



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0617498-1 A2**

(22) Data de Depósito: 09/10/2006
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) *Int.Cl.:*
C12P 13/06 2006.01
C12N 9/88 2006.01
C12N 15/63 2006.01

(54) Título: **PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE L-SERINA, SEQÜÊNCIA DE GENE, VETORES E MICROORGANISMOS**

(30) Prioridade Unionista: 17/10/2005 DE 10 2005 049 527.3

(73) Titular(es): Forschungszentrum Jülich GmbH

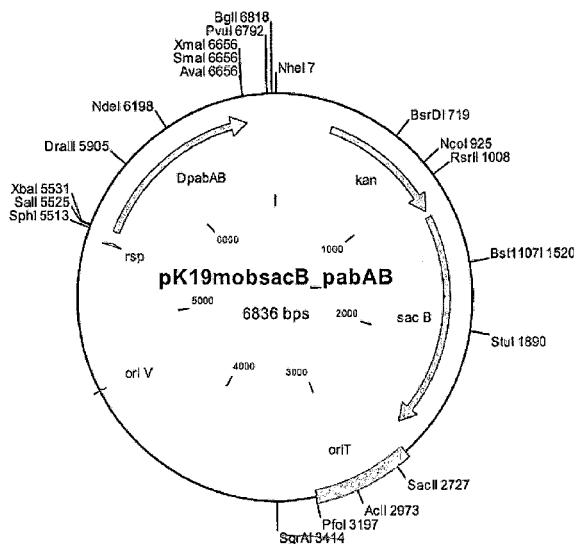
(72) Inventor(es): Hermann Sahm, Lothar Eggeling, Michael Stolz,
Petra Peters-Wendisch

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT DE2006001756 de 09/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/045210 de 26/04/2007

(57) Resumo: PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE L-SERINA, SEQÜÊNCIA DE GENE, VETORES E MICROORGANISMOS De acordo com a invenção é reduzida ou totalmente removida a concentração de ácido fólico em organismos que produzem aminoácidos para aumento da produção de L-serina. Para isso as enzimas ou genes que participam na biossíntese do ácido fólico podem ser desligados totalmente em sua atividade ou pelo menos reduzidos. Em uma forma de execução preferida são utilizadas as seqüências no. 1 até 7.



PT061498-1

PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE L-SERINA, SEQUÊNCIA DE GENE,
VETORES E MICROORGANISMOS

A invenção trata de um processo para produção de L-serina, sequência de gene, vetores assim como
5 microorganismos

Estado da Arte

O aminoácido encontra sua utilização na medicina humana, na indústria farmacêutica na indústria alimentícia e na nutrição animal.

10 É conhecido que aminoácidos são produzidos por fermentação de cepas de bactérias de forma corine, especialmente *Corinebacterium glutamicum*. Devido ao grande significado é trabalhado constantemente na melhor do processo de produção. Melhoras de processo podem envolver
15 medidas de técnica de fermentação, como por exemplo, agitação ou provimento de oxigênio, ou a composição de meios de nutrição, como por exemplo, a concentração de açúcar durante a fermentação ou a preparação da forma do produto ou as propriedades de desempenho intrínsecos do
20 próprio microorganismo.

Para melhora das propriedades de desempenho destes microorganismos são utilizados métodos de mutagênese, seleção e escolha de mutantes. Dessa forma obtêm-se cepas que são resistentes à antimetabólitos ou auxotróficos para
25 metabólitos reguladores importantes e que produzem L-aminoácidos bem como L-serina. Assim é descrita uma bactéria de forma corine que apresenta uma resistência em relação à azaserina ou beta-(2-tienil)-DL-alanina e produz L-serina (EP0943687). Além disso, é o estado da arte que,
30 através de métodos de genotecnia, podem ser aumentadas

atividades do caminho biossintético e isto pode levar a uma formação elevada de aminoácidos. Assim é, por exemplo, descrito no EP0931833A2 que um aumento da enzima biossintética fosfoserina-fosfatase e fosfoserina-transaminase é vantajoso para a formação de L-serina. Além disso, é descrito que um gene que codifica para a D-3-fosfoglicerato-dehidrogenase pode ser utilizado para a formação de L-serina (EP0931833A2, PCT WO 93/12235).

É conhecido, além disso, que além de um aumento da atividade de enzimas do caminho de síntese do L-aminoácido também a redução ou até a desativação de enzimas que participam nas reações de catálise do L-aminoácido podem levar a uma melhora da acumulação de L-aminoácido. Assim é encontrado que a desativação da enzima L-serindehidratase leva a um aumento da acumulação de L-serina (PCT/DE2004/000248). Além disso, também uma redução da atividade da enzima serinhidroximetiltransferase leva a uma quebra reduzida da L-serina (US-Patent 6,596,516; Simic et al. (2002) Appl. Environ Microbiol. 68:33213327).

É tarefa da invenção colocar à disposição um processo e um microorganismo para isso apropriado, assim como vetores com os quais a produção de L-serina pode ser aumentada. Ademais, devem ser colocados a disposição processos, assim como microorganismos e vetores, com os quais um aumento da produção de cisteína, triptofano e metionina pode ser alcançado.

Surpreendentemente foi encontrado que as bactérias de forma corine, após modificação ou desativação dos genes codificantes da síntese de ácido fólico, produzem, de forma melhorada, L-serina. Com o processo, conforme a invenção,

assim como com as bactérias, conforme a invenção, e com a sequência de genes, conforme a invenção, para enzimas ou reguladores que catalizam a síntese de ácido fólico, respectivamente participam na regulação da síntese de ácido fólico, é agora possível produzir L-serina com o rendimento que é consideravelmente maior do que as cepas modificadas de acordo com a invenção. A faixa de aumento da produção de L-serina está apresentada na tabela 2.

No mais a invenção deve ser descrita de forma geral:

Conforme a invenção, a produção de L-serina assim como a produção de cisteína, triptofano e metionina é elevada pela redução da concentração de ácido fólico em um organismo que produz aminoácido. Preferencialmente o organismo já produz L-serina antes da modificação conforme a invenção.

Por exemplo, pode ser obtida a redução da concentração de ácido fólico pela redução da síntese de ácido fólico ou por sua degradação.

A redução ou o impedimento da síntese de ácido fólico podem ser obtidos por pela mutação direcionada ou não-direcionada de genes que participam na síntese do ácido fólico.

Exemplos para mutações que levam à redução ou desligamento da produção de ácido fólico são mutações de deleção, mutação de inserção, mutação de substituição ou mutação pontual de genes que participam na biossíntese de ácido fólico.

Além disso, pode se proceder uma redução ou desligamento da produção de ácido fólico em genes modificados e não-modificados de proteínas que participam

na biossíntese de ácido fólico, pela redução ou impedimento da expressão de genes que participam na biossíntese de ácido fólico.

Uma diminuição ou desligamento da expressão de genes, que participam no caminho biossintético do ácido fólico, pode ser obtida por modificação, preferencialmente enfraquecimento, muito preferencialmente desligamento dos promotores, como estruturas de sinais, genes repressores, ativadores, operadores, atenuadores, elos de ligação de ribossomos ou códons de iniciação, terminadores ou ainda por modificação, preferencialmente enfraquecimento, mais preferencialmente desligamento ou enfraquecimento de reguladores ou da estabilidade de transcritos. Ademais podem ser utilizados promotores reguláveis, especialmente promotores enfraquecidos.

No plano das enzimas pode ser obtida a atividade da enzima envolvida na biossíntese do ácido fólico através da redução ou desligamento da atividade catalítica e da estabilidade da enzima. O mesmo efeito pode ser obtido por modificação do centro aloestérico, respectivamente de uma inibição de *feedback* da enzima. Uma possibilidade típica de reduzir ou desligar uma enzima é a modificação de proteínas, por exemplo, através de fosfolização ou adenilização. Também pode ser aumentada a degradação proteolítica da enzima participante no caminho biossintético do ácido fólico.

Enzimas típicas, cujas atividades podem ser reduzidas ou desligadas conforme descrito, são GTP-ciclohidrolase, neopterintriofosfatopirofosfatase, neopterinaldolase, 6-hidroximetilpterinpirofosfoquinase, 4-amino-4-deoxi-

chorismatsintase, 4-amino-4-deoxi-chorismatliase, pteroisintase, folatsintase e dihidrofolatreductase.

Objeto da invenção é também introduzir um vetor que contém uma ferramenta, que é apropriado para fazer
5 modificações genéticas de acordo com a invenção em um organismo de produção.

Os vetores, conforme a invenção, contêm ferramentas, que são apropriados para deletar o gene para a síntese de 4-amino-4- deoxi-corismatsintase e ou 4-amino-4-deoxi-
10 corismatliase.

A sequência para a deleção do gene da 4-amino-4-deoxi-corismatsintase é representada na Seq. No. 1. A Seq. No. 2 mostra a estrutura de um vetor que contém a Seq. No. 1.

15 A sequência para a deleção do gene da 4-amino-4-deoxi-corismatliase é representada na Seq. No. 3. A Seq. No. 4 mostra a estrutura de um vetor que contém a Seq. No. 3.

A sequência para a deleção do gene da 4-amino-4-deoxi-corismatsintase e do gene da 4-amino-4-deoxi-
20 corismatliase é representada na Seq. No. 5. A Seq. No. 6 mostra a estrutura de um vetor que contém a Seq. No. 3 para a deleção de um gene da 4-amino-4- deoxi-corismatsintase e de um gene da 4-amino-4-deoxi-corismatliase.

Na Seq. No. 7 é representado um plasmídeo que é
25 apropriado para aumentar ainda mais a produção de L-serina. Corresponde ao plasmídeo representado na figura 4 com a legenda pEC-T18mob2-serA^{fbr}CB-.

A estrutura responsável pela deleção pode ser embutida também em outra estrutura de suporte de vetor, para o qual
30 o organismo é apropriado. Como vetores são considerados

comumente também, além dos vetores cíclicos muito utilizados, vetores lineares ou fagos.

As figuras mostram vetores, que podem ser utilizados de forma exemplar para a modificação conforme a invenção dos organismos que produzem L-serina.

São mostrados:

Figura 1: pK19mobsacB_pabAB correspondente à Seq. No.

2

Figura 2: pK19mobsacB_pabC correspondente à Seq. No. 4

Figura 3: pK19mobsacB_pabABC correspondente à Seq. No.

6

Figura 4: EC-T18mob2-serA^{fbr}CB correspondente à Seq. No. 7

Preferencialmente os ferramentas são inseridos nos vetores dos organismos de L-serina, os quais já produzem L-serina antes da modificação, após as seqüências 1,3 e 5.

Todas as seqüências dadas também devem englobar variações que possuam 90%, preferencialmente 95%, de homologia.

Organismos apropriados são, por exemplo, bactérias corine, como *Corinebacterium glutamicum* ou *Brevibacterium*. Também podem ser empregados como organismos de produção enterobacterias, bacilacceens ou tipos de fermento, que apresentam uma concentração reduzida de ácido fólico.

A seguir a invenção deve ser mais bem descrita:

Objeto da invenção é um processo para produção fermentativa de L-serina sob utilização de bactérias do tipo corine, nas quais os genes que codificam a síntese de ácido fólico são modificados ou desligados ou modificados em sua expressão, ou também é introduzido uma bactéria com

deficiência natural de ácido fólico, ou ainda a regulação da síntese de ácido fólico é influenciada de tal maneira que se dá a deficiência de ácido fólico. Como a síntese de ácido fólico parte de um intermediário da síntese nucleotídica assim como um intermediário da síntese de aminoácidos aromáticos, as reações correspondentes podem em princípio serem modificadas ou desligadas, contanto que nucleotídeos e aminoácidos aromáticos em si ainda estejam suficientemente disponíveis, como é o caso, por exemplo, por suplementação externa. Além disso, a deficiência de ácido fólico pode ser introduzida controladamente também pela deleção ou modificação de reguladores que apresentam a expressão de genes de ácido fólico ou o metabolismo ligado desta forma.

Formas de execução preferidas se encontram nas reivindicações.

As cepas empregadas produzem L-serina preferencialmente já antes da modificação da síntese de ácido fólico.

O termo modificação compreende o enfraquecimento de genes de síntese de ácido fólico e a deleção completa de genes de síntese de ácido fólico. A isso pertencem mutagêneses não-direcionadas, assim como técnicas direcionadas de DNA recombinantes. Com ajuda desses métodos podem ser deletados genes da síntese de ácido fólico nos cromossomos, por exemplo. Métodos apropriados para isso são descritos por Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) ou também Link et al. (J. Bacteriology (1998) 179: 6228-6237). Também podem ser deletadas apenas partes dos genes ou também podem ser trocados fragmentos mutados de genes.

Através da deleção ou troca é obtida assim a perda ou uma redução da atividade de síntese do ácido fólico. Uma execução vantajosa do processo conforme a invenção é, por exemplo, a cepa *C. glutamicum*

5 ATCC13032DpykDsdaADpabABpserABC modificada conforme a invenção, que carrega entre outros a deleção no gene pabAB.

Outra possibilidade de enfraquecer ou desligar a atividade da síntese de ácido fólico é o processo de mutagênese. A isto pertencem processos não-direcionados que
 10 utilizam para a mutagênese reagentes químicos como, por exemplo, N-metil-N-nitro-N-Nitroguanidina ou também irradiação UV, com busca conseqüente nos microorganismos desejados por redução ou perda da atividade de síntese do ácido fólico. Processos para partida da mutação e busca por
 15 mutantes são conhecidos de forma geral e podem ser relidos em Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bactéria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) ou no Manual "Manual of methods for General
 20 Bacteriology" da American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

Além disso, também podem ser reduzidas as expressões de genes da síntese de ácido fólico por mumificação das estruturas de sinais para a expressão dos genes. Estruturas
 25 de sinais são, por exemplo, genes repressores, genes ativadores, operadores, promotores, atenuadores, locais de ligações de ribossomos, o códon de início e terminadores. Dados relacionados o técnico encontra por exemplo no pedido de patente WO96/15246, em Boyd e Murphy (J. Bacteriol.
 30 1998. 170:5949), Voskuil e Chamblis (Nucleic Acids Res.

1998. 26:3548), em Jansen e HAMmer (Biotechnol. Bioeng. 1998 58:191) em Patek et al. (Microbiology(1996) 142:1297) e em livros de ensino conhecidos da genética e da biologia molecular como por exemplo de Knippers ("Molekulare Genetik", 8ª. Edição, Editora Georg Thieme, Stuttgart, Alemanha 2001) ou no de Winnacker ("Gene und Klone" , VGH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemanha, 1990). A região do promotor e de regulação que se encontram na direção do fluxo do gene de estrutura pode ser mutada.

10 Através de promotores reguláveis é adicionalmente possível reduzir a expressão no decorrer da formação fermentativa de L-serina. Em paralelo também é possível uma regulação da translação, na qual, por exemplo, a estabilidade do m_RNA é reduzida. Isto pode ser obtido, no
15 que a estabilidade é enfraquecida por seqüências adicionais e/ou modificadas no 5ª ou 3ª extremidade do gene. Exemplos para isso são descritos genes de *bacillus subtilis* (Microbiology (2001) 147:1331-41) ou fementos (Trends Biotechnol. 994, 12:444-9). É, além disso, possível
20 influenciar a atividade de enzimas por atividade intrinsecamente proteolítica, como descrito (Mol Microbiol. (2005) 57:576-91)

No mais podem ser utilizados genes que codificam para a enzima correspondente da síntese de ácido fólico com
25 pequena atividade. Mutações que levam a modificações ou reduções da atividade catalítica de proteínas de enzimas são conhecidas. Exemplos para isso encontram-se nos trabalhos de Qiu e Goodman (J Biological Chemistry (1997) 272: 8611-8617), Sugimoto et al. (Bioscience Technology and
30 Biochemistry (1997) 61:1760-1762) e Möckel ("Die

threonindehydratase and *Corynebacterium glutamicum*:
 Aufhebung der allosterischen regulation und Struktur des
 Enzyms", Reports from the Jülich Research Centre, Jul-2906,
 ISSN09442952, Jülich, Germany, 1994). Figuras resumidas
 5 podem ser encontradas nos livros textos da genética e da
 biologia molecular, como por exemplo de Hagemann
 ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
 1986). Alternativamente pode ser obtido, além disso, uma
 expressão reduzida e atividade da enzima de síntese de
 10 ácido fólico por modificação da composição do meio e da
 condução da cultura. Instruções são encontradas pelo
 técnico entre outros em Martun et al. (Bio/Technology 5,
 137-146 (1987)), em Guerrero et al. (gene 138, 35-41
 (1994)), Tsuschiya e Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430
 15 (1988)), em Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), na
 patente européia EP 0 472 869, na patente americana
 4,601,893, em Schwarzer e Phüler (Bio/Technology 9 84-87
 (1991)), em Reinscheid et al. (Applied and Enviromental
 Microbiology 60,126-132 (1994)), em LaBarre et al. (Journal
 20 of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)) e no pedido da
 patente WO96/15246.

Desta forma os genes da síntese de ácido fólico de *C.*
glutamicum podem ser expressos de forma reduzida ou
 deletados ou ter sua atividade enzimática reduzida.

25 No mais pode ser vantajoso para a produção de L-
 serina, adicionalmente à deficiência de ácido fólico
 criado, ter um ou vários genes escolhidos o grupo,

- do gene serA que codifica para a 3-
 fosfoglicerato-dehidrogenase
- 30 • do gene serC que codifica para a fosfoserin-

transaminase

- do gene *serB* que codifica para a fosfoserin-fosfatase,

individualmente ou em combinação a fortificantes,
5 especialmente a sobre-exprimidos ou alelos desses genes, especialmente

- do gene *serA* que codifica para a 3-fosfoglicerato-dehidrogenase resistente à feedback

individualmente ou em combinação a fortificantes ou
10 sobre-exprimidos.

No mais pode ser vantajoso para a produção de L-serina, adicionalmente à deficiência artificialmente criada de ácido fólico, reduzir ou deletar um ou vários genes escolhidos do grupo

15

- do gene *aecD*, que codifica a acistationinliase,
- do gene *metC*, que codifica a acistationinliase,
- do gene *sdaA*, que codifica a serindehidratase,
- do gene *glyA*, que codifica a serinhidroximetiltransferase,

20

- do gene *trpB*, que codifica a sub-unidade beta da triptofanosintase,

- do gene *pyk*, que codifica a piruvatquinase individualmente ou em combinação.

Os microorganismos, conforme a invenção, envolvem no
25 âmbito da invenção presente bactérias do gênero *corinebacterium* ou *brevibacterium*, que são modificados através de métodos clássicos e/ou molecular-genéticos de tal forma que seu fluxo de metabolismo ocorre intensificado na direção da biossíntese de aminoácidos ou seus derivados.

30 A presente invenção engloba nisto várias cepas de produção

de aminoácidos já conhecidas. Adicionalmente são englobados conforme a invenção aquelas cepas de produção que o técnico possa produzir através de método comum em analogia aos conhecimentos de outros microorganismos, como por exemplo, enterobacterias, bacilacceens, e outros tipos de fermento. Adicionalmente também são englobadas conforme a invenção tais cepas de produção de aminoácidos nas quais a degradação de L-serina é modificada ou enfraquecida. Isto pode se dar, por exemplo, por modificações de técnica genética direcionada em enzimas que degradam L-serina ou nos genes correspondentes. No seguinte devem ser nomeados como exemplo alguns microorganismos apropriados conforme a invenção. Esta seleção, no entanto, não é restritiva:

Corinebacterium glutaminucim ATCC13032,
Corinebacterium acetoglutaminicum ATCC15806,
Corinebacterium acetoacidofilum ATCC13870,
Corinebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,
Brevibacterium flavum ATCC14067,
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 ou
Brevibacterium divaricatum ATCC14020.

Objeto da presente invenção é também uma seqüência genética pabAB e pabC no.1, 3 e 5, que é caracterizada pelo fato de que uma parte da seqüência ter sido recortada através de uma deleção definida, de forma que possam resultar apenas aminodeoxicorismatsintase ou aminodeoxicorisliase inativas ou de atividade enfraquecida. A seqüência de genes pabABe pabC são preferencialmente isoladas dos microorganismos do gênero *corinebacterium* ou *brevibactrium*. Exemplares sejam aqui citados alguns microorganismos mais específicos:

Corinebacterium glutaminucim ATCC13032,
Corinebacterium acetoglutaminicum ATCC15806,
Corinebacterium acetoacidophilum ATCC13870,
Corinebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,
5 *Brevibacterium flavum* ATCC14067,
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 ou
Brevibacterium divaricatum ATCC14020.

Exemplo 1:

Construção de um plasmídeo pK19mobsacBDpabAB

10 O gene pabAB do *C. glutamicum* é substituído no cromossomo através de métodos conhecidos por um gene pabAB 1734 bp encurtado (J. Bacteriol. (1997) 179:6228-37; Gene (1994) 145:69-73). Para a construção do vetor utilizado na troca do gene foram sintetizados os primers citados em
15 seguida que foram derivados da seqüência de genoma publicamente acessível (NCBI Acession-Number YP_225287; NC_006958):

pabAB-del-A

5"-CGGGATCCTCAGGCTCGCACGYTTGGAGGG-3'

20 pabAB-del-B:

5"-CCCATCCACTAACTTAAACAAAACGTGAAAGAATCATCATAATT-3'

pabAB-del-C:

5"-TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGGAGTGGGAGGAAATCCGCGTT-3'

pabAB-del-D:

25 5'-GTGGATCCGCCCAAACACACGGTGGCGT-3'

O primer pabAB-del-A começa 522 bp antes do start da translação e pabAB-del-D 436bp atrás do stop da translação do gene pabAB. O primer pabAB-del-B se encontra 21 bp atrás do start da translação, o primer pabAB-del-C se encontra
30 66bp atrás do stop da translação e ambos dispõem

individualmente de uma região de linker complementar como é
dado em Link et al. (J. Bacteriol. (1997) 179:6228-37).
Paralelamente foram realizadas amplificações PCR com a
combinação de primers pabAB-del-A e pabAB-del-B, assim
5 como combinações de primers pabAB-del-B e pabAB-del-C com
DNA cromossomal de *C. glutamicum* ATCC13032. A reação PCR
foi realizada em 30 ciclos na presença de 200µg
deoxinucleotidtriofosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 60nM
de cada oligonucleotídeo correspondente, 100ng de DNA
10 cromossomal de *corinebacterium glutamicum*, ATCC13032, 1/10
do volume de tampão de reação de 10 vezes e 2,6 unidades de
uma mistura Taq-/Pwo-DNA-polimerase termoestável (Expand
High Fidelity PCR System da empresa Roche Diagnostics,
Mannheim, Alemanha) em um termocicler (PTC-100, MJ
15 Research, Inc., Watertown, USA), sob as seguintes
condições:

94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por
40 segundos. A etapa de elongação a 72°C foi prolongada
após 10 ciclos em 5 segundos por ciclo. Após uma reação PCR
20 o fragmento de 563bp de tamanho da região 5'-flanqueada,
assim como o fragmento de 528bp de tamanho da região 3'-
flanqueada, foi isolado de uma gel agarose de 0,8% com o
kit de extração de gel QIAExII (Qiagen) de acordo com
informações do fabricante, e ambos os fragmentos foram
25 inseridos como template na segunda PCR com os primers
pabAB-del-A e pabAB-delD. A amplificação se procedeu em 35
ciclos na presença de 200µg de deoxinucleotidtriofosfatos,
600nM de cada oligonucleotídeo correspondente, 20ng de cada
DNA-template do primeiro PCR, 1/10 volumes de uma reação
30 tampão de 10 vezes e 2,6 unidades de uma mistura Taq-/Pwo-

DNA-polimerase sob as seguintes condições:

94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 80 segundos. A etapa de elongação foi prolongada após 10 ciclos por 5 segundos cada. Após a reação PCR o fragmento de DNA de 1122bp de comprimento, que agora contém um gene pabAB inativado com uma deleção central de 1734bp de comprimento, obtido foi isolado de um gel de agarose de 0,8%, e clonado para dentro do vetor pK19mobsacB (Gene 145: 69-73 (1994)). O plasmídeo pK19mobsacBDpacAB daí resultante (figura 1) teve sua exatidão confirmada por seqüenciamento.

Exemplo 2:

Construção do plasmídeo pK19mobsacBDpacC

Análogo ao modo de execução descrito no exemplo 1, foi construído do *C. glutamicum* um vetor apropriado para a troca de genes para a deleção do gene pabC. Os primers para isso necessários para a amplificação do PCR foram por sua vez derivados da seqüência de genoma publicamente acessível (NCBI Acession-Nummer YP_225288.1; NC_006958). Eles são dados a seguir:

20 pabAB-del-A

5"-GAGGATCCAATCATTGCTGAGCTGCGCAG-3'

pabAB-del-B:

5"-CCCATCCACTAAACTTAAACAATCAACAACACTGTGGGTGTTGA-3'

pabAB-del-C:

25 5"-TGTTTAAGTTTGTAGTGGATGGGTGCGGTGAAGCCCTGGAATGAA-3'

pabAB-del-D:

5'-AGGGATCCGTGATGAGTCCGATCTCGGAA-3'

O primer pabC-del-A inicia 500bp antes do start de translação e pabC-del-D 500bp atrás do stop de translação do gene pabC. O primer pabC-del-B fica 51 bp atrás do start

de translação e o pabC-del-C 48 bp antes do stop de translação. Os últimos dois primers dispõem cada um de uma região complementar de linker. Paralelamente foi amplificada uma região 5'-flaqueada de 602bp de tamanho, com uma combinação de primer pabC-del-A e pabC-del-B, e uma região 3'-flaqueada de 597bp de tamanho, com uma combinação do primer pabC-del-C e pabC-del-D, do fragmento a ser deletado. A reação PCR foi realizada de acordo com o procedimento padrão, como por exemplo, no exemplo 1 com DNA cromossomal de *C. glutamicum* ATCC13032. Após da reação PCR os fragmentos de DNA contidos foram isolados com o kit de extrato de gel QIAExII (Qiagen) e ambos os fragmentos foram empregados como template de uma PCR subsequente. Como primer foram empregados pabC-del-A e pabC-del-D. A reação PCR foi realizada de acordo com o procedimento padrão, como por exemplo no exemplo 1 com DNA cromossomal de *C. glutamicum* ATCC13032. Após a reação o fragmento de DNA contido de 1178bp de tamanho, que agora contem o gen pabC inativado com uma deleção central de 585bp de comprimento, foi isolado de um gel de agarose 0,8% e ligado com um vetor pK19mobsacB (Schäfer et al. Gene 145: 69-73(1994)). Com a inserção de ligação a cepa *Escherichia coli* DH5amcr foi transformada (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América USA (1990) 87:4645-4649). O plasmídeo obtido pK19mobsacBDpabC (figura 2) foi verificado quanto à sua exatidão através de digestão restritiva e sequenciamento.

Exemplo 3:

Construção do plasmídeo pK19mobsacBDpabABC

Análogo a maneira de execução descrita no exemplo 1,

foi construído um vetor pK19mobsacBDpacABC apropriado para a deleção de do gene pabABC de *C. glutamicum* para a troca de genes. Os primers para isso necessários para a amplificação do PCR foram por sua vez derivados da
 5 seqüência de genoma publicamente acessível (NCBI Acession-Nummer YP_225287; YP_225288.1; NC_006958). Eles são dados a seguir:

pabABC-del-A:

5'-CGGGATCCTCAGGCTCGCACGTTGGAGGG-3'

10 pabABC-del-B:

5'-CCCATCCACTAAACTTAAACAAAACGTCAAAGAATCATAATT-3'

pabABC-del-C:

5'-TGTTTAAGTTTtagTGGATGGGTCGGTGAAGCCCTGGAATGAA-3'

pabABC-del-D:

15 5'-AGGGATCCGTGATGAGTCCGATCTCGGAA-3'

O primer pabABC-del-A inicia 500bp antes do start de translação e pabABC-del-D 500bp atrás do stop de translação do gene pabC. O primer pabABC-del-B fica 51 bp atrás do start de translação e o pabABC-del-C 48 bp antes do stop de
 20 translação. Os últimos dois primers dispõem cada um de uma região complementar de linker. Paralelamente foi amplificada uma região 5'-flaqueada de 593bp de tamanho, com uma combinação de primer pabABC-del-A e pabABC-del-B, e uma região 3'-flaqueada de 597bp de tamanho, com uma
 25 combinação do primer pabC-del-C e pabC-del-D, do fragmento a ser deletado. A reação PCR foi realizada de acordo com o procedimento padrão, como por exemplo, no exemplo 1 com DNA cromossomal de *C. glutamicum* ATCC13032. Após a reação PCR os fragmentos de DNA contidos foram isolados com o kit de
 30 extrato de gel QIAExII (Qiagen) e ambos os fragmentos foram

empregados como template de uma PCR subsequente. Como primer foram empregados pabABC-del-A e pabABC-del-D. A reação PCR foi realizada de acordo com o procedimento padrão, como por exemplo no exemplo 1 com DNA cromossomal de *C. glutamicum* ATCC13032. Após a reação o fragmento de DNA contido de 1169bp de tamanho, que agora contem o gen pabC inativado com uma deleção central de 585bp de comprimento, foi isolado de um gel de agarose 0,8% e ligado com um vetor pK19mobsacB (Schäfer et al. Gene 145: 69-73(1994)). Com a inserção de ligação a cepa *Escherichia coli* DH5amcr foi transformada (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América USA (1990) 87:4645-4649). O plasmídeo obtido pK19mobsacBDpabC (figura 3) foi verificado quanto à sua exatidão através de digestão restritiva e sequenciamento.

Exemplo 4:

Construção da cepa autotrófica de ácido fólico *C. glutamicum* DsdaADpabAB, *C. glutamicum* DsdaADpabC, *C. glutamicum* DsdaADpabABC.

Através de eletroporação um plasmídeo pK19mobsacBDpabAB, respectivamente pK19mobsacBDpabC e pK19mobsacBDpabABC, foi inserido no *C. glutamicum* DsdaA, que é descrito no pedido de patente PCT/DE2004/000248, e selecionado relativo a sua resistência à canamicina. Apenas tais clones, nos quais o plasmídeo estava integrado ao cromossomo através de recombinação homologa, eram resistentes à canamicina.

Foi escolhido um clone de cada, que após verificação mostrasse sensibilidade à sacarose transmitida pelo plasmídeo (Gene (1994) 145: 69-73. Este foi cultivado em um

meio de 50mL de BHI (Brain-Heart-Infusion-Medium, Difco Laboratories, Detroit, USA) sem canamicina e sacarose. Em seguida, cada 100µl de uma solução diluída 10⁻², 10⁻³ respectivamente 10⁻⁴, da cultura foi plaqueada em placas
 5 BHIS (meio BHI com 0,5M sorbitol) com 10% (p/v) de sacarose (FEMS Microbiol Lett (1989) 53: 299-303). Os clones resistentes à sacarose obtidos forem então verificados quanto à sensibilidade à canamicina e verificados com uma análise PCR. Nisto foram utilizadas as seguintes
 10 combinações de primer:

Deleção de pabAB:

pabAB-del-pr-u2 5'-TGGCTCACTTCGCTGGTCTTGTTG-3'

pabAB-del-pr-12 5'-GAATGGTTGCGGCGAGTGTCA-3'

Deleção de pabC:

15 pabC-del-pr-u2 5'-GTTGGGGAGCAGGACGAGTGGT-3'

pabC-del-pr-12 5'-TACGCGCATCTGGAATCCTGGTTA-3'

Deleção de pabABC:

pabABC-del-pr-u2 5'-CGTTCCGGCATCATCTGGCTAAG-3'

pabABC-del-pr-12 5'-GCGACTCCGGGTTGTTTCCTGATAA-3'

20 A deleção bem-sucedida deu para o local do gene pabAB uma faixa de 1426bp, para o local do gene pabC uma faixa de 1663bp e para o local do gene pabABC uma faixa de 1447bp. Desta forma puderam ser obtidos clones da cepa de partida, que dispõem cada de uma deleção específica nos genes da
 25 síntese de ácido fólico. Estas cepas foram denominadas *C. glutamicum* DsdaADpabAB, *C. glutamicum* DsdaADpabC e *C. glutamicum* DsdaADpabABC.

Estas três cepas foram plaqueadas em meio mínimo CGXII (J Bacteriol. (1993) 175:5595-603), bem como em meio
 30 idêntico que continha 1mM de ácido fólico. O resultado é

mostrado na tabela 1.

Tabela 1:

Necessidade de *Corynebacterium* pelos mutantes produzidos.

	Crescimento			
Ácido Fólico	C. Glu. DsdaA	C. Glu. DsdaADpabAB	C. Glu. DsdaADpabC	C. Glu. DsdaADpabABC
0 mM	+	-	-	-
1 mM	+	+	+	+

Exemplo 5:

Construção e formação de L-serina da cepa *C. glutamicum* DsdaADpabAB pserABC.

Através de eletroporação o plasmídeo pEC-T18-mob2-serAfbrserCserB foi inserido na cepa *C. glutamicum*. O plasmídeo (figura 4) é composta do vetor pEC-T18-mob2 (Curr. Microbiol (2002) 45, 362-367), do gene da *corinebacterium* serAfbr (Appl Microbiol. Biotechnol (2002) 60: 437-41), assim como serC e serB (pedido de patente alemão 100 44 831.3). Clones resistentes à tetraciclina foram verificados com processos padrões quanto à presença e integridade do plasmídeo (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) e um clone foi designado de *C. glutamicum* DsdaADpacAB pserABC.

Para a formação de L-serina a cepa *C. glutamicum* DsdaADpabAB pserABC foi colocada em meio complexo (CgIII com 2% de glicose, 5µg/l de tetraciclina) e o meio de fermentação CGXII (J. Bacteriol (1993) 175: 5595-5603) foi inoculado a partir desse. O meio de fermentação CGXII continha 0,1 ou 1mM de ácido fólico. Como controle a cepa

C. glutamicum DsdaA pserABC foi cultivada da mesma forma. Foram realizadas pelo menos duas fermentações independentes, cada. Após a cultura por 30 horas à 30°C no agitador de rotação a 120 rpm foi determinada quantidade de L-serina acumulada no meio. A análise da concentração de aminoácido se deu meio uma cromatografia líquida de alta pressão (J Chromat (1983) 266:471-482). O resultado da fermentação é representado na tabela 2. É visível que a utilização dos mutantes construídos e descritos na síntese de ácido fólico representam um processo que melhora decididamente a formação de L-serina.

Tabela 2:

Acumulação de L-serina no excesso de cultura de *C. glutamicum* DsdaADpabAB pserABC e *C. glutamicum* DsdaApserABC.

Ácido fólico	Cepa	L-serina (mM)
0,01	<i>C. glutamicum</i> DsdaADpabAB pserABC	49
0,1	<i>C. glutamicum</i> DpykDsdaADpabAB pserABC	89
1,0	<i>C. glutamicum</i> DpykDsdaADpabAB pserABC	2
0,01	<i>C. glutamicum</i> DsdaA pserABC	2
0,1	<i>C. glutamicum</i> DsdaA pserABC	1
1,0	<i>C. glutamicum</i> DsdaA pserABC	1

Exemplo 6:

Construção e formação de L-serina da cepa *C.*

glutamicum DpykDsdaADpabAB pserABC.

Através de uma eletroporação o plasmídeo pK19mobsacBDpyk (Arch Microbiol. (2004) 182:354-63) foi inserido na cepa *C. glutamicum* 13032DsdaADpabABC e selecionado em relação a resistência à canamicina. Apenas tais clones, nos quais o plasmídeo era integrado sobre uma recombinação homóloga no locus cromossomal do gene *pyk*, eram resistentes à canamicina. Foi escolhido um clone que após verificação mostrou sensibilidade à sacarose transmitida pelo plasmídeo e cultivado em um meio de 50ml de BHI (Brain-Heart-Infusion-Medium, Difco Laboratories, Detroit, USA) sem canamicina e sacarose. Em seguida, cada 100µl de uma solução diluída 10⁻², 10⁻³ respectivamente 10⁻⁴, da cultura foi plaqueada em placas BHIS (meio BHI com 0,5M sorbitol) com 10% (p/v) de sacarose. Os clones resistentes à sacarose obtidos foram então verificados quanto à sensibilidade à canamicina e verificados com uma análise PCR. Desta forma pode ser *C. glutamicum* DpykDsdaADpabAB da cepa de partida. Esta cepa foi transformada, como descrito no exemplo 5, com pEC-T18-mob2-serAfbrserCserB e foi assim obtida a cepa *C. glutamicum* DpykDsdaADpabABC. Esta cepa foi preferida, como descrito no exemplo 5, para a formação de L-serina, em comparação com *C. glutamicum* DsdaADpabAB pserABC. O resultado é mostrado na tabela 3.

Tabela 3:

Acumulação de L-serina no excesso de cultura de *C. glutamicum* DpykDsdaADpabAB pserABC e *C. glutamicum* DsdaADpabAB pserABC.

Ácido fólico	Cepa	L-serina (mM)
--------------	------	---------------

0,1	<i>C. glutamicum</i> DsdaADpabAB pserABC	89
0,1	<i>C. glutamicum</i> DpykDsdaADpabAB pserABC	98
1,0	<i>C. glutamicum</i> DpykDsdaADpabAB pserABC	2

Listagem de Sequência

Projeto do Pedido

<120> Título : PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE L-SERINA, SEQUÊNCIA DE GENE, VETORES
E MICROORGANISMOS

<130> Referência de arquivo de pedido: PT1.2240

<140> Nº de pedido relacionado:

<141> Data de depósito relacionada: _ _ _ _

Sequência

<213> Nome do organismo: *Corynebakterium glutamicum*

<400> Fita de Pré-sequência:

```

cgggatactc aggcctcgac gttggagggg gctegcattc ttgctgagcg tctgactgct      60
tctgatgcga aggccgctgg cgtggatgtc ttgaccggtg gcactgatgt gcacttggtt      120
ttggctgata tgcgtaactc ccagatggat ggccagcagg cggaagatct gctgcacgag      180
gttggtatca ctgtgaaccg taacgcgggt cctttcgatc ctctccacc aatggttact      240
tctggtctgc gtattggtac tcctgcgctg gctaccggtg gtttcgatat tcctgcattc      300
actgaggttg cagacatcat tggtagtctt ttggctaatt gtaagtccgc agacattgag      360
tctctgctgc gccgtgtagc aaagcttgcg gcagattacc cactgtatga gggcttgga      420
gactggacca tcgtctaagt ttttctttga gttttcatat gtagaaggca tcgtcggctt      480
eggcctggcg gtgcttttct cgttgttttg tggttttgtc agaggatgtc atgctgcttt      540
taattattga taattatgat tctttcacgt tttgtttaag tttagtggat ggggagtggg      600
aggaaatccg cgttaaatac cggcctctgc tgaatttgtt tgggggtgaa ttcccatgac      660
gtacctcgtg tgggacggtg caacactcgt agaaggcgcg ctggaaatcaa caccacagt      720
tgttgattcc tacctagcca aagaccaccg cgtggtgctc tgggatcttc atgaacagcg      780
cttcgccact agcgtggacg tggaccgctg ggattttctc cagcgagtaa gggaagcaat      840
tccacgccag ggctcatggt ttcccaaagt tgaatggcat ggcgatgac ttttcgcagt      900
caatattcgc ccggcaccaa cactgcgaaa ggccacatca ttgtggcttt ccgaagaccc      960
agatccagcg acacagccaa ccattaaagg ccagaccta gatgtgcttg ctacacctcg      1020
cagtcgcgcc aacgataacg gctgcgatga tgcgtgttg atcagcgcgg atgggttcat      1080
tctggaagct gccaacgcca ccgtggtgtt ttgggcggat cc                          1122

```

<212> Tipo: DNA

<211> comprimento: 1122

Nome da sequência: Sequência nº1

Descrição da Sequência:

Sequência Padrão

Nome da sequência: Sequência nº1

Sequência:

<213> Nome do organismo: *Corynebakterium glutamicum*

<400> Fita de Pré-sequência:

```

cgataagcta gcttcacgct gccgcaagca ctgagggcgc aagggctgct aaaggaagcg      60
gaacacgtag aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgacct cggatgaatg tcagctactg      120
ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct      180

```

tacatggcga tagctagact gggcgggttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc	240
tggggcgccc tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc	300
gccaaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt	360
tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct	420
attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttcgggct	480
gtcagcgagc gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccgggtg ccctgaatga	540
actccaagac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc	600
tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg	660
gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc	720
aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccc aacgaccacc aagcgaacaa	780
tgcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccgggtctt gtcgatcagg atgatctgga	840
cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggcctcaagg cgcggatgcc	900
cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga	960
aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca	1020
ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg	1080
cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgcag cgcatcgctt tctatcgctt	1140
tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcta gaggatcgat cctttttaac	1200
ccatcacata tacctgccgt tcaactattat ttagtgaaat gagatattat gatattttct	1260
gaattgtgat taaaaaggca actttatgcc catgcaacag aaactataaa aaatacagag	1320
aatgaaaaga aacagataga ttttttagtt ctttagggcc gtagtctgca aatcctttta	1380
tgattttcta tcaaacaaaa gaggaaaata gaccagttgc aatccaaacg agagtctaata	1440
agaatgaggt cgaaaagtaa atcgcgcggg tttgttactg ataaagcagg caagacctaa	1500
aatgtgtaaa gggcaaagtg tatactttgg cgtcaccctt tacatatatt aggtcttttt	1560
ttattgtgcg taactaactt gccatcttca aacaggaggg ctggaagaag cagaccgcta	1620
acacagtaca taaaaaagga gacatgaacg atgaacatca aaaagtttgc aaaacaagca	1680
acagtattaa cttttactac cgcactgctg gcaggaggcg caactcaagc gtttgcgaaa	1740
gaaacgaacc aaaagccata taaggaaaca tacggcattt cccatattac acgccatgat	1800
atgctgcaaa tccctgaaca gcaaaaaaat gaaaaatatc aagtttctga atttgattcg	1860
tccacaatta aaaatatctc ttctgcaaaa ggcctggacg tttgggacag ctggccatta	1920
caaaacgctg acggcactgt cgcaaaactat cacggctacc acatcgtctt tgcattagcc	1980
ggagatecta aaaatgcgga tgacacatcg atttacatgt tctatcaaaa agtcggcgaa	2040
acttctattg acagctggaa aaacgctggc cgcgtcttta aagacagcga caaattcgat	2100
gcaaatgatt ctatcctaaa agaccaaaaa caagaatggt caggttcagc cacatttaca	2160
tctgacggaa aaatccgttt attctacact gatttctccg gtaaacatta cggcaaacaa	2220

acactgacaa	ctgcacaagt	taacgtatca	gcatacagaca	gctcttttgaa	catcaacggt	2280
gtagaggatt	ataaatcaat	ctttgacggt	gacggaaaaa	cgtatcaaaa	tgtacagcag	2340
ttcatcgatg	aaggcaacta	cagctcaggc	gacaaccata	cgctgagaga	tcctcactac	2400
gtagaagata	aaggccacaa	atacttagta	tttgaagcaa	acactggaac	tgaagatggc	2460
taccaaggcg	aagaatcttt	atttaacaaa	gcatactatg	gcaaaagcac	atcattcttc	2520
cgtcaagaaa	gtcaaaaact	tctgcaaagc	gataaaaaac	gcacggctga	gttagcaaac	2580
ggcgctctcg	gtatgattga	gctaaacgat	gattacacac	tgaaaaaagt	gatgaaaccg	2640
ctgattgcat	ctaacacagt	aacagatgaa	attgaacgcg	cgaacgtctt	taaaatgaac	2700
ggcaaatggg	acctgttcac	tgactcccg	ggatcaaaaa	tgacgattga	cggcattacg	2760
tctaacgata	tttcatgct	tggttatgtt	tctaattctt	taactggccc	atacaagccg	2820
ctgaacaaaa	ctggccttgt	gttaaaaatg	gatcttgatc	ctaacgatgt	aacctttact	2880
tactcacact	tcgctgtacc	tcaagcgaaa	ggaaacaatg	tcgtgattac	aagctatatg	2940
acaaacagag	gattctacgc	agacaaaaca	tcaacgtttg	cgccgagctt	cctgctgaac	3000
atcaaaggca	agaaaacatc	tgttgtcaaa	gacagcatcc	ttgaacaagg	acaattaaca	3060
gttaacaaat	aaaaacgcaa	aagaaaatgc	cgatgggtac	cgagcgaaat	gaccgaccaa	3120
gcgacgcccc	acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	3180
ggcttcggaa	tcgttttccg	ggacgcccct	gcggacgtgc	tcatagtcca	cgacgcccgt	3240
gattttgtag	ccctggccga	cggccagcag	gtaggccgac	aggctcatgc	cggccgcccgc	3300
cgccctttcc	tcaatcgctc	ttcgttcgtc	tggaaggcag	tacacettga	taggtgggct	3360
gcccttctctg	gttggcttgg	tttcatcagc	catccgcttg	ccctcatctg	ttacgccggc	3420
ggtagccggc	cagcctcgca	gagcaggatt	cccgttgagc	accgccagggt	gcgaataagg	3480
gacagtgaag	aagggaacacc	cgctcgcggg	tgggcctact	tcacctatcc	tgccccgctg	3540
acgccgttgg	atacaccaag	gaaagtctac	acgaaccctt	tggcaaaatc	ctgtatatcg	3600
tgcgaaaaag	gatggatata	ccgaaaaaat	cgctataatg	accccgaaagc	agggttatgc	3660
agcggaaaaag	cgctgcttcc	ctgctgtttt	gtggaatatc	taccgactgg	aaacaggcaa	3720
atgcaggaaa	ttactgaact	gaggggacag	gcgagagacg	atgccaaaga	gtcctgaaa	3780
atctcgataa	ctcaaaaaat	acgcccggta	gtgatcttat	ttcattatgg	tgaaagttgg	3840
aacctcttac	gtgccgatca	acgtctcatt	ttcgccaaaa	gttggcccag	ggcttcccgg	3900
tatcaacagg	gacaccagga	tttatttatt	ctgcgaagtg	atcttccgtc	acaggtatct	3960
attcggcgca	aagtgcgtcg	ggtgatgctg	ccaacttact	gatttagtgt	atgatggtgt	4020
ttttgaggtg	ctccagtggc	ttctgtttct	atcagctect	gaaaatctcg	ataactcaaa	4080
aaatacgccc	ggtagtgatc	ttatttcatt	atgggtgaaag	ttggaacctc	ttacgtgccg	4140
atcaacgtct	cattttcgcc	aaaagttggc	ccagggcttc	ccggtatcaa	cagggacacc	4200
aggatttatt	tattctgcga	agtgatcttc	cgtcacaggt	atttattcgg	cgcaaagtgc	4260

gtcgggtgat gctgccaaact tactgattta gtgtatgatg gtgtttttga ggtgctccag	4320
tggctttctgt ttctatcagg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	4380
cttcgcccac cccaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat	4440
cccttaacgt gagtttttctg tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	4500
ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct	4560
accagcgggtg gtttggtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg	4620
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagt tagccgtagt taggccacca	4680
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgcctctg ctaatcctgt taccagtggc	4740
tgtgccaggt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga	4800
taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac	4860
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttccga	4920
agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	4980
ggagcttcca gggggaaacg cctgggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg	5040
acttgagcgt cgattttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag	5100
caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc	5160
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc	5220
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgccc	5280
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag	5340
gtttcccgac tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca	5400
ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttggtg gaattgtgag	5460
cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc ttgcatgcct	5520
gcaggctgac tctagaggat ccgccccaaa caccacggtg gcgttggcag cttccagaat	5580
gaaccatcc gcgctgatca acagcgcatc atcgcagccg ttatcgttgg cgcgactgag	5640
aaggtagca agcacatcta ggtctgggccc tttaatggtt ggctgtgtgc gtggatctgg	5700
gtcttcggaa agccacaatg atgtggcctt tcgcagtgtt ggtgccgggc gaatattgac	5760
tgcgaaaaga tcatcgccat gccattcaac tttgggaaac catgagccct ggcgtggaat	5820
tgcttccctt actgcgtgga gaaaatccca cgggtccacg tccacgctag tggcgaagcg	5880
ctgttcatga agatcccagc gcaccacgag gtggtctttg gctaggtagg aatcaacaac	5940
tgtgggtggt gattccagcg cgccttctac gagtgttgca ccgtcccaca cgaggtagct	6000
catgggaatt caaccccaaa caaattcagc agaggccgtg atttaacgag gatttcctcc	6060
cactcccat ccactaaact taaacaaaac gtgaaagaat cataattatc aataattaaa	6120
acgcgcatga catcctctga caaaaccaca aaacaacgag aaaagcaccg ccaggccgaa	6180
gccgacgatg ccttctacat atgaaaactc aaagaaaaac ttagacgatg gtccagtctt	6240
ccaagccctc atacagtggg taatctgcag caagctttgc tacacggcca cgcagagact	6300

caatgtctgc ggacttacca ttagccaaag cagtaccaat gatgtctgca acctcagtga	6360
atgcaggaat atcgaaacca cgggtagcca gcgcaggagt accaatacgc agaccagaag	6420
taaccattgg tggacgagga tcgaaaggaa ccgcgttacg gttcacagtg ataccaacct	6480
cgtgcagcag atcttcgcc tgctggccat ccatctggga gttacgcaga tcagccaaaa	6540
ccaagtgcac atcagtgcc cgggtcaaga catccacgcc agcggccttc gcatacagaag	6600
cagtgcagcag ctacgcaaga atgcgagcac cctccaacgt gcgagcctga ggatccccgg	6660
gtaccgagct cgaattcact ggcgcgtcgt ttacaacgtc gtgactggga aaacctggc	6720
gttacccaac ttaatcgct tgcagcacat ccccccttcg ccagctggcg taatagcgaa	6780
gaggcccgca ccgatcgccc ttccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggcg	6836

<212> Tipo: DNA

<211> comprimento: 6836

Nome da sequência: Sequência nº 2

Descrição da Sequência:

Sequência Padrão

Nome da sequência: Sequência nº 2

Sequência

<213> Nome do organismo: Corynebakterium glutamicum

<400> Fita de Pré-sequência:

gaggatccaa tcattgctga gctgcgcagt aatcctaaag atcgtgcaga aaacttgatg	60
atcgtggatt tggctccgcaa cgacttagcc cgcggcgctt tgcccaccac agttaaaaca	120
tccaagcttt tcgacgtcga aacctacgcc acagtcacc aacttgtcag caccgtctct	180
gcagagttgg ggccacgcag tccgattgag tgcgtgcgcg cagcattccc cggtggttcg	240
atgactgggt ccccaaagct gcgcaccatg gagatcatcg atgagctgga ggcagctcct	300
cgcggtatctt actcaggtgg cttgggatat ttttccctcg acggcgcagt tgatctctcc	360
atggtgatca gaactctcgt catccagaac aatcacgtgg agtacggagt gggcgggtgca	420
cttcttgctc tgtctgatcc ggaggctgag tgggaggaaa tccgcgttaa atcacggcct	480
ctgctgaatt tgtttggggt tgaattccca tgacgtacct cgtgtgggac ggtgcaacac	540
tcgtagaagg cgcgctggaa tcaacaccca cagttgttga ttgtttaagt ttagtggatg	600
ggtcgggtgaa gccctggaat gaaaaattgc gcccaaccat ttttctgtga ggaaaaggtt	660
gagcgcagtc tttgtgaaga tttagtcttc ggtagtcttc tcagtttctt tctttgcggt	720
ttcgcgacct tcagcaagct gtgtgcgtgc ggtgcgcaac cattctggct ggttttccag	780
aagtgccttg atctcggcgg tggtcagtgg tttgtccatg tcgttctttt tcagagccgc	840
gatggtgatg cccaattttt gggcgaccac tggacgaggg tgtgggcccct cgcggcgtag	900
ggtttggagc cactccggtg ggttttcctg caggttcttg aactcttggg gagtcaatgc	960
acctgttttg aactcctctg gcgtggcggg caaaaacagt ccgagcttct tagcggcggg	1020
ctgtggcttc atagccctgc ccgatggctg gcgtacagat tcttcgttca cgcccacaac	1080

ggtagcattg ttttcatgct gaccttaagt ttcactactg gcacggagcc aggaaagtgg 1140

tttaccgat tccgaatcg gactcatcac ggatccct 1178

<212> Tipo: DNA

<211> comprimento: 1178

Nome da sequência: Sequência nº 3

Descrição da Sequência:

5

Sequência Padrão

Nome da sequência: Sequência nº3

Sequência

<213> Nome do Organismo: Corynebacterium glutamicum

<400> Fita de Pré Sequência:

cgataagcta gcttcacgct gccgcaagca ctcagggcgc aagggtgct aaaggaagcg	60
gaacacgtag aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg	120
ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaag caggtagctt gcagtgggct	180
tacatggcga tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc	240
tggggcgccc tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc	300
gccaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt	360
tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct	420
attcggtat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tggtccggct	480
gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga	540
actccaagac gaggcagcgc ggctatctgt gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc	600
tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg	660
gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc	720
aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgccca ttcgaccacc aagcgaataa	780
tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga	840
cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggetcaagg cgcggatgcc	900
cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga	960
aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca	1020
ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg	1080
cttctcgtg ctttacggtg tcgccgctcc cgattcgag cgcacgcct tctatcgctt	1140
tcttgacgag ttcttctgag cgggactctg gggttcgcta gaggatcgat ctttttaac	1200
ccatcacata tacctgccgt tcaactattat ttagtgaaat gagatattat gatattttct	1260
gaattgtgat taaaaaggca actttatgcc catgcaacag aaactataaa aaatacagag	1320
aatgaaaaga aacagataga ttttttagtt' ctttagggcc gtagtctgca aatcctttta	1380
tgattttcta tcaaacaaaa gaggaaaata gaccagttgc aatccaaacg agagtcta	1440
agaatgaggt cgaaaagtaa atcgcgcggg tttgttactg ataaagcagg caagacctaa	1500
aatgtgtaaa gggcaaagtg tatacttttg cgtcacccct tacatatttt aggtcttttt	1560

ttattgtgcg taactaactt gccatcttca aacaggaggg ctggaagaag cagaccgcta	1620
acacagtaca taaaaaagga gacatgaacg atgaacatca aaaagtttgc aaaacaagca	1680
acagtattaa cctttactac cgcactgctg gcaggaggcg caactcaagc gtttgcgaaa	1740
gaaacgaacc aaaagccata taaggaaaca tacggcattt cccatattac acgccatgat	1800
atgctgcaaa tccctgaaca gcaaaaaaat gaaaaatattc aagtttctga atttgattcg	1860
tccacaatta aaaatatctc ttctgcaaaa ggcctggacg tttgggacag ctggccatta	1920
caaaacgctg acggcactgt cgcaaaactat cacggctacc acatcgtctt tgcattagcc	1980
ggagatccta aaaatgcgga tgacacatcg atttcatgt tctatcaaaa agtcggcgaa	2040
acttctattg acagctggaa aaacgctggc cgcgtcttta aagacagcga caaatcgtat	2100
gcaaatgatt ctatcctaaa agaccaaaaca caagaatggc cagggttcagc cacatttaca	2160
tctgacggaa aaatccgtrt attctacact gatttctccg gtaaacatta cggcaaacaa	2220
acactgacaa ctgcacaagt taacgtatca gcacagaca gctctttgaa catcaacggc	2280
gtagaggatt ataaatcaat ctttgacggc gacggaaaaa cgtatcaaaa tgtacagcag	2340
ttcatcgatg aaggcaacta cagctcaggc gacaaccata cgctgagaga tccctactac	2400
gtagaagata aaggccacaa atacttagta tttgaagcaa acactggaac tgaagatggc	2460
taccaaggcg aagaatcttt atttaacaaa gcatactatg gcaaaagcac atcattcttc	2520
cgtcaagaaa gtcaaaaact tctgcaaagc gataaaaaac gcacggctga gttagcaaac	2580
ggcgtctctg gtatgattga gctaaacgat gattacacac tgaaaaaagt gatgaaaccg	2640
ctgattgcat ctaacacagt aacagatgaa attgaacgcg cgaacgtctt taaaatgaac	2700
ggcaaatggc acctgttcac tgactcccg gcgatcaaaaa tgacgattga cggcattacg	2760
tctaacgata ttacatgct tggttatgtt tctaattctt taactggccc atacaagccg	2820
ctgaacaaaa ctggccttgt gttaaaaatg gatcttgatc ctaacgatgt aacctttact	2880
tactcacact tcgctgtacc tcaagcgaaa ggaaacaatg tcgtgattac aagctatatg	2940
acaaacagag gattctacgc agacaaacaa tcaacgtttg cggcgagctt cctgctgaac	3000
atcaaaggca agaaaacatc tgttgtcaaa gacagcatcc ttgaacaagg acaattaaca	3060
gttaacaaat aaaaacgcaa aagaaaatgc cgaagggtac cgagcgaaat gaccgaccaa	3120
gcgacgccc aacctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg	3180
ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccctc gcggacgtgc tcatagtcca cgacgcccg	3240
gattttgtag ccctggccga cggccagcag gtagggccgac aggctcatgc cggccgccgc	3300
cgctttttcc tcaatcgctc ttcgttcgtc tggaaggcag tacaccttga taggtgggct	3360
gcccttctctg gttggcttgg ttcatcagc catccgcttg ccctcatctg ttacgccggc	3420
ggtagccggc cagcctcgca gagcaggatt cccgttgagc accgccaggc gcgaataagg	3480
gacagtgaag aaggaacacc cgctcgcggg tgggcctact tcacctatcc tgccccgctg	3540
acgccgttgg atacaccaag gaaagtctac acgaacctt tggcaaaatc ctgtatatcg	3600

tgcgaaaaag gatggatata ccgaaaaaat cgctataatg accccgaagc agggttatgc	3660
agcggaagaaag cgctgcttcc ctgctgtttt gtggaatata taccgactgg aaacaggcaa	3720
atgcaggaaa ttactgaact gaggggacag gcgagagacg atgccaaaga gtcctgaaa	3780
atctcgataa ctcaaaaaat acgcccggta gtgatcttat ttcattatgg tgaaagtgg	3840
aacctcttac gtgccgatca acgtctcatt ttcgccaaaa gttggcccag ggcttcccgg	3900
tatcaacagg gacaccagga tttatttatt ctgcgaagtg atcttccgtc acagggtattt	3960
attcggcgca aagtgcgtcg ggtgatgctg ccaacttact gatttagtgt atgatggtgt	4020
ttttgaggtg ctccagtggc ttctgtttct atcagctcct gaaaatctcg ataactcaa	4080
aaatacgccc ggtagtgatc ttatttcatt atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg	4140
atcaacgtct cattttcgcc aaaagttggc ccagggttc ccggtatcaa cagggaacc	4200
aggatttatt tattctgca agtgatcttc cgtcacagggt atttattcgg cgcaagtgc	4260
gtcgggtgat gctgccaaact tactgattta gtgtatgatg gtgtttttga ggtgctccag	4320
tggcttctgt ttctatcagg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	4380
cttcgccac cccaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat	4440
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	4500
ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct	4560
accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactgg	4620
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca	4680
cttcaagaac tctgtagcac cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc	4740
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggaac tcaagacgat agttaccgga	4800
taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac	4860
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttccga	4920
agggagaaaag gcggacagg atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	4980
ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg	5040
acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag	5100
caacgcggcc tttttacggg tcttgccctt ttgctggcct tttgtccaca tgtttttcc	5160
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc	5220
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcggcc	5280
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag	5340
gtttcccgac tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca	5400
ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttggtg gaattgtgag	5460
cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaaag ttgcatgcct	5520
gcaggctgac tctagaggat ccaatcattg ctgagctgcg cagtaatcct aaagatcgtg	5580
cagaaaactt gatgatcgtg gatttggtcc gcaacgactt agcccgggc gctttgccca	5640

```

ccacagttaa aacatccaag cttttcgacg tcgaaaccta cgccacagtc caccaacttg 5700
tcagcaccgt ctctgcagag ttggggccac gcagtcgcat tgagtgcgtg cgcgagcat 5760
tccccggtgg ttcgatgact ggtgccccaa agctgcgcac catggagatc atcgatgagc 5820
tggaggcagc tcctcgcggt attactcag gtggcttggg atatTTTTcc ctcgacggcg 5880
cagttgatct ctccatggtg atcagaactc tcgtcatcca gaacaatcac gtggagtacg 5940
gagtgggcgg tgcacttctt gctctgtctg atccggaggc tgagtgggag gaaatccgcg 6000
ttaaatcacg gcctctgctg aatttgtttg gggttgaatt cccatgacgt acctcgtgtg 6060
ggacgggtgca acactcgtag aaggcgcgct ggaatcaaca cccacagttg ttgattgttt 6120
aagtttagtg gatgggtcgg tgaagccctg gaatgaaaaa ttgcgccccaa ccatttttct 6180
gtgaggaaaaa ggttgagcgc agtctttgtg aagatttagt cttcggtagt ttcttcagtt 6240
tctttctttg cggtttcgcg accttcagca agctgtgtgc gtgcggtgcg caaccattct 6300
ggctggtttt ccagaagtgc cttgatctcg gcggtggta catggttgc catgtcgttc 6360
tttttcagag ccgcgatggt gatgccaat ttttgggcga cactggacg aggggtgtggg 6420
ccctcgcggc gtaggggttg gagccactcc ggtgggtttt cctgcagggtt cttgaactct 6480
tggtgagtca atgcacctgt ttggaactcc tctggcgtgg cgggcaaaaa cagtccgagc 6540
ttcttagcgg cggctctgtg cttcatagcc ctgcccgatg gctggcgtac agattcttcg 6600
ttcacgcccc caacggtagc attgttttca tgcctgacctt aagtttcatt actggcacgg 6660
agccaggaaa gtggtttacc cgattccgag atcggactca tcacggatcc ccgggtaccg 6720
agctcgaatt cactggccgt cgttttataa cgtcgtgact gggaaaacc tggcgttacc 6780
caacttaatc gccttgcagc acatccccct ttcgccagct ggcgtaatag cgaagaggcc 6840
cgacccgac gcccttccca acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg 6890

```

<212> Tipo: DNA

<211> comprimento: 6890

Nome da sequência: Sequência nº 4

Descrição da Sequência:

Sequência Padrão

Nome da sequência: Sequência nº 4

Sequência

<213> Nome do Organismo: Corynebacterium glutamicum

<400> Fita de Pré Sequência:

```

cgggacccctc aggcctgcac gttggagggt gctcgattc ttgctgagcg tctgactgct 60
tctgatgcga aggccgctgg cgtggatgtc ttgaccggtg gcactgatgt gcacttggtt 120
ttggctgac tgcgtaactc ccagatggat ggccagcagg cggaaagatct gctgcacgag 180
gttggatatca ctgtgaaccg taacgcgggt ctttctgac ctgctccacc aatgggttact 240
tctggctctgc gtattggtac tcctgcgctg gctaccggtg gtttcgatat tcctgcattc 300
actgaggttg cagacatcat tggtaactgt ttggctaata gtaagtccgc agacattgag 360
tctctgcgtg gccgtgtagc aaagcttgcg gcagattacc cactgtatga gggcttggaa 420

```

```

gactggacca tcgtctaagt ttttctttga gttttcatat gtagaaggca tcgtcggctt 480
cggcctggcg gtgcttttct cgttggtttg tggttttgtc agaggatgtc atgcgcgttt 540
taattattga taattatgat tctttcacgt tttgtttaag tttagtggat gggtcggatga 600
agccctggaa tgaaaaattg cggccaacca tttttctgtg aggaaaagggt tgagcgcagt 660
ctttgtgaag atttagtctt cggtagtttc ttcagtttct ttctttgcgg tttcgcgacc 720
ttcagcaagc tgtgtgcgtg cgggtgcgca ccattctggc tggttttcca gaagtgcctt 780
gatctcggcg gtggtcagtg gtttgtccat gtcgttcttt ttcagagccg cgatggatgat 840
gccaattttt tgggcgacca ctggacgagg gtgtgggccc tcgcggcgta gggtttggag 900
ccactccggg gggttttcct gcaggttctt gaactcttgg tgagtcaatg cacctgtttg 960
gaactcctct ggcgtggcgg gcaaaaacag tccgagcttc ttagcggcgg tctgtggctt 1020
catagccctg cccgatggct ggcgtacaga ttcttcgttc acgcccacaa cggtagcatt 1080
gttttcatgc tgaccttaag tttcatcact ggcacggagc caggaaagtg gtttaccgga 1140
ttccgagatc ggactcatca cggatccct 1169

```

<212> Tipo: DNA

<211> comprimento: 1169

Nome da sequência: Sequência nº 5

Descrição da Sequência:

Sequência Padrão

Nome da sequência: Sequência nº 5

Sequência

<213> Nome do Organismo: Corynebacterium glutamicum

<400> Fita de Pré Sequência:

```

cgataagcta gcttcacgct gccgcaagca ctcagggcgc aagggtctgt aaaggaagcg 60
gaacacgtag aaagccagtc cgcagaaacg gtgtgaccc cggatgaatg tcagctactg 120
ggctatctgg acaagggaaa acgcaagcgc aaagagaaaag caggtagctt gcagtgggct 180
tacatggcga tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaaccgg aattgccagc 240
tggggcgccc tctggtaagg ttgggaagcc ctgcaaagta aactggatgg ctttcttgcc 300
gccaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcggt 360
tcgcatgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct 420
attcggctat gactgggcac aacagacaat cggctgctct gatgccgccg tgttccggct 480
gtcagcgtag gggcgcccgg ttctttttgt caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga 540
actccaagac gaggcagcgc ggctatcgtg gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc 600
tgtgtctgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg 660
gcaggatctc ctgtcatctc accttgcttc tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc 720
aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc tacctgcccc ttcgaccacc aagcgaaaca 780
tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga agccgggtctt gtcgatcagg atgatctgga 840
cgaagagcat caggggctcg cgccagccga actgttcgcc aggctcaagg cgcggatgcc 900

```

cgacggcgag gatctcgtcg tgacccatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatgggtgga	960
aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca	1020
ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg	1080
cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc cgattcgag cgcatcgctt tctatcgctt	1140
tcttgacgag tctttctgag cgggactctg gggttcgta gaggatcgat cctttttaac	1200
ccatcacata tacctgccgt tcactattat ttagtgaaat gagatattat gatattttct	1260
gaattgtgat taaaaaggca actttatgcc catgcaacag aaactataaa aaatacagag	1320
aatgaaaaga aacagataga ttttttagtt ctttaggccc gtagtctgca aatcctttta	1380
tgattttcta tcaaacaaaa gaggaaaata gaccagtgc aatccaaacg agagtcta	1440
agaatgaggt cgaaaagtaa atcgcgcggt tttgttactg ataaagcagg caagacctaa	1500
aatgtgtaaa gggcaaagtg tatacttttg cgtcacccct tacatatttt aggtcttttt	1560
ttattgtgcg taactaactt gccatcttca aacaggaggg ctggaagaag cagaccgcta	1620
acacagtaca taaaaaagga gacatgaacg atgaacatca aaaagtttgc aaaacaagca	1680
acagtattaa cctttactac cgcactgctg gcaggaggcg caactcaagc gtttgcgaaa	1740
gaaacgaacc aaaagccata taaggaaaca tacggcattt cccatattac acgccatgat	1800
atgctgcaaa tcctgaaca gcaaaaaaat gaaaaatgc aagtttctga atttgattcg	1860
tccacaatta aaaatatctc ttctgcaaaa ggcctggacg ttgaggacag ctggccatta	1920
caaaacgctg acggcactgt cgcaaaactat cagggtacc acatcgtctt tgcattagcc	1980
ggagatccta aaaatgcgga tgacacatcg atttacatgt tctatcaaaa agtcggcgaa	2040
acttctattg acagctggaa aaacgctggc cgcgtcttta aagacagcga caaatcagat	2100
gcaaatgatt ctatcctaaa agaccacaaca caagaatggt cagggttcagc cacatttaca	2160
tctgacggaa aaatccgttt attctacact gatttctccg gtaaacatta cggcaaacaa	2220
acactgacaa ctgcacaagt taacgtatca gcacagaca gctctttgaa catcaacggt	2280
gtagaggatt ataatcaat ctttgacggt gacggaaaaa cgtatcaaaa tgtacagcag	2340
ttcatcgatg aaggcaacta cagctcaggc gacaaccata cgctgagaga tcttcaactac	2400
gtagaagata aaggccacaa atacttagta tttgaagcaa aacttggaaac tgaagatggc	2460
taccaaggcg aagaatcttt atttaacaaa gcatactatg gcaaaagcac atcattcttc	2520
cgtcaagaaa gtcaaaaact tctgcaaagc gataaaaaac gcacggctga gttagcaaac	2580
ggcgtctctg gtatgattga gctaaacgat gattacacac tgaaaaaagt gatgaaaccg	2640
ctgattgcat ctaacacagt aacagatgaa attgaacgcg cgaacgtctt taaaatgaac	2700
ggcaaatggt acctgttcac tgactcccgc' ggatcaaaaa tgacgattga cggcattacg	2760
tctaacgata ttacatgct tggttatgtt tctaattctt taactggccc atacaagccg	2820
ctgaacaaaa ctggccttgt gttaaaaatg gatcttgatc ctaacgatgt aacctttact	2880
tactcacact tcgctgtacc tcaagcgaaa ggaaacaatg tcgtgattac aagctatatg	2940

acaaacagag gattctacgc agaçaacaa tcaacgtttg cgccgagctt cctgctgaac	3000
atcaaaggca agaaaacatc tgttgtcaaa gacagcatcc ttgaacaagg acaattaaca	3060
gttaacaaat aaaaacgcaa aagaaaatgc cgatgggtac cgagcgaat gaccgaccaa	3120
gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg	3180
ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccctc gcggacgtgc tcatagtcca cgacgcccgt	3240
gattttgtag ccctggccga cggccagcag gtaggccgac aggcctcatgc cggccgcccgc	3300
cgctttttcc tcaatcgtc ttcgttcgtc tggaaggcag tacacctga taggtgggct	3360
gcccttcctg gttggcttgg tttcatcagc catccgcttg cctcatctg ttacgccggc	3420
ggtagccggc cagcctcgca gagcaggatt cccgttgagc accgccaggt gcgaataagg	3480
gacagtgaag aaggaacacc cgctcgcggg tgggcctact tcacctatcc tgccccgctg	3540
acgccgttgg atacaccaag gaaagtctac acgaaccctt tggcaaaatc ctgtatatcg	3600
tgcgaaaaag gatggatata ccgaaaaaat cgctataatg accccgaagc agggttatgc	3660
agcgaaaaag cgctgcttcc ctgctgtttt gtggaatatc taccgactgg aaacaggcaa	3720
atgcaggaaa ttactgaact gaggggacag gcgagagacg atgccaaaga gtcctgaaa	3780
atctcgataa ctcaaaaaat acgcccggta gtgatcttat ttcattatgg tgaaagtgg	3840
aacctcttac gtgccgatca acgtctcatt ttcgcaaaa gttggcccag ggcttcccgg	3900
tatcaacagg gacaccagga tttatttatt ctgcgaagtg atcttccgtc acaggatttt	3960
attcggcgca aagtgcgtcg ggtgatgctg ccaacttact gatttagtgt atgatggtgt	4020
ttttgagggtg ctccagtggc ttctgtttct atcagctcct gaaaatctcg ataactcaa	4080
aaatacgccc ggtagtgatc ttatttcatt atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg	4140
atcaacgtct ctttttcgcc aaaagttggc ccagggttc ccggtatcaa caggacacc	4200
aggatttatt tattctgcga agtgatcttc cgtcacaggt atttatccgg cgcaaagtgc	4260
gtcgggtgat gctgccaaact tactgattta gtgtatgatg gtgtttttga ggtgctccag	4320
tggcttctgt ttctatcagg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	4380
cttcgcccac cccaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat	4440
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	4500
ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct	4560
accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactgg	4620
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca	4680
cttcaagaac tctgtagcac cgctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc	4740
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgagc tcaagacgat agttaccgga	4800
taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac	4860
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga	4920
agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	4980

```

ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcggggttc gccacctctg 5040
acttgagcgt cgatTTTTgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag 5100
caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 5160
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataaccgc 5220
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgccc 5280
aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct ggcacgacag 5340
gtttcccgcg tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca 5400
ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttggttg gaattgtgag 5460
cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc ttgcatgcct 5520
gcaggctcgac tctagaggat cctcaggctc gcacgttgga ggggtgctcg attcttgctg 5580
agcgtctgac tgcttctgat gcgaaggccg ctggcgtgga tgtcttgacc ggtggcactg 5640
atgtgcactt ggttttggct gatctgcgta actcccagat ggatggccag caggcggaag 5700
atctgctgca cgaggttggt atcactgtga accgtaacgc ggttcctttc gatcctcgtc 5760
caccaatggt tacttctggt ctgctatttg gtactcctgc gctggctacc cgtggtttcg 5820
atattcctgc attcactgag gttgcagaca tcattggtac tgctttggct aatggtaagt 5880
ccgcagacat tgagtctctg cgtggccgtg tagcaaagct tgctgcagat taccactgt 5940
atgagggcct ggaagactgg accatcgtct aagtttttct ttgagttttc atatgtagaa 6000
ggcatcgtcg gcttcggcct ggcgggtgctt ttctcgttgt tttgtggttt tgcagagga 6060
tgtcatgcgc gttttaatta ttgataatta tgattctttc acgttttggt taagtttagt 6120
ggatgggtcg gtgaagccct ggaatgaaaa attgcgcca accatttttc tgtgaggaaa 6180
aggttgagcg cagtctttgt gaagatttag tcttcggtag tttcttcagt ttctttcttt 6240
gcggtttcgc gaccttcagc aagctgtgtg cgtgcggtgc gcaaccattc tggctgggtt 6300
tccagaagtg ccttgatctc ggcgggtggtc agtggtttgt ccatgtcgtt ctttttcaga 6360
gccgcgatgg tgatgcccac tttttgggcg accactggac gaggggtgtg gccctcgagg 6420
cgtaggggtt ggagccactc cgggtgggtt tcctgcaggt tcttgaactc ttggtgagtc 6480
aatgcacctg tttggaactc ctctggcgtg gcgggcaaaa acagtccgag ctctttagcg 6540
gcggtctgtg gcttcatagc cctgcccgat ggctggcgta cagattcttc gttcacgccc 6600
acaacggtag cattgttttc atgctgacct taagtttcat cactggcacg gagccaggaa 6660
agtggtttac ccgattccga gatcggactc atcacggatc cccgggtacc gagctcgaat 6720
tactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat 6780
cgcttgcag cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcgaagaggc ccgcaccgat 6840
cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggcgaatggc g 6881

```

<212> Tipo: DNA

<211> comprimento: 6881

Nome da sequência: Sequência nº 6

Descrição da Sequência:

Sequência Padrão

Nome da sequência: Sequência nº 6

Sequência

<213> Nome do Organismo: *Corynebakterium glutamicum*

<400> Fita de Pré Sequência:

gaattgatcc ccctagagcc ggagacgtga aaaaaattcg cagctcattc catcagcgta	60
aacgcagctt tttgcatggg gagacacctt tgggggtaaa tctcacagca tgaatctctg	120
ggtagatga ctttctgggt gggggagggg ttagaatgtt tctagtcgca cgccaaaacc	180
cggcgtggac acgtctgcag ccgacgcggt cgtgcctgtt gtagacggac attcctagtt	240
tttcaggag taacttgtga gccagaatgg ccgtccggtg gtcctcatcg ccgataagct	300
tgcgcagtcc actgttgacg cgcttggaga tgcagtagaa gtccggtggg ttgacggacc	360
taaccgcccga gaactgcttg atgcagttaa ggaagcggac gcactgctcg tgcgttctgc	420
taccactgtc gatgctgaag tcatcgccgc tgccttaac ttgaagatcg tcggtcgtgc	480
cggcgtgggc ttggacaacg ttgacatccc tgctgccact gaagctggcg tcatggttgc	540
taacgcaccg acctctaata ttcactccgc ttgtgagcac gcaatttctt tgctgctgtc	600
tactgctcgc cagatccctg ctgctgatgc gacgtgcgt gagggcgagt ggaagcggtc	660
ttctttcaac ggtgtggaaa ttttcggaaa aactgtcggg atcgtcgggt ttggccacat	720
tggtcagttg tttgctcagc gtcttctgtc gtttgagacc accattgttg cttacgatcc	780
ttacgctaac cctgctcgtg cggctcagct gaacgttgag ttggttgagt tggatgagct	840
gatgagccgt tctgactttg tcaccattca ctttcttaag accaaggaaa ctgctggcat	900
gtttgatgcg cagctccttg ctaagtccaa gaagggccag atcatcatca acgtgctcg	960
tggtggcctt gttgatgagc aggccttggc tgatgcgatt gagtccggtc acattcgtgg	1020
cgtggtttc gatgtgtact ccaccgagcc ttgactgat tctccttgt tcaagttgcc	1080
tcaggttgtt gtgactcctc acttgggtgc ttctactgaa gaggtcagg atcgtgcggg	1140
tactgacgtt gctgattctg tgctcaaggc gctggctggc gagttcgtgg cggatgctgt	1200
gaacgtttcc ggtggtcgcg tgggcgaaga ggttgctgtg tggatggatc tggctctaag	1260
gatcgggtac cgagctcgaa ttaattcgag ctcggtaccc gaccaccac agccaccgta	1320
atcagtagcc acggtcacgc caatagaact cagatcaatt gtgccgatgt gctgctattt	1380
agttctgcac cctcaaggcc agcattcaac cccgctagag ggtgaaaatg ctggccttta	1440
aggcattaaa aatcccacaa taagtggact ggtgcacagt ttagcaaagt ttgtgatgca	1500
cgcgacaagg atgggtgccg agtagctttc cccatgcaat tcgccaccct ataacgcaac	1560
ctcaggggat attaacaacc tagaaattga aaactttgca aaactttgag ctacccccaa	1620
attggtggct ggtcaactaa tccccgcgtt ttcaatagtt cgggtgcgcc agttttgggc	1680
gtttttcatc gtttgggaga ctgctgaag aatctagggg gctaggaact gacagcttca	1740
gggttatagt tggtgggtca gatcgttaac gatccctggc ctttttactt ccaagcgag	1800

aaagttgccc	gaagacatga	ccgacttccc	caccctgccc	tctgagttca	tccctggcga	1860
cggccgtttc	ggctgcggac	cttccaaggt	tcgaccagaa	cagattcagg	ctattgtcga	1920
cggatccgca	tccgtcatcg	gtacctcaca	ccgtcagccg	gcagtaaaaa	acgtcgtggg	1980
ttcaatccgc	gagggactct	ccgacctctt	ctcccttcca	gaaggctacg	agatcatcct	2040
ttccctaggt	ggtgcgaccg	cattctgga	tgcagcaacc	ttcggactca	ttgaaaagaa	2100
gtccggtcac	ctttctttcg	gtgagttctc	ctccaagttc	gcaaaggctt	ctaagcttgc	2160
tccttgggctc	gacgagccag	agatcgtcac	cgcagaaacc	ggtgactctc	cggccccaca	2220
ggcattcgaa	ggcgccgatg	ttattgcatg	ggcacacaac	gaaacctcca	ctggcgccat	2280
ggttccagtt	cttcgccccg	aaggctctga	aggctccctg	gttgccattg	acgcaacctc	2340
cggcgctggt	ggactgccag	tagacatcaa	gaactccgat	gtttactact	tctccccaca	2400
gaagtgtctc	gcattccgacg	gtggcctgtg	gcttgccagc	atgagcccag	cagctctcga	2460
gcgcattcgag	aagatcaacg	cttccgatcg	cttcattccct	gagttcctca	acctgcagac	2520
cgcagtggat	aactccctga	agaaccagac	ctacaacacc	ccagctgttg	ctaccttgct	2580
gatgctggac	aaccagggtca	agtggatgaa	ctccaacggc	ggcctggatg	gaatggttgc	2640
tcgcaccaca	gcaagctcct	ccgccctgta	caactgggct	gaggctcgcg	aggaggcatc	2700
cccatacgtg	gcagatgcag	ctaagcgctc	cctcgttgtc	ggcaccatcg	acttcgatga	2760
ctccatcgac	gcagcagtga	tcgctaagat	actgcgcgca	aacggcatcc	tggacaccga	2820
gccttaccgc	aagctgggac	gcaaccagct	gcgcattcgt	atgttcccag	cgatcgattc	2880
caccgatgtg	gaaaagctca	ccggagcaat	cgacttcatt	ctcgatggcg	gttttgcaag	2940
gaagtaatac	ccccactttg	aaaaacaccc	cgtacagtta	caccagtacg	gggtgttttt	3000
tagttaagct	tgggtgatca	cttaaccag	ctagaaggag	tcaacatgcg	ggaaagcggc	3060
cgcgttgatg	atccttgggg	ttacggcaac	tccctggagt	gggcaacctc	ctgccctcct	3120
cctcgccaca	acttcgcatt	cttgccctgt	atccgctccg	agcgccctgc	gttcgagctg	3180
cactaccgcg	acatgattga	acgcattgcg	gcagaggcac	acactggaca	tcacgatgat	3240
attaatgctc	cagaattggg	taccgcccc	gcccttgcat	ctgactccag	ccgctaaaag	3300
cgtctgattt	aagtcggtac	ctgactaaat	aagcaccagc	cccagcagag	ataatctgcc	3360
ggggctgggtg	cttttcatat	tccgacttgg	ggcacccttg	aatacatctc	acccaattcc	3420
ccataactag	acaattgccc	agcaaccgact	gataagtctc	caatgtcgtg	ttccgcgctc	3480
agacatgaga	caattgttgc	cgtgactgaa	ctcatccaga	atgaatccca	agaaatcgct	3540
gagctggaag	ccggccagca	ggttgcatg	cgtgaagggt	atcttcctgc	ggtgatcaca	3600
gtgagcggta	aagaccgccc	agggtgact	gccgcgttct	ttagggctct	gtccgcta	3660
caggttcagg	tcttgacgt	tgagcagtca	atgttccgtg	gctttttgaa	cttggcggcg	3720
tttgtgggta	tcgcacctga	gcgtgtcgag	accgtcacca	caggcctgac	tgacacctc	3780
aagggtgcatg	gacagtccgt	ggtgggtggag	ctgcaggaaa	ctgtgcagtc	gtccccctc	3840

cgttcttccc	atgttggtgt	ggtgttgggt	gatccggttg	atgcgttggg	tatttcccgc	3900
attggtcaga	ccctggcgga	ttacgatgcc	aacattgaca	ccattcgtgg	tatttcggat	3960
taccctgtga	ccggcctgga	gctgaagggt	actgtgccgg	atgtcagccc	tggtggtggt	4020
gaagcgatgc	gtaaggcgct	tgctgctctt	acctctgagc	tgaatgtgga	tattgcgatt	4080
gagcgttctg	gtttgctgcg	tcgttctaag	cgctggtgtg	gcttcgattg	tgattccacg	4140
ttgatcactg	gtgaggatcat	tgagatgctg	gcggctcacg	cgggcaagga	agctgaagtt	4200
gcggcagtta	ctgagcgctg	gatgcgcggg	gagctcgatt	tcgaggagtc	tctgcgtgag	4260
cgtgtgaagg	cgttggctgg	tttggatgcg	tcggtgatcg	atgaggctgc	tgccgctatt	4320
gagctgaccc	ctgggtgcgcg	caccacgatc	cgtagcgtga	accgcatggg	ttaccagacc	4380
gctgttgttt	ccgggtggttt	catccagggt	ttggaagggt	tggttgagga	gttggagttg	4440
gattatgtcc	gcgccaacac	tttggaaatc	gttgatggca	agctgaccgg	caacgtcacc	4500
ggaaagatcg	ttgaccgcgc	tgcaagggt	gagttcctcc	gtgagttcgc	tgcggtattct	4560
ggcctgaaga	tgtaccagac	tgtcgtgtc	ggtgatggcg	ctaatacat	cgatatgctc	4620
tccgctgcgg	gtctgggtgt	tgctttcaac	gcgaagcctg	cgctgaagga	gattgcggt	4680
acttccgtga	accacccatt	cctcgacgag	gttttgaca	tcatgggcat	ttccgcgac	4740
gagatcgatc	tggcggatca	ggaagacggc	actttccacc	gcgttccatt	gaccaatgcc	4800
taaagattcg	cttctcgacg	cccacctcct	cctcaaggcc	cggtctagcg	acgggccaca	4860
tagcgaggat	ccttcgggga	tcctctagag	tcgacctgca	ggcatgcaag	cttggcactg	4920
gccgtcgttt	tacaacgtcg	tgactgggaa	aaccctggcg	ttaccctaact	taatcgctt	4980
gcagcacatc	cccccttcgc	cagctggcgt	aatagcgaag	aggcccgcac	cgatcgccct	5040
tcccaacagt	tgcgcagcct	gaatggcgaa	tggcgcgata	agctagatcc	ccatcaatcc	5100
tgcttatattg	ccacgtttta	caaggtagtt	aagcgttcat	ttacgaagaa	aacacgataa	5160
gctgcacaaa	tacctgaaaa	agttgaacgc	cccgtgagcg	ggaactcaca	ggggtcgggc	5220
taacccccag	tcatcagctg	ggagaaagca	ctcaagacat	gactctagcc	gatccgcagg	5280
acacagtcac	agctagcgcg	tggaaattgt	ccgccgatct	gttcgacacc	caccccgaag	5340
ctatgcgctg	cggtcacgc	ggctggacgg	cagaagatcg	ccgcgaactg	ctcgctcacc	5400
tgggacgcga	aagcttccag	ggcagcaaga	caagagattt	cgcgagcgcc	tggattaaaa	5460
acccggatac	cggcgaaacc	caaccaaagc	tctaccgggc	tggctcaaaa	gcgctgacgc	5520
ggtgccagta	cgttgcgctg	acgcacgcgc	aacatgccgc	ggtgatcgctg	cttgacatcg	5580
atgtgcccag	ccaccaggcc	ggcgggaaga	ttgagcacgt	aaacccgcag	gtctacgcga	5640
ttttagagaa	atgggcacgc	ctagaaaaag	cgccggcttg	gatcggcgctg	aatccgctga	5700
gcgggaaatg	ccagctcatc	tggctcattg	acccggtgta	tgccgcagca	ggtaaaacca	5760
gccccaaatat	gcgcctgctg	gctgcaacga	cggaagaaat	gactcgtgtt	ttcggcgctg	5820
accaggcttt	ttcgcatagg	ctgagccggg	ggccgctgca	cgtctcagac	gatccgacag	5880

cctataaatg gcactgccag catgatcgtg tggatcggtt ggccgacctt atggagattg	5940
ctcgaacgat gaccggatca cagaagccga aaaagtacat tgagcaggac ttttccagcg	6000
gacgcgcccg cattgaagcg gcacaacgcg ccaecgcaga agccaaggcg ctagcgattt	6060
tggacgcgag cctgccgagc gccctggacg cgtccggcga cctgatcgac ggcgtgcgag	6120
tgctctggac aaatccagag cgagcgcgcg acgagaccgc gtttcgccac gcgttgaccg	6180
tgggatacca gctcaaagct gctgggtgagc gcctaaaaga tgccaaagatc atcgacgcgt	6240
atgaagtggc gtacaacggt gccccaggcg tgggtgcaga cggccgggag ccggatcttc	6300
ccgccatgcg tgatcgccctg acgatggcgc gtcgtgtgcg cggctacgtg gctaaaggcc	6360
agccagtcgt ccttgcctgt cgggtggaaa cgcagagcag ccgagggcgg aaagctctag	6420
cgacgatggg gcgacggggc gcagctacat cgaatgcacg cagatgggct gaccagaaa	6480
gtaagtatgc gcaggagacg cgacagcgat tagcgggaagc aaacaaacgc cgagaaatga	6540
caggcgagtt gctcgaaactt cgcgtcaaaa ctgcgatcct ggatgcccgt tctcaatcgg	6600
ttgctgatcc ctcgactcgt gagcttgacg gcgaactagg tgtcagtgaag aggcgcattc	6660
aaacaagtcat aaaggcactt ggaatggaag ctaaaccgcg cgtccacggg gctgaaaact	6720
aataaacgaa acaccgtcag cagaaaacgg ttccccctt taggggtccc gtccttgctc	6780
tggctctcac ttgccctcac cctccgctat ccacgggctg aaaactaata aacgaaacac	6840
cgtcagcaga aaacgggttc cccctttag ggtgtctcgc tcctagctct gatccctccc	6900
cggttcctcc ccggcctgat ttttaagggg ggctcacgct gtcggcagag aacgggtccc	6960
cgccttctgc tctggctctt cctcgactcc ctccccctca aaaatctctt cgagatcctg	7020
gagacctttt tggagctagc gcgttgctgc ttgcaccaa cttgctcatg atgattttca	7080
tttttgcttg tgtgcttttt tgggttgaac cctccaaaga ggggaaacca ggggcacacc	7140
tcatgcaacta aagtgccgtt tcgctgggtc ggggtgaaatc acctggaaaa aaagtgcggt	7200
aaaccgtgcg cttggcggtt tttctgggca agaagtctcg cagggttttcg caggagtgcc	7260
ggaagaaatt atcagaattg gggctagaat ttttaacgaa cgttcgttat aatgggtgtc	7320
tgaccttcac gacgaagtac caaaactggc ctgaagcatt agcgggtggat ctctccgatg	7380
tcgcgctgga gtccgacgca ctcgatgccg ccgtcgattt aaaaacggtg atcggatttt	7440
tccgcgccct cgatacgaca gacgcgccag catcacgcga ctgggcaagt gccgcgagcg	7500
acctagaaac gcttgtggcc gaccttgaag agctggccga cgagctgctg gctcggcagc	7560
gccaggagga cgcgcagtag tggaggatcg catcagctgc gcctactgcg gtggcctgat	7620
cccaccccg gctgacctac gaggacggcg cgcaaaatac tgctcagacg cgtgtcgtgc	7680
cgcagccagc cgcgagcgcg ccaacaagcg ccacgcccag gaggtcgaag ccgcacgtca	7740
tctagcttca cgctgccgca agcactcagg gcgcaagggc tgctaaagga agcggaacac	7800
gtagaaagcc agtcgcgaga aacgggtgctg accccggatg aatgtcagct actgggctat	7860
ctggacaagg gaaaacgcaa gcgcaaagag aaagcaggta gcttgacgtg ggcttacatg	7920

gcgatagcta gactggggcgg ttttatggac agcaagcgaa ccggaattgc cagctggggc	7980
gccctctggt aagggttggga agccctgcaa agtaaaactgg atggctttct tgccgccaaag	8040
gatctgatgg cgcaggggat caactccttc gtcggtgtcg tcgccggatg gtctgcggtg	8100
gtgctcagcg tggagacgcg caccgtcacg gaccgcgtgt agtgcgtggc ggaaacttct	8160
tgcgtttcgc aagagaaatg cgtcccatTT ctcgtcggac tcggggaagg aagcgtgatg	8220
ctctcggta agcacgtcgc tcgccagcgc tgcgaggagt tcggccttcg tcggaagtg	8280
ccagtagagg ccgggctgct gtacctgtaa gtgagccgcc agcgcgcgag tgggaagcc	8340
atcgagccca gtctcgtcga gcacctgccg gggcccgagc aacacggacg tcggtcag	8400
acgcttcgg tggtagtca tagttgcaact ttatcatcga taactttatc ttagataaag	8460
tgactgctcg ctactctcat ctgactgtc gctactctca tcgtggaatc ctgacagccg	8520
tgctcatcac ggcgacctc gatgtgcag ggtgggcct cgtgatgccg atcttgcccta	8580
cccttctcga ccaggctcgt gcccccgcg acatgatccc actgcacgtc ggactactga	8640
cagcgtcta tgcgatcatg cagtttcttt gcgccccgat ccttgccga ctctctgacc	8700
gtttcggacg ccgccgcgtg cttgtgcct ccctcgcagg cgcgacgac gactacctcg	8760
tgctcgcact gacggacacg ctgtgggtct ttacctcgc ccgcgcggtt gcaggcatta	8820
ccggcgccac gaacgccgtc accgcgacgg tgatcgccga cattactccg ccggatcagc	8880
gcgcaaaacg ctacgggtgg ctccggcgcg gctacggcgg tggcatgac gcgggtcccg	8940
ccattggcgg tcttttcggc ggggtctcac cgcactcgcc attcctcgtc gccgcgcgc	9000
tcgccggaat caccctcgta ctcagcgcga gtcttctgcg tgagacgcgg ccaccgggca	9060
gcaacggctc gcacgcacag caaccggta cggcgaagcg aaccgcagt ccggggatgc	9120
ttatccttct cgcagcttc ggcactcgtc agttcatcgg ccaagcacca ggctccacct	9180
gggtgctctt cacgcagcag cgctcgcact ggaaccccg cgaagtcggc gtttcgctat	9240
ccatcttcgg aatggtgcaa gtattcgtgc aggcggcact gaccggacgc atcgtgtccc	9300
ggatcggcga gacccgggcg atcctcgtcg gtatcgccgc agacgccatt gggctcatcg	9360
gccttgccct catcgccagc acatgggcga tgctaccgat cctcgcagcg ctcgactcg	9420
gcagcatcac gttgcccga ctgcagacgc tgctctcgag acgcgcgcc gagcagcagc	9480
agggacgcct gcagggaaca cttgcaagcc tgaacagcct caccctgac atcgccccg	9540
tcaccttcac cggcattttc gcactcaccc gaacgaatgc agacggcacc ctctggatct	9600
gcgccgcagc gctctacgtt ctctgcgcc tcctgatgat ccgtgagaca tgcgcctcac	9660
ggcgatctcg ataaccgcgc taagggtgcca tcccgatgcg acgggatcgc tctgccacca	9720
gtcaagtctc ccgtagccgg tatgagggc agcctcgcag agcaggattc ccgttgagca	9780
ccgccagggt cgaataaggg acagtgaaga aggaacaccc gctcgcgggt gggcctactt	9840
cacctatcct gccccgctga cgcggttga tacaccaagg aaagtctaca cgaacccttt	9900
ggcaaaatcc tgtatatcgt gcgaaaaagg atggatatac cgaaaaaatc gctataatga	9960

```

ccccgaagca gggttatgca gcggaaaaagc catgaccaaa atcccttaac gtgagttttc 10020
gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 10080
tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tgggtttgtt 10140
gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 10200
accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc 10260
accgcctaca tacctcgtc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 10320
gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 10380
ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag 10440
atacctacag cgtgagcatt gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag 10500
gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 10560
cgcctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 10620
gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ccttttttacg 10680
gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgtttttt cctgcgttat cccctgattc 10740
tgtggataac cgtattaccg cttttgagtg agctgatacc gctcgccgca gccgaacgac 10800
cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca aaccgcctct 10860
ccccgcgcgt tggccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaaagc 10920
gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggcttt 10980
acactttatg cttccggctc gtatgttggtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac 11040
aggaacagc tatgaccatg attac 11065

```

<212> Tipo: DNA

<211> comprimento: 11065

Nome da sequência: Sequência nº 7

Descrição da Sequência:

Sequência Padrão

Nome da sequência: Sequência nº 7

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de L-serina caracterizado pelo fato de que a concentração de ácido fólico é reduzida em um organismo que produz aminoácido.

5 2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de ácido fólico é reduzida por redução da síntese de ácido fólico ou por sua degeneração.

10 3. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a concentração de ácido fólico é reduzida por uma mutação direcionada ou não-direcionada de genes que participam na biossíntese de ácido fólico.

15 4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a redução ou desligamento da produção de ácido fólico se dá por mutação de deleção, mutação de inserção, mutação pontual, e/ou mutação de substituição de genes que participam na biossíntese de ácido fólico.

20 5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a expressão de genes que participam na biossíntese de ácido fólico é diminuída ou reduzida.

25 6. Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que expressão através de modificação respectivamente enfraquecimento ou desligamento de promotores, estruturas de sinais, gene repressores, ativadores, operadores, atenuadores, elos de ligação de ribossomos, códons de iniciação, terminadores, reguladores
30 reduz a estabilidade do transcrito ou que são empregados

promotores reguláveis.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo fato de que o gene que codifica para GTP-ciclohidrolase, neopterintrifosfatpirofosfatase, 6-hidroxiimetilpterinpirofosfoquinase, 4-amino-4-deoxi-corismatsintase, 4-amino-4-deoxi-corismatliase, pteroatsintase, folatsintase e dihidrofolatreductase é modificado.

10 8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o gene que codifica para amino-4-deoxicorismatsintase é deletado.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a deleção é realizada com uma DNS conforme Seq. No. 1.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que um vetor é inserido após Seq. No. 2.

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que o gene que codifica para a 4-amino-4-deoxi-corismatliase é deletado.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a deleção é realizada com uma DNS conforme Seq. No. 3.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, caracterizado pelo fato de que um vetor é inserido após Seq. No. 4.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13,

caracterizado pelo fato de que o gene que codifica para amino-4-deoxi-corismatsintase e 4-amino-4-deoxi-corismatliase é deletado.

15 15. Processo, de acordo com a reivindicação 14,
5 caracterizado pelo fato de que a deleção é realizada com uma sequência de DNA conforme Seq. No. 5.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 14 ou 15,
caracterizado pelo fato de que um vetor é inserido após Seq. No. 6.

10 17. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo fato de que para a síntese de L-serina é empregado um organismo que já produz L-serina antes da modificação.

15 18. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ou 17, caracterizado pelo fato de que o microorganismo dispõe de um plasmídeo de acordo com a Seq. No. 7.

20 19. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que a atividade catalítica da enzima que participa na biossíntese do ácido fólico é enfraquecida ou desligada.

25 20. Processo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o enfraquecimento ou desligamento se dá a partir da diminuição da estabilidade.

21. Processo, de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que o enfraquecimento ou
30 desligamento se dá a partir da modificação do centro

aloestérico.

22. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19, 20 ou 21, caracterizado pelo fato de que a atividade da enzima é reduzida ou desligada por fosfolização ou adenilização.

23. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19, 20, 21 ou 22, caracterizado pelo fato de que a enzima é reduzida ou desligada em sua atividade por degradação proteolítica.

24. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 19, 20, 21, 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma enzima do grupo constituído de GTP-ciclohidrolase, neopterintriofosfatopirofosfatase, neopterinaldolase, 6-hidroximetilpterinpirofosfoquinase, 4-amino-4-deoxi-chorismatsintase, 4-amino-4-deoxi-chorismatliase, pteroisintase, folatsintase e dihidrofolatreductase tem sua atividade reduzida ou desligada.

25. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que um ou mais genes, escolhidos do grupo constituído:

- do gene serA que codifica para a 3-fosfoglicerato-dehidrogenase,

- do gene serC que codifica para a fosfoserin-transaminase,

- do gene serB que codifica para a fosfoserin-fosfatase,

individualmente ou em combinações a fortificantes,

especialmente sobre-exprimidos.

26. Processo, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que alelos desses genes, especialmente do gene *serA* que codifica para a 3-fosfoglicerato-dehidrogenase resistente à feedback, individualmente ou em combinação a fortificantes ou sobre-exprimidos.

27. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que um ou mais genes escolhidos do grupo constituído de

- do gene *aecD*, que codifica a acistationinliase,
 - do gene *metC*, que codifica a acistationinliase,
 - do gene *sdaA*, que codifica a serindehidratase,
 - 15 • do gene *glyA*, que codifica a serinhidroximetiltransferase,
 - do gene *trpB*, que codifica a sub-unidade beta da triptofanosintase,
 - o gene *ilvA* que codifica a treonindehirsintase
 - 20 • do gene *pyk*, que codifica a piruvatquinase
- individualmente ou em combinação têm sua atividade reduzida ou deletada.

28. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27, caracterizado pelo fato de que como microorganismos são empregados *corinebacterium*, *brevibacterium*, *bacillaceen*, *enterobacterium*, uma bactéria que utiliza metanol ou um fermento.

30 29. Processo, de acordo com a reivindicação 28,

caracterizado pelo fato de que é empregado um microorganismos do grupo constituído de

Corinebacterium glutaminucim ATCC13032,

Corinebacterium acetoglutaminicum ATCC15806,

5 *Corinebacterium acetoacidophilum* ATCC13870,

Corinebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,

Brevibacterium flavum ATCC14067,

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 ou

Brevibacterium divaricatum ATCC14020.

10 30. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ou 29, caracterizado pelo fato de ser empregado para a síntese de cisteína, triptofano ou metionina.

15 31. Sequência genética caracterizada pelo fato de que apresenta uma homologia de no mínimo 85% a seq. no. 1, 3 ou 5.

32. Sequência genética, de acordo com a reivindicação 31, caracterizada pelo fato de ser idêntica a seq. no. 1, 3
20 ou 5.

33. Vetor caracterizado pelo fato de que a sua sequência genética apresenta pelo menos 85% de homologia às sequências no. 2, 4 ou 6.

34. Vetor, de acordo com a reivindicação 33,
25 caracterizado pelo fato de ser idêntico aos vetores da seq. no. 2, 4 ou 6

35. Vetor caracterizado pelo fato de que apresenta pelo menos 85% de homologia à seq. no. 7.

36. Vetor, de acordo com a reivindicação 34,
30 caracterizado pelo fato de ser idêntico a seq. no. 7.

37. Microorganismo caracterizado pelo fato de ser modificado conforme pelo menos um das etapas dos processos de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27.

38. Microorganismo caracterizado pelo fato de ser uma *corinebacterium*, uma *Brevibacterium*, um bacilacceen, uma enterobactéria ou um fermento.

39. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de ser um organismo do grupo constituído de

Corinebacterium glutaminucim ATCC13032,

Corinebacterium acetoglutaminicum ATCC15806,

Corinebacterium acetoacidophilum ATCC13870,

Corinebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539,

Brevibacterium flavum ATCC14067,

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 ou

Brevibacterium divaricatum ATCC14020.

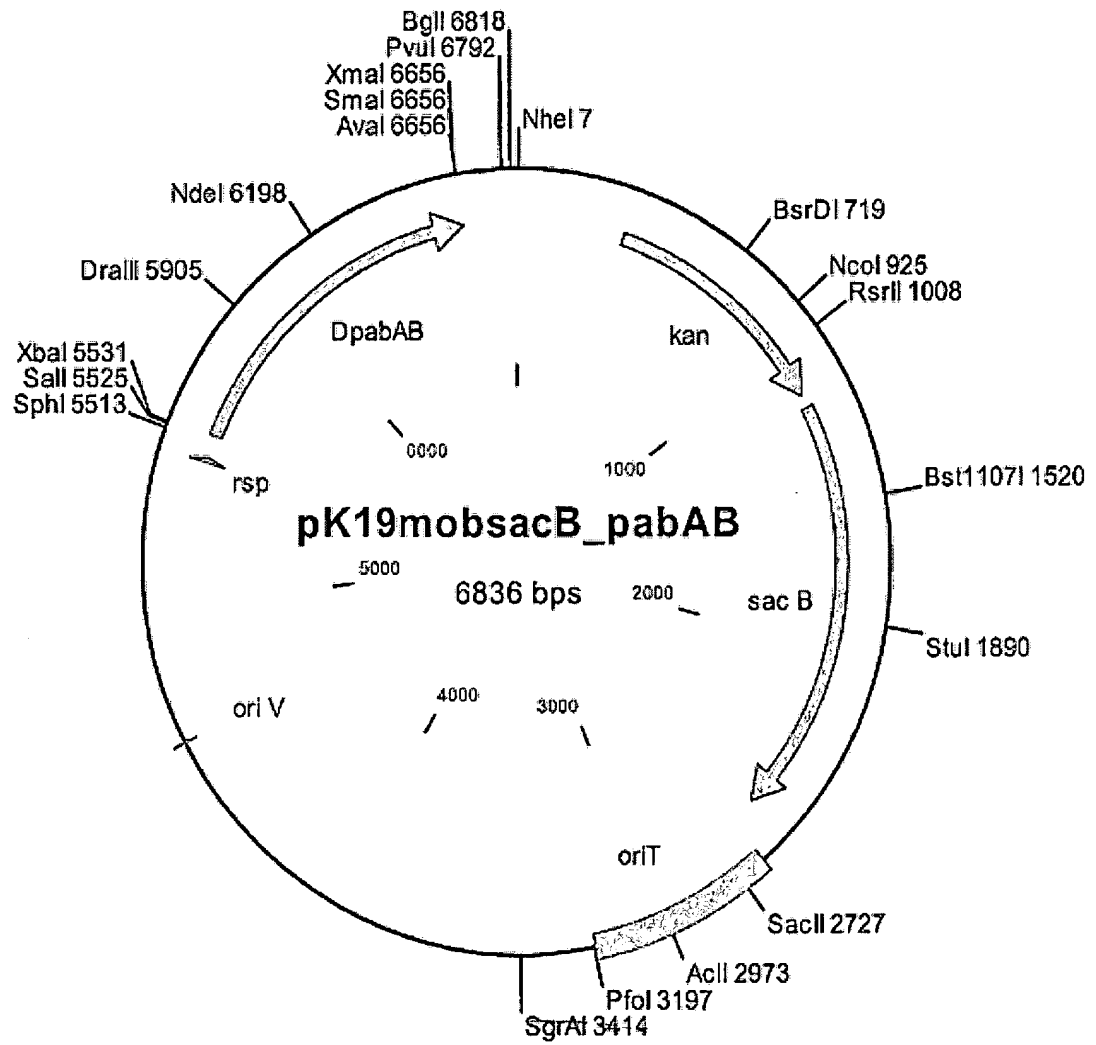


FIGURA 1

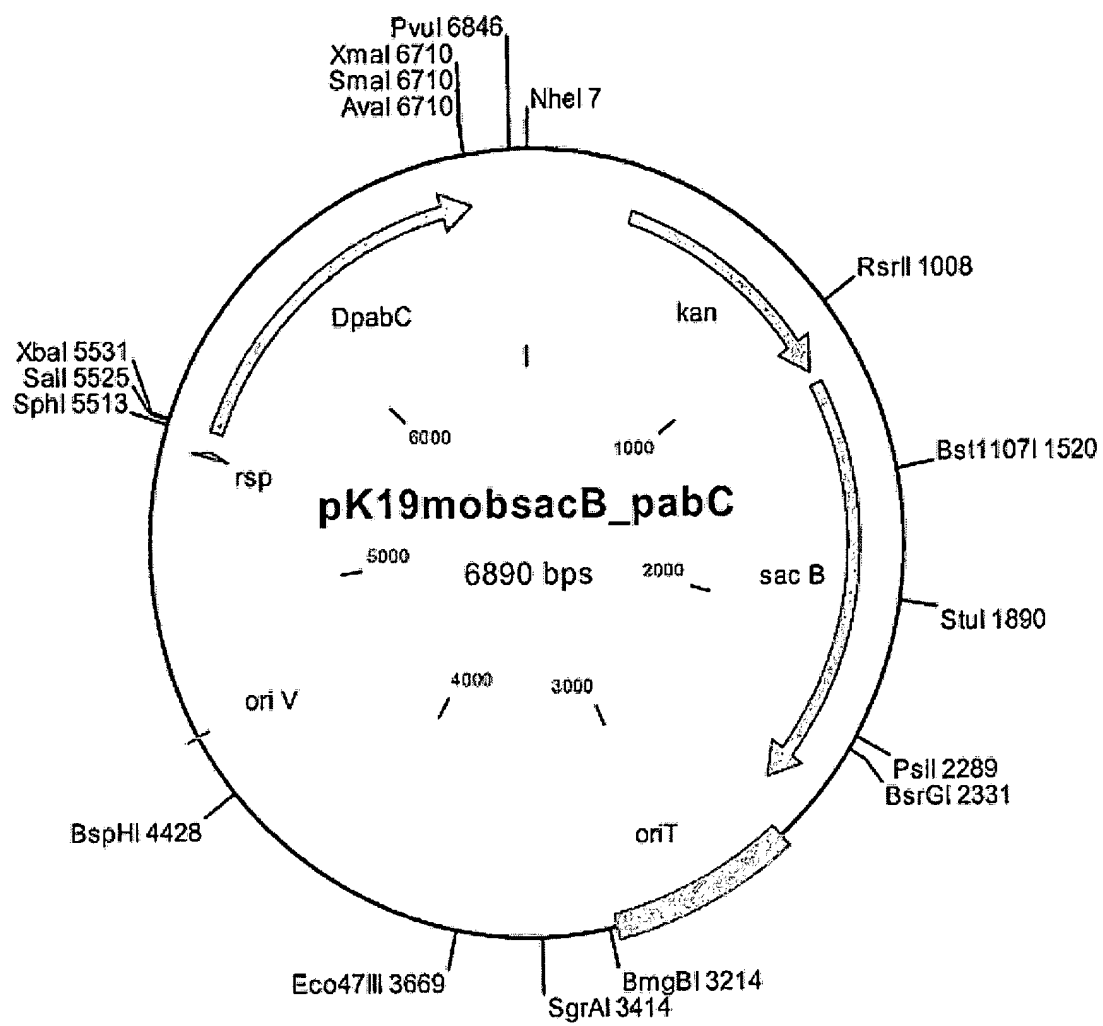


FIGURA 2

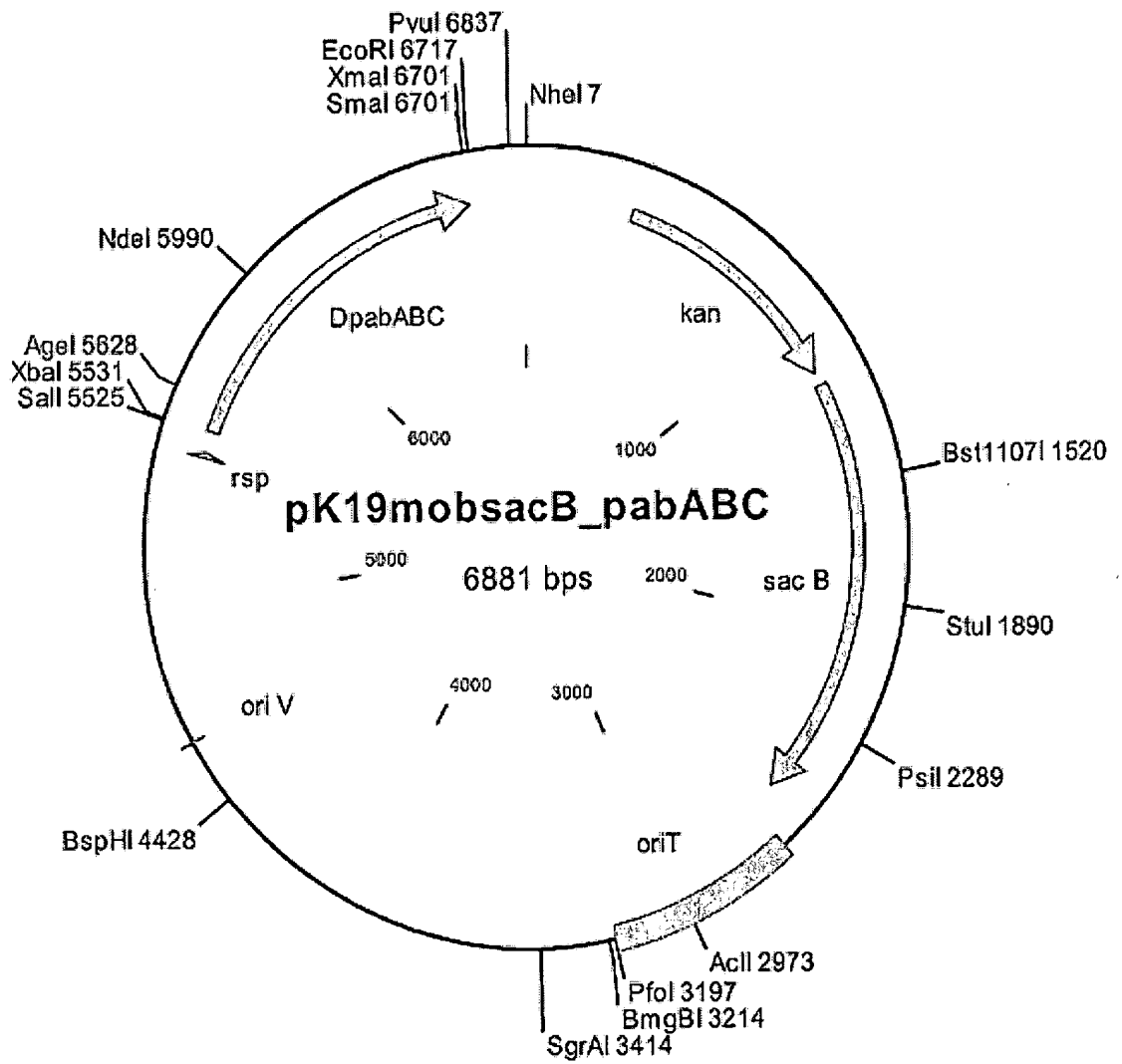


FIGURA 3

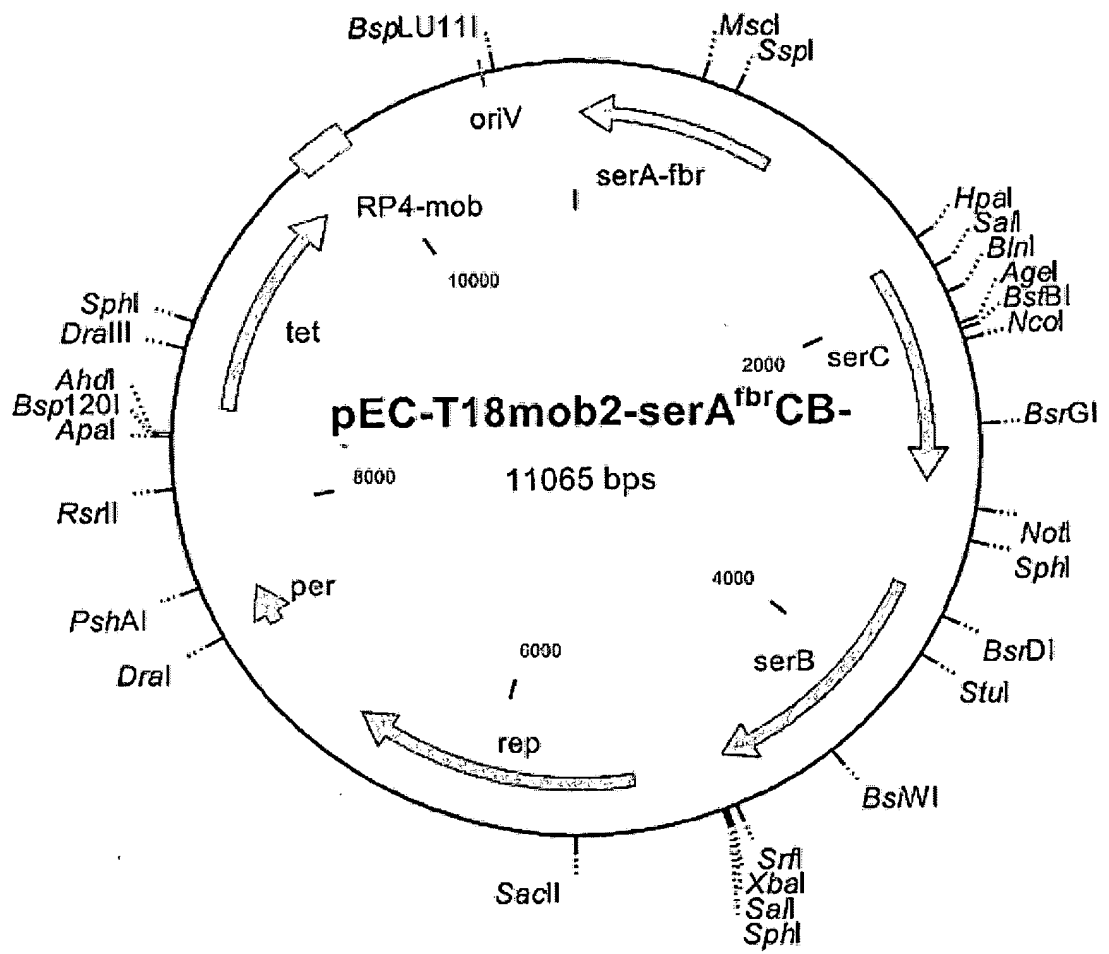


Figura 4

**PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE L-SERINA, SEQUÊNCIA DE GENE,
VETORES E MICROORGANISMOS**

De acordo com a invenção é reduzida ou totalmente
removida a concentração de ácido fólico em organismos que
5 produzem aminoácidos para aumento da produção de L-serina.
Para isso as enzimas ou genes que participam na biossíntese
do ácido fólico podem ser desligados totalmente em sua
atividade ou pelo menos reduzidos. Em uma forma de execução
preferida são utilizadas as sequências no. 1 até 7.