223> orf3

<220>

<221> gen

ES 2 281 088 T3

<222> CDS (1421)..(2293)

<223> LysG

5 <400> 3

```

a gat act cct ttg gaa gaa acc atg tac gca ttg cgt gac att gtt gcg 49
Asp Thr Pro Leu Glu Glu Thr Met Tyr Ala Leu Arg Asp Ile Val Ala
1      5      10      15

tct gga aag gct ctt tac gtg ggt att tct tcc tac ggt cca gag ctc 97
Ser Gly Lys Ala Leu Tyr Val Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Pro Glu Leu
20     25     30

aca gcg gag gcg gct gag ttc atg gcg gag gag ggc tgc ccg ctt ctg 145
Thr Ala Glu Ala Ala Glu Phe Met Ala Glu Glu Gly Cys Pro Leu Leu
35     40     45

att cat cag cca agc tat tcc atc att aat cgt tgg gtg gag gaa ccg 193
Ile His Gln Pro Ser Tyr Ser Ile Ile Asn Arg Trp Val Glu Glu Pro
50     55     60

ggc gat gac ggt gag aac ttg ttg cag tca gct gcc aac aat ggt ctt 241
Gly Asp Asp Gly Glu Asn Leu Leu Gln Ser Ala Ala Asn Asn Gly Leu
65     70     75     80

ggc gtc att gct ttc tca cca ctt gcg cag ggc ctg ctc acg gac aaa 289
Gly Val Ile Ala Phe Ser Pro Leu Ala Gln Gly Leu Leu Thr Asp Lys
85     90     95

tat ctc gat gga att cca gag ggt tcc cgc gcc agc cag ggt aag tcc 337
Tyr Leu Asp Gly Ile Pro Glu Gly Ser Arg Ala Ser Gln Gly Lys Ser
100    105    110

ctg tct gag ggc atg ttg aac gtg aac aat att gat atg gtc cgc aag 385
Leu Ser Glu Gly Met Leu Asn Val Asn Asn Ile Asp Met Val Arg Lys
115    120    125

ctc aat gac atc gcc cag gaa cgc ggg cag tca ctt gcg cag atg gcg 433
Leu Asn Asp Ile Ala Gln Glu Arg Gly Gln Ser Leu Ala Gln Met Ala
130    135    140

```

ES 2 281 088 T3

	ctt gca tgg gtg ctg cgc gag caa gga gag tac ggc gcg gat acc gtg	481
	Leu Ala Trp Val Leu Arg Glu Gln Gly Glu Tyr Gly Ala Asp Thr Val	
5	145 150 155 160	
	acc agt gca ttg att ggt gct tcg tca gtt gag cag ctg gac aac agc	529
	Thr Ser Ala Leu Ile Gly Ala Ser Ser Val Glu Gln Leu Asp Asn Ser	
	165 170 175	
10	ctt gat tca ctc aac aac ttg gag ttt tct gac gcc gag ttg gag gcg	577
	Leu Asp Ser Leu Asn Asn Leu Glu Phe Ser Asp Ala Glu Leu Glu Ala	
	180 185 190	
	atc gat gag att tcc cac gac gcc ggc atc aac att tgg gcg aag gcc	625
15	Ile Asp Glu Ile Ser His Asp Ala Gly Ile Asn Ile Trp Ala Lys Ala	
	195 200 205	
	acc gat tcc aaa acc cgc gaa aac taa cccatcaaca tcagtttgat	672
20	Thr Asp Ser Lys Thr Arg Glu Asn	
	210 215	
	ggccaatgcg gtcacacaaa ctgccacgac gacgttgatc cagcgccaca ccttggggct	732
	ggacagcggg cgtgacaatg ctgctgcgcc gaaaccacac agcgggaacc agatcaggct	792
25	tgccgcgaac gcgccagcgg cgaaaatcca ccgtccggtg tcgccgtatt gcgcgccgac	852
	gccgccgata aacacaaaacg cgtccaaata cgcattcggg ttcaaccagg tcagcacgat	912
	tgccatcaac atgggcttta cccaaaccgc ctgcttatcg acgtcacct ccaccgcgac	972
30	ccggttgccg gtgtcagtg ccaccgcga accgccaaa ggcgtgtcat cgggcacggc	1032
	tggttctgtt tcttcaatga tctgtggcgc ttccaccttg tttgtcatgg cgtctttcgc	1092
	tgccatgacg gcaaaccata acaggtaagc gatgccaccc cagcgcataa tategagcac	1152
35	gateggcgcg gcattggaca aaagatcaac gcccaaggcg ccggcgatga acaaaaagac	1212
	gtcagaaatt aaacacacga gaagaaccgc aatgagtcct tcgcgcttaa ttccttggtt	1272
40	aatcaccagt acattctgcg gtccgatgga cagtaaaaga ctggcccca aaagcagacc	1332
	tgtaatgaag atttccatga tcaccatcgt gacctatgga agtacttaag taaaatgatt	1392
	ggttcttaac atgggttaat atagcttc atg aac ccc att caa ctg gac act	1444
45	Met Asn Pro Ile Gln Leu Asp Thr	
	220 225	
	ttg ctc tca atc att gat gaa ggc agc ttc gaa ggc gcc tcc tta gcc	1492
50	Leu Leu Ser Ile Ile Asp Glu Gly Ser Phe Glu Gly Ala Ser Leu Ala	
	230 235 240	
	ctt tcc att tcc ccc tcg gcg gtg agt cag cgc gtt aaa gct ctc gag	1540
	Leu Ser Ile Ser Pro Ser Ala Val Ser Gln Arg Val Lys Ala Leu Glu	
	245 250 255	
55	cat cac gtg ggt cga gtg ttg gta tcg cgc acc caa ccg gcc aaa gca	1588
	His His Val Gly Arg Val Leu Val Ser Arg Thr Gln Pro Ala Lys Ala	
	260 265 270	
	acc gaa gcg ggt gaa gtc ctt gtg caa gca gcg cgg aaa atg gtg ttg	1636
60	Thr Glu Ala Gly Glu Val Leu Val Gln Ala Ala Arg Lys Met Val Leu	

ES 2 281 088 T3

	275	280	285	
5	ctg caa gca gaa act Leu Gln Ala Glu Thr 290	aaa gcg caa cta tct Lys Ala Gln Leu Ser 295	gga cgc ctt gct gaa atc Gly Arg Leu Ala Glu Ile 300	1684
10	ccg tta acc atc gcc atc Pro Leu Thr Ile Ala 310	aac gca gat tcg cta tcc Asn Ala Asp Ser Leu Ser 315	aca tgg ttt cct Thr Trp Phe Pro 320	1732
15	ccc gtg ttc aac gag gta Pro Val Phe Asn Glu Val 325	gct tct tgg ggt gga gca Ala Ser Trp Gly Gly Ala 330	acg ctc acg ctg Thr Leu Thr Leu 335	1780
20	cgc ttg gaa gat gaa gcg Arg Leu Glu Asp Glu Ala 340	cac aca tta tcc ttg ctg His Thr Leu Ser Leu Leu 345	cgg cgt gga gat Arg Arg Gly Asp 350	1828
25	gtt tta gga gcg gta acc Val Leu Gly Ala Val Thr 355	cgt gaa gct aat ccc Arg Glu Ala Asn Pro 360	gtg gcg gga tgt gaa Val Ala Gly Cys Glu 365	1876
30	gta gta gaa ctt gga acc Val Val Glu Leu Gly Thr 370	atg cgc cac ttg gcc Met Arg His Leu Ala 375	att gca acc ccc tca Ile Ala Thr Pro Ser 385	1924
35	ttg cgg gat gcc tac atg Leu Arg Asp Ala Tyr Met 390	ggt gat ggg aaa cta Val Asp Gly Lys Leu Asp 395	gat tgg gct gcg atg Asp Trp Ala Ala Met 400	1972
40	ccc gtc tta cgc ttc ggt Pro Val Leu Arg Phe Gly 405	ccc aaa gat gtg ctt Pro Lys Asp Val Leu Gln 410	caa gac cgt gac ctg Asp Arg Asp Leu 415	2020
45	gac ggg cgc gtc gat ggt Asp Gly Arg Val Asp Gly 420	cct gtg ggg cgc agg Pro Val Gly Arg Arg 425	cga ggc ctt ggt tgg Arg Arg Gly Leu Gly Trp 430	2068
50	ccg tcg gcg gaa ggt ttt Pro Ser Ala Glu Gly Phe 435	ggt gag gca att cgc Gly Glu Ala Ile Arg 440	cga ggc ctt ggt tgg Arg Arg Gly Leu Gly Trp 445	2116
55	gga ctt ctt ccc gaa acc Gly Leu Leu Pro Glu Thr 450	caa gct gct ccc atg Gln Ala Ala Pro Met 455	cta aaa gca gga gaa Leu Lys Ala Gly Glu 460	2164
60	gtg atc ctc ctc gat gag Val Ile Leu Leu Asp Glu 470	ata ccc att gac aca Ile Pro Ile Asp Thr 475	ccg atg tat tgg caa Pro Met Tyr Trp Gln 480	2212
65	cga tgg cgc ctg gaa tct Arg Trp Arg Leu Glu Ser 485	aga tct cta gct aga Ser Ser Leu Ala Arg 490	ctc aca gac gcc gtc Leu Thr Asp Ala Val 495	2260
70	gtt gat gca gca atc gag Val Asp Ala Ala Ile Glu 500	gga ttg cgg cct tag Gly Leu Arg Pro 505	ttactttctga aaagggttcag 2313	
75	ggttttttcac ttcttcgccc 2373	gcaggaattg ggccaggcag 2374	agtaacacct tcagcaaatg 2374	
80	g			
85	<210> 4			
90	<211> 216			
95	<212> PRT			
100	<213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>			
105	<220> (orf3)			

ES 2 281 088 T3

<400> 4

5	Asp	Thr	Pro	Leu	Glu	Glu	Thr	Met	Tyr	Ala	Leu	Arg	Asp	Ile	Val	Ala
	1				5					10					15	
	Ser	Gly	Lys	Ala	Leu	Tyr	Val	Gly	Ile	Ser	Ser	Tyr	Gly	Pro	Glu	Leu
				20					25					30		
10	Thr	Ala	Glu	Ala	Ala	Glu	Phe	Met	Ala	Glu	Glu	Gly	Cys	Pro	Leu	Leu
			35					40					45			
	Ile	His	Gln	Pro	Ser	Tyr	Ser	Ile	Ile	Asn	Arg	Trp	Val	Glu	Glu	Pro
15		50					55					60				
	Gly	Asp	Asp	Gly	Glu	Asn	Leu	Leu	Gln	Ser	Ala	Ala	Asn	Asn	Gly	Leu
	65					70					75					80
20	Gly	Val	Ile	Ala	Phe	Ser	Pro	Leu	Ala	Gln	Gly	Leu	Leu	Thr	Asp	Lys
					85					90					95	
	Tyr	Leu	Asp	Gly	Ile	Pro	Glu	Gly	Ser	Arg	Ala	Ser	Gln	Gly	Lys	Ser
25				100					105					110		
	Leu	Ser	Glu	Gly	Met	Leu	Asn	Val	Asn	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Arg	Lys
			115					120					125			
30	Leu	Asn	Asp	Ile	Ala	Gln	Glu	Arg	Gly	Gln	Ser	Leu	Ala	Gln	Met	Ala
		130					135						140			
	Leu	Ala	Trp	Val	Leu	Arg	Glu	Gln	Gly	Glu	Tyr	Gly	Ala	Asp	Thr	Val
	145					150					155					160
35	Thr	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Glu	Gln	Leu	Asp	Asn	Ser
					165					170					175	
	Leu	Asp	Ser	Leu	Asn	Asn	Leu	Glu	Phe	Ser	Asp	Ala	Glu	Leu	Glu	Ala
40				180					185					190		
	Ile	Asp	Glu	Ile	Ser	His	Asp	Ala	Gly	Ile	Asn	Ile	Trp	Ala	Lys	Ala
			195					200					205			
45	Thr	Asp	Ser	Lys	Thr	Arg	Glu	Asn								
		210					215									

50 <210> 5

<211> 290

<212> PRT

55 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220> (LysG)

60

65

ES 2 281 088 T3

<400> 5

```

5      Met Asn Pro Ile Gln Leu Asp Thr Leu Leu Ser Ile Ile Asp Glu Gly
      1              5              10              15

10     Ser Phe Glu Gly Ala Ser Leu Ala Leu Ser Ile Ser Pro Ser Ala Val
              20              25              30

15     Ser Gln Arg Val Lys Ala Leu Glu His His Val Gly Arg Val Leu Val
              35              40              45

20     Ser Arg Thr Gln Pro Ala Lys Ala Thr Glu Ala Gly Glu Val Leu Val
              50              55              60

25     Gln Ala Ala Arg Lys Met Val Leu Leu Gln Ala Glu Thr Lys Ala Gln
      65              70              75              80

30     Leu Ser Gly Arg Leu Ala Glu Ile Pro Leu Thr Ile Ala Ile Asn Ala
      85              90              95

35     Asp Ser Leu Ser Thr Trp Phe Pro Pro Val Phe Asn Glu Val Ala Ser
      100             105             110

40     Trp Gly Gly Ala Thr Leu Thr Leu Arg Leu Glu Asp Glu Ala His Thr
      115             120             125

45     Leu Ser Leu Leu Arg Arg Gly Asp Val Leu Gly Ala Val Thr Arg Glu
      130             135             140

50     Ala Asn Pro Val Ala Gly Cys Glu Val Val Glu Leu Gly Thr Met Arg
      145             150             155             160

55     His Leu Ala Ile Ala Thr Pro Ser Leu Arg Asp Ala Tyr Met Val Asp
      165             170             175

60     Gly Lys Leu Asp Trp Ala Ala Met Pro Val Leu Arg Phe Gly Pro Lys
      180             185             190

65     Asp Val Leu Gln Asp Arg Asp Leu Asp Gly Arg Val Asp Gly Pro Val
      195             200             205

70     Gly Arg Arg Arg Val Ser Ile Val Pro Ser Ala Glu Gly Phe Gly Glu
      210             215             220

75     Ala Ile Arg Arg Gly Leu Gly Trp Gly Leu Leu Pro Glu Thr Gln Ala
      225             230             235             240

80     Ala Pro Met Leu Lys Ala Gly Glu Val Ile Leu Leu Asp Glu Ile Pro
      245             250             255

85     Ile Asp Thr Pro Met Tyr Trp Gln Arg Trp Arg Leu Glu Ser Arg Ser
      260             265             270

90     Leu Ala Arg Leu Thr Asp Ala Val Val Asp Ala Ala Ile Glu Gly Leu
      275             280             285

95     Arg Pro
      290

```