



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

(21) PI 0807519-0 A2



(22) Data de Depósito: 13/02/2008
(43) Data da Publicação: 03/06/2014
(RPI 2265)

(51) *Int.Cl.*:
C07K 14/34
C12P 13/12
C12N 15/77

(54) Título: MÉTODO DE PRODUZIR METIONINA EM CORINEBACTÉRIAS ATRAVÉS DE SUPRA-EXPRESSÃO DAS ENZIMAS DA VIA DAS PENTOSE-FOSFATO **(57) Resumo:**

(30) Prioridade Unionista: 19/02/2007 EP 07102657.9

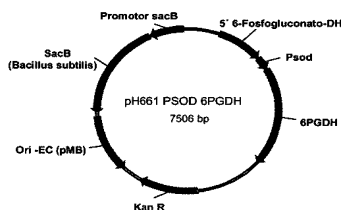
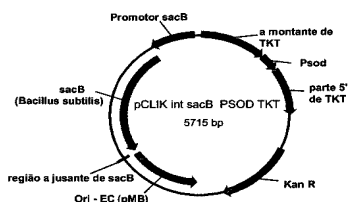
(73) Titular(es): Evonik Degussa GMBH

(72) Inventor(es): Andrea Herold, Corinna Klopprogge, Hartwig Schroder, Oskar Zelder

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2008051762 de 13/02/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/101850 de 28/08/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO DE PRODUZIR METIONINA EM CORINEBACTÉRIAS ATRAVÉS DE SUPRA-EXPRESSÃO DAS ENZIMAS DA VIA DAS PENTOSSES-FOSFATO"**.

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a micro-organismos e métodos para produzir L-metionina. Em particular, a presente invenção refere-se a um método de produzir metionina em bactérias corineformes aumentando a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato. A presente invenção também refere-se a bactérias corineformes em
10 que a quantidade e/ou atividade de pelo menos duas enzimas da via das pentoses-fosfato é/são aumentada(s).

ANTECEDENTES

Correntemente, a produção anual mundial de metionina é cerca de 500.000 toneladas. Metionina é o primeiro aminoácido limitativo em cria-
15 ção de alimentação avícola e, devido a isto, principalmente aplicado como suplemento alimentar.

Em contraste com outros aminoácidos industriais, a metionina é aplicada quase exclusivamente como um racemato de D e L-metionina que é produzida por síntese química. Considerando que os animais podem meta-
20 bolizar ambos os estereoisômeros de metionina, alimentação direta da mistura racêmica quimicamente produzida é possível (D'Mello e Lewis, Effect of Nutrition Deficiencies in Animals: Amino Acids, Rechigl (Ed.), CRC Hand-
book Series in Nutrition and Food, 441-490, 1978).

Porém, ainda há um grande interesse em substituir a produção
25 química existente por um processo biotecnológico produzindo exclusivamente L-metionina. Isto é devido ao fato que em níveis mais baixos de suplementação, L-metionina é uma fonte melhor de aminoácidos de enxofre que D-metionina (Katz e Baker (1975) Poult. Sci. 545: 1667-74). Além disso, o processo químico usa químicas bastante perigosas e produz fluxos residuais
30 substanciais. Todas estas desvantagens de produção química poderiam ser evitadas por um processo biotecnológico eficiente.

Produção fermentativa de químicas finas tais como aminoácidos,

compostos aromáticos, vitaminas e cofatores, é hoje tipicamente realizada em micro-organismos tais como *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii* ou *Gluconobacter oxydans*.

Aminoácidos, tais como glutamato, são desse modo produzidos usando métodos de fermentação. Para estes propósitos, certos micro-organismos tais como *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) provaram ser particularmente adequados. A produção de aminoácidos através de fermentação também tem *inter alia* a vantagem que apenas L-aminoácidos são produzidos e que químicas ambientalmente problemáticas, tais como solventes visto que são tipicamente usados na síntese química, são evitadas.

Algumas tentativas na técnica anterior para produzir químicas finas tais como aminoácidos, lipídios, vitaminas ou carboidratos em micro-organismos tais como *E. coli* e *C. glutamicum* tentaram alcançar esta meta, por exemplo, aumentando a expressão dos genes envolvidos nas vias biossintéticas das respectivas químicas finas.

Tentativas para aumentar a produção, por exemplo, de lisina suprarregulando a expressão dos genes que estão envolvidos na via biossintética de produção de lisina são, por exemplo, descritas no WO 02/10209, WO 2006008097, WO2005059093 ou em Cremer et al. (*Appl. Environ. Microbiol.*, (1991), 57(6), 1746-1752).

Porém, permanece uma necessidade forte para identificar outros alvos nas vias metabólicas que possam ser usados para benéficamente influenciar a produção de metionina em micro-organismos tais como *C. glutamicum*.

OBJETIVO E SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em vista desta situação, é um objetivo da presente invenção fornecer bactérias corineformes que podem ser usadas para produzir L-metionina. É um outro objetivo da presente invenção fornecer métodos que podem ser usados para produzir L-metionina em bactérias corineformes.

Estes e outros objetivos, como eles ficarão evidentes da descrição resultante, são solucionados pela presente invenção como descrita nas reivindicações independentes. As reivindicações dependentes referem-se a algumas das modalidades preferidas da invenção.

5 Em um aspecto, a invenção diz respeito a um método de produzir L-metionina (também designada como metionina) em pelo menos uma bactéria corineforme em que a dita bactéria corineforme é derivada por modificação genética de um organismo de partida de modo que a dita bactéria corineforme exibe uma quantidade e/ou atividade mais alta de pelo menos
10 uma enzima da via das pentoses-fosfato comparado ao organismo de partida.

 A quantidade e/ou atividade de uma enzima da via das pentoses-fosfato pode(m) ser aumentada(s) comparado a um organismo de partida aumentando o número de cópias de sequências de ácido nucleico que
15 codificam a dita enzima. O número de cópias de sequências de ácido nucleico que codificam uma enzima da via das pentoses-fosfato pode ser aumentado usando, por exemplo, vetores de replicação autônoma que compreendem as sequências de ácido nucleico que codificam a dita enzima, e/ou por integração cromossômica das cópias adicionais de sequências de ácido nu-
20 cleico que codificam a dita enzima no genoma do organismo de partida.

 Um aumento da quantidade e/ou atividade de uma enzima da via das pentoses-fosfato pode ser também alcançado aumentando a transcrição e/ou translação de uma sequência de ácido nucleico que codifica a dita enzima. Um aumento de transcrição pode ser atingido mediante o uso de pro-
25 motores fortes e/ou elementos intensificadores. Um aumento na translação pode ser alcançado se o uso do códon das sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas for aperfeiçoado para a expressão no organismo hospedeiro ou se sítios de ligação e os sítios de iniciação de transla-
 ção melhorados para ribossoma forem instalados na região a montante da
30 sequência de codificação de um gene.

 A atividade de uma enzima da via das pentoses-fosfato pode ser também aumentada comparado a um organismo de partida mediante a in-

trodução de mutações nos genes que codificam as ditas enzimas que aumentam a atividade das ditas enzimas ou por mecanismos reguladores negativos de transporte tais como inibição de retroalimentação ou aumentando a taxa de giro enzimática da enzima.

5 Em algumas das modalidades preferidas da invenção, a quantidade e/ou atividade das enzimas da via das pentoses-fosfato é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida por combinações dos métodos acima mencionados.

10 Em uma das modalidades preferidas, a invenção refere-se a um método de produzir metionina em bactérias corineformes, em que a quantidade e/ou atividade de pelo menos transcetolase (tkt), transaldolase (tal), glicose-6-fosfato desidrogenase (zwf), o gene *ocpa*, lactonase ou 6-fosfo-gliconato-desidrogenase (6PGDH) é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida.

15 Outras modalidades preferidas da invenção referem-se a métodos para produzir metionina em bactérias corineformes, em que a quantidade e/ou atividade de pelo menos transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase ou glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida.

20 Em uma das modalidades mais preferidas da invenção, a quantidade e/ou atividade de transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida substituindo os respectivos promotores endógenos com um promotor forte, sendo preferivelmente P_{SOD} . Em uma outra elaboração deste último aspecto da invenção,
25 as sequências de ácido nucleico são usadas que codificam para versões mutadas de transcetolase, transaldolase, glicose 6-fosfato desidrogenase, a proteína *opca* e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase que ou são menos propensas aos mecanismos reguladores negativos e/ou exibem um giro enzimático mais alto comparado às respectivas enzimas do tipo selvagem.

30 Outro aspecto da presente invenção refere-se a uma bactéria corineforme, que é derivada por modificação genética de um organismo de partida de modo que a dita bactéria corineforme exibe uma quantidade e/ou

atividade mais alta de pelo menos duas enzimas da via das pentoses-fosfato comparado ao organismo de partida.

A quantidade e/ou atividade das ditas pelo menos duas enzimas pode(m) ser aumentada(s) comparado a um organismo de partida pelas abordagens acima mencionadas, isto é, aumentando o número de cópias de sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas, aumentando a transcrição e/ou translação das sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas e/ou introduzindo mutações nas sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas que levam às versões mais ativas das respectivas enzimas.

Em uma modalidade preferida, a invenção refere-se a uma bactéria corineforme em que a quantidade e/ou atividade de pelo menos transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase, ou de pelo menos glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado ao organismo de partida.

Em uma das modalidades mais preferidas, uma bactéria corineforme é caracterizada em que a quantidade e/ou atividade de transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida, preferivelmente substituindo seu respectivo promotor endógeno com um promotor forte tal como P_{SOD}.

Em uma outra elaboração deste aspecto anterior da presente invenção, as sequências de ácido nucleico de transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase codificam versões mutadas destas enzimas que são menos propensas aos mecanismos reguladores negativos e/ou exibem um giro enzimático mais alto comparado às respectivas enzimas do tipo selvagem.

Em todas as modalidades acima mencionadas da invenção, uma bactéria corineforme é selecionada que é preferivelmente selecionada das espécies de *Corynebacterium glutamicum*. Uma cepa de *C. glutamicum* preferida que pode ser usada para o propósito da presente invenção é uma cepa do tipo selvagem tal como ATCC13032 ou uma cepa que já foi aperfeiçoada para produção de metionina. Tais cepas posteriores exibirão alterações

genéticas tais como aquelas de DSM17322, M2014 ou OM469 sendo descritas abaixo ou como sendo descritas no WO2007012078.

Em um aspecto da presente invenção, os métodos e bactérias corineformes de acordo com a presente invenção permitem produzir pelo menos 2%, pelo menos 5%, pelo menos 10% ou pelo menos 20%, preferivelmente pelo menos 30%, pelo menos 40% ou pelo menos 50%, e mais preferivelmente pelo menos um fator de 2, pelo menos um fator de 5 e pelo menos um fator de 10 mais metionina comparado ao organismo de partida.

LEGENDA DA FIGURA

Figura 1 esquematicamente descreve plasmídeos pCLIK int sacB PSOD TKT e pCLIK int sacB PSOD 6PGDH.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a presente invenção refere-se a um método de produzir metionina em pelo menos uma bactéria corineforme, em que a dita bactéria corineforme é derivada por modificação genética de um organismo de partida de modo que a dita bactéria corineforme exibe uma quantidade e/ou atividade mais alta de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato comparado ao organismo de partida.

Outra modalidade da presente invenção refere-se a uma bactéria corineforme que é derivada por modificação genética de um organismo de partida de modo que a dita bactéria corineforme exibe uma quantidade e/ou atividade mais alta de pelo menos duas enzimas da via das pentoses-fosfato comparado ao organismo de partida.

Foi surpreendentemente descoberto que o aumento da quantidade e/ou atividade das enzimas que não estão diretamente envolvidas na via metabólica para síntese de metionina pode levar à produção aumentada de metionina em bactérias corineformes. Desse modo, os inventores da presente invenção observam que se supraexpressa pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato tal como transcetolase ou 6-fosfo-gliconato-desidrogenase em bactérias corineformes uma quantidade mais alta de metionina é produzida comparado a uma situação onde nenhuma destas duas enzimas não são expressadas acima de seus níveis endógenos típicos em

bactérias corineformes.

Antes de vários aspectos e algumas das modalidades preferidas da invenção serem descritos em mais detalhes, as definições a seguir são fornecidas que deverão ter o significado indicado ao longo da descrição da invenção, a menos que explicitamente do contrário indicado pelo respectivo contexto.

Bactérias corineformes compreendem espécies tais como *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium jeikeum*, *Corynebacterium aceto-glutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermo-*
 10 *aminogenes*, *Corynebacterium melassecola* e *Corynebacterium effiziens*. Uma espécie preferida é *C. glutamicum*.

Em modalidades preferidas da invenção, as bactérias corinefor-
 mes podem ser derivadas do grupo de cepas que compreendem *C. glutami-*
cum ATCC13032, *C. glutamicum* KFCC10065, *C. glutamicum* ATCC21608,
 15 *C. acetoglutamicum* ATCC15806, *C. acetoacidophilum* ATCC13870, *C. thermoaminogenes* FERMBP-1539, *C. melassecola* ATCC17965, *C. effiziens* DSM 44547 e *C. effiziens* DSM 44549, como também cepas que são deriva-
 das das mesmas, por exemplo, por mutagênese e seleção clássicas ou atra-
 vés de mutagênese dirigida.

20 Outras cepas particularmente preferidas de *C. glutamicum* po-
 dem ser selecionadas do grupo compreendendo ATCC13058, ATCC13059,
 ATCC13060, ATCC21492, ATCC21513, ATCC21526, ATCC21543,
 ATCC13287, ATCC21851, ATCC21253, ATCC21514, ATCC21516,
 ATCC21299, ATCC21300, ATCC39684, ATCC21488, ATCC21649,
 25 ATCC21650, ATCC19223, ATCC13869, ATCC21157, ATCC21158,
 ATCC21159, ATCC21355, ATCC31808, ATCC21674, ATCC21562,
 ATCC21563, ATCC21564, ATCC21565, ATCC21566, ATCC21567,
 ATCC21568, ATCC21569, ATCC21570, ATCC21571, ATCC21572,
 ATCC21573, ATCC21579, ATCC19049, ATCC19050, ATCC19051,
 30 ATCC19052, ATCC19053, ATCC19054, ATCC19055, ATCC19056,
 ATCC19057, ATCC19058, ATCC19059, ATCC19060, ATCC19185,
 ATCC13286, ATCC21515, ATCC21527, ATCC21544, ATCC21492, NRRL

B8183, NRRL W8182, B12NRRLB12416, NRRLB12417, NRRLB12418 e NRRLB11476.

A abreviação KFCC representa Korean Federation of Culture Collection, ATCC representa American-Type Strain Culture Collection e a
 5 abreviação DSM representa Deutsche Sammlung von Mikroorganismen. A abreviação NRRL representa coletânea de culturas de ARS Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, EUA.

Para o propósito da presente invenção, uma cepa do tipo selvagem preferida é *C. glutamicum* ATCC13032.

10 Particularmente preferidos são micro-organismos de *Corynebacterium glutamicum* que já são capazes de produzir metionina. Portanto, cepas que exibem alterações genéticas tendo um efeito similar, tal como DSM17322; M2014 ou OM469 sendo descritas abaixo, são particularmente preferidas.

15 O termo "organismo de partida" dentro do contexto da presente invenção refere-se a uma bactéria corineforme que é usada para modificação genética para aumentar a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato como descrito abaixo.

Os termos "modificação genética" e "alteração genética" como
 20 também suas variações gramaticais dentro do significado da presente invenção são intencionados significar que um micro-organismo foi modificado por meio de tecnologia de gene para expressar uma quantidade alterada de uma ou mais proteínas que podem estar naturalmente presentes no respectivo micro-organismo, uma ou mais proteínas que não estão naturalmente pre-
 25 sentes no respectivo micro-organismo, ou uma ou mais proteínas com uma atividade alterada em comparação às proteínas do respectivo micro-organismo não-modificado. É considerado que um micro-organismo não-modificado é um "organismo de partida", a alteração genética deste resulta em um micro-organismo de acordo com a presente invenção.

30 O organismo de partida pode ser desse modo uma cepa de *C. glutamicum* do tipo selvagem tal como ATCC13032.

Porém, o organismo de partida pode ser também preferivelmen-

te, por exemplo, uma cepa de *C. glutamicum* que já foi aperfeiçoada para produção de metionina.

Um tal organismo de partida produtor de metionina pode, por exemplo, ser derivado de uma bactéria corineforme do tipo selvagem e preferivelmente de uma bactéria de *C. glutamicum* do tipo selvagem contendo alterações genéticas pelo menos em um dos genes a seguir: *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}* e *metH*, em que as alterações genéticas levam à supraexpressão de qualquer um destes genes, assim resultando na produção aumentada de metionina com relação à metionina produzida na ausência das alterações genéticas.

Em uma modalidade preferida, um tal organismo iniciador de produção de metionina conterá alterações genéticas simultaneamente em *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}* e *metH* assim resultando em produção aumentada de metionina com relação à metionina produzida na ausência das alterações genéticas.

Nestes organismos de partida, as cópias endógenas de *ask* e *hom* são tipicamente alteradas nos alelos resistentes de retroalimentação que não estão mais sujeitos à inibição de retroalimentação pela lisina, treonina, metionina ou por uma combinação destes aminoácidos. Isto pode ser feito por mutação e seleção ou por substituições genéticas definidas dos genes por com alelos mutados que codificam para proteínas com inibição de retroalimentação reduzida ou diminuída. Uma cepa de *C. glutamicum* que inclui estas alterações genéticas são, por exemplo, DSM17322 de *C. glutamicum*. A pessoa versada na técnica estará atenta que alterações genéticas alternativas àquelas sendo descritas abaixo para geração de *C. glutamicum* DSM17322 podem ser usadas também para alcançar supraexpressão de *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}* e *metH*.

Para o propósito da presente invenção, *ask^{fbr}* denota um aspartato cinase resistente à retroalimentação. *Hom^{fbr}* denota uma homoserina desidrogenase resistente à retroalimentação. *MetH* denota uma metionina sintase dependente de vitamina B₁₂.

Em outra modalidade preferida, um organismo de partida produtor de metionina pode ser derivado de uma bactéria corineforme do tipo selvagem e preferivelmente de uma bactéria de *C. glutamicum* do tipo selva-

gem que contém alterações genéticas em pelo menos um dos genes a seguir: *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}*, *metH*, *metA* (também referido como *metX*), *metY* (também referido como *metZ*), e *hsk^{mutado}*, em que as alterações genéticas levam à supraexpressão de qualquer um destes genes, assim resultando em produção aumentada de metionina com relação à metionina produzida na ausência das alterações genéticas. Em uma modalidade preferida, um tal organismo iniciador de produção de metionina conterá alterações genéticas simultaneamente em *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}*, *metH*, *metA* (também referido como *metX*), *metY* (também referido como *metZ*), e *hsk^{mutado}* assim resultando em produção aumentada de metionina com relação à metionina produzida na ausência das alterações genéticas.

Nestes organismos de partida, as cópias endógenas de *ask*, *hom* e *hsk* são tipicamente substituídas por *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}* e *hsk^{mutado}* como descrito acima para *ask^{fbr}* e *hom^{fbr}*. Uma cepa de *C. glutamicum* que inclui estas alterações genéticas são, por exemplo, M2014 de *C. glutamicum*. A pessoa versada na técnica estará atenta que alterações genéticas alternativas àquelas especificamente sendo descritas abaixo para geração de M2014 de *C. glutamicum* podem ser usadas também alcançar supraexpressão de *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}*, *metH*, *metA* (também referido como *metX*), *metY* (também referido como *metZ*), e *hsk^{mutado}*.

Para o propósito da presente invenção, *metA* denota uma homoserina succiniltransferase, por exemplo, de *E. coli*. *MetY* denota uma O-Acetil-homoserina sulfidrilase. *hsk^{mutado}* denota uma homoserina cinase que foi mutada para reduzir a atividade enzimática. Isto pode ser alcançado trocando treonina com serina ou alanina em uma posição que corresponde a T190 de *hsk* da SEQ ID No. 19. Como alternativa ou adicionalmente, pode-se substituir o códon de começo ATG com um códon de começo TTG. Tais mutações levam a uma redução na atividade enzimática da proteína *hsk* resultante comparado o gene de *hsk* não-mutado.

Em outra modalidade preferida, um organismo de partida produtor de metionina pode ser derivado de uma bactéria corineforme do tipo selvagem e preferivelmente de uma bactéria de *C. glutamicum* do tipo selva-

gem contendo alterações genéticas em pelo menos um dos genes a seguir: *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}*, *methH*, *metA* (também referido como *metX*), *metY* (também referido como *metZ*), *hsk^{mutado}* e *metF* em que as alterações genéticas levam à supraexpressão de qualquer um destes genes, em combinação com as alterações genéticas em pelo menos um dos genes a seguir: *mcbR* e *metQ* em que as alterações genéticas diminuem a expressão de qualquer um destes genes onde a combinação resulta em produção de metionina aumentada pelo micro-organismo com relação à produção de metionina na ausência da combinação. Em uma modalidade preferida, um tal organismo iniciador de produção de metionina conterá alterações genéticas simultaneamente em *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}*, *methH*, *metA* (também referido como *metX*), *metY* (também referido como *metZ*), *hsk^{mutado}* e *metF* em que as alterações genéticas levam à supraexpressão de qualquer um destes genes, em combinação com as alterações genéticas em *mcbR* e *metQ* em que as alterações genéticas diminuem a expressão de qualquer um destes genes onde a combinação resulta em produção de metionina aumentada pelo micro-organismo com relação à produção de metionina na ausência da combinação.

Nestes organismos de partida, as cópias endógenas de *ask*, *hom* e *hsk* são tipicamente substituídas como descrito acima enquanto as cópias endógenas de *mcbR* e *metQ* são tipicamente de modo funcional rompidas ou deletadas. Uma cepa de *C. Glutamicum* incluindo estas alterações genéticas é, por exemplo, OM469 de *C. glutamicum*. A pessoa versada na técnica estará atenta que alterações genéticas alternativas àquelas especificamente sendo descritas abaixo para geração de OM469 de *C. glutamicum* podem ser usadas também para alcançar supraexpressão de *ask^{fbr}*, *hom^{fbr}*, *methH*, *metA* (também referido como *metX*), *metY* (também referido como *metZ*), *hsk^{mutado}* e *metF* e expressão reduzida de *mcbR* e *metQ*.

Para o propósito da presente invenção, *metF* denota uma N5,10-metileno-tetra-hidrofolato reductase (EC 1.5.1.20). *McbR* denota um regulador transcricional do tipo TetR do metabolismo de enxofre (nº de acesso do Genbank: AAP45010). *MetQ* denota uma lipoproteína ligadora de D-metionina.

O termo "enzima da via das pentoses-fosfato" no contexto da presente invenção refere-se ao conjunto de sete enzimas que participam na via das pentoses-fosfato de acordo com os livros padrão de ensino. Uma visão geral das vias metabólicas tais como a via das pentoses-fosfato pode ser encontrada na Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (http://www.genome.jp/kegg/). Esta base de dados também fornece visão geral sobre as modificações específicas das espécies das vias metabólicas. Para o propósito da presente invenção, as enzimas a seguir formam parte da via das pentoses-fosfato:

- Glicose-6-fosfato-desidrogenase (*zwf*, *g6pdh*) (EC 1.1.1.49)
- 6-fosfo-glucono-lactonase (*6pgl*) (EC 3.1.1.31)
- 6-fosfo-gliconato-desidrogenase (*6pgdh*) (EC 1.1.1.44)
- Ribulose-5-fosfato epimerase (*rpe*) (EC 5.1.3.1)
- Ribose-5-fosfato isomerase (*rpi*) (EC 5.3.1.6.)
- Transcetolase (*tkt*) (EC 2.2.1.1.)
- Transaldolase (*tal*) (EC 2.2.1.2.)

O termo "aumentando a quantidade" de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato comparada a um organismo de partida, no contexto da presente invenção, significa que uma bactéria corineforme é geneticamente modificada para expressar uma quantidade mais alta de pelo menos uma das enzimas da via das pentoses-fosfato supracitadas. É para ser entendido que aumentando a quantidade de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato refere-se a uma situação onde a quantidade de enzima funcional é aumentada. É considerado que uma enzima da via das pentoses-fosfato no contexto da presente invenção é funcional se for capaz de catalisar a respectiva reação. Há várias opções para aumentar a quantidade de uma enzima em bactérias corineformes que são bem-conhecidas à pessoa versada na técnica. Estas opções incluem aumentar o número de cópias das sequências de ácido nucleico que codificam as enzimas supracitadas, aumentando a transcrição e/ou translação de tais sequências de ácido nucleico. Estas várias opções serão debatidas em mais detalhes abaixo.

O termo "aumentando a atividade" de pelo menos uma enzima

da via das pentoses-fosfato refere-se à situação que pelo menos uma mutação é introduzida nas respectivas sequências do tipo selvagem da enzima supracitada que leva à produção de mais metionina comparada a uma situação onde a mesma quantidade de enzima do tipo selvagem é expressada.

- 5 Produção aumentada como uma questão de introduzir versões mutadas de enzimas da via das pentoses-fosfato pode ser uma consequência, por exemplo, da inibição reduzida de retroalimentação. Desse modo, enzimas são conhecidas por reduzir sua atividade catalítica se, por exemplo, o produto final for produzido pela via metabólica em que a enzima participa em um
- 10 grau suficiente. É bem-conhecido que pode-se reprimir tal inibição de retroalimentação introduzindo, por exemplo, substituições, inserções ou deleções de aminoácidos aos respectivo sítios de ligação reguladores nas enzimas. Tais versões resistentes à retroalimentação ou insensíveis à retroalimentação da enzima continuarão exibindo uma atividade alta, portanto, até mesmo
- 15 quando uma quantidade de, por exemplo, um metabólito tiver sido produzido que do contrário infrarregularia a atividade da enzima. Além disso, a atividade de uma enzima pode ser aumentada introduzindo mutações que aumentam o giro catalítico de uma enzima.

- É conhecido que as enzimas do PPP são reguladas no nível en-
- 20 zimático através de moléculas pequenas (F Neidhardt, JL Ingraham, KB Low, B Magasanik, M Schaechter e HE Umbarger, eds. Em: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, American Society for Microbiology, Washington, DC (1987). Estas enzimas incluem a glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase que foram
 - 25 mostradas ser reguladas pela inibição através de efetores tais como NADP, NADPH, ATP, frutose 1,6-bis-fosfato (Fru1,6P2), 3-fosfato de D-gliceraldeído, 4-fosfato de eritrose e 5-fosfato de ribulose (Rib5P) e similares como descritos em S Moritz et al (Eur. J. Biochem. (2000), 267, 3442-52) e Onishi et al. (Micorbiol. Lett. (2005), 242, 265-74). Com este conhecimento à
 - 30 mão, a pessoa versada pode identificar, por exemplo, os sítios de ligação para os efetores acima mencionados e introduzir mutações nestes sítios que ou aumentarão ou diminuirão a afinidade da enzima para o respectivo regu-

lador. Dependendo do efeito do regulador, a atividade enzimática pode ser aumentada.

Desse modo, o termo "aumentando a atividade" de pelo menos uma enzima refere-se à situação onde são introduzidas mutações na sequência do tipo selvagem de quaisquer das enzimas da via das pentoses-fosfato supracitadas para reduzir os mecanismos reguladores negativos tais como inibição de retroalimentação e/ou aumento do giro catalítico da enzima.

Claro que as abordagens de aumentar a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma enzima podem ser combinadas. Desse modo, por exemplo, é possível substituir a cópia endógena de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato em bactérias corineformes com um mutante que codifica para a versão insensível à retroalimentação das mesmas. Se transcrição desta cópia mutada for determinada sob o controle do promotor forte, a quantidade e a atividade da respectiva enzima é aumentada. É entendido que neste caso a enzima ainda deve ser capaz de catalisar a reação em que usualmente participa.

Com respeito às enzimas para as quais a quantidade e/ou atividade é/são para ser aumentada(s) de acordo com a presente invenção, pode-se usar as sequências de ácido nucleico endógenas da respectiva bactéria corineforme e preferivelmente de *C. glutamicum* ou pode-se usar homólogos funcionais das mesmas de outros organismos.

Desse modo, pode-se, por exemplo, aumentar a quantidade de glicose-6-fosfato desidrogenase em *C. glutamicum* supraexpressando a respectiva sequência de *C. glutamicum*, ou de um vetor de replicação autônoma ou de uma cópia cromossômica adicionalmente inserida (vide abaixo) ou pode-se usar as enzimas correspondentes de, por exemplo, *Bacillus subtilis* ou *E. coli* e supraexpressar a enzima, por exemplo, mediante o uso de um vetor autonomamente replicável.

Em algumas circunstâncias, pode ser preferível usar as enzimas endógenas, como a sequência de codificação endógena, por exemplo, de *C. glutamicum* já está aperfeiçoada com respeito ao seu uso de códon para

expressão em *C. glutamicum*.

Em uma modalidade preferida da invenção, a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato é/são aumentada(s) em *C. glutamicum*.

5 Em uma outra elaboração deste aspecto da invenção, usa-se as respectivas sequências de *C. glutamicum* para aumentar a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato.

 A sequência de ácido nucleico de *C. glutamicum*, glicose-6-fosfato-desidrogenase é descrita na SEQ ID NO. 1. A sequência de aminoácido correspondente é descrita na SEQ ID NO. 2. O número de acesso do
10 banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) é Cgl1576.

 A sequência de ácido nucleico para 6-fosfogluconolactonase é descrita na SEQ ID NO. 3. A sequência de aminoácido correspondente é descrita na SEQ ID NO. 4. O número de acesso do banco de genes é C-
15 gl1578.

 A sequência de ácido nucleico para 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é descrita na SEQ ID NO. 5. A sequência de aminoácido é descrita na SEQ ID NO. 6. O número de acesso do banco de genes é C-
gl1452.

20 A sequência de ácido nucleico para ribulose-5-fosfato epimerase é descrita na SEQ ID NO. 7. A sequência de aminoácido é descrita na SEQ ID NO. 8. O número de acesso do banco de genes é Cgl1598.

 A sequência de ácido nucleico para ribose-5-fosfato isomerase é descrita na SEQ ID NO. 9. A sequência de aminoácido é descrita na SEQ
25 ID NO. 10. O número de acesso do banco de genes é Cgl2423.

 A sequência de ácido nucleico para transcetolase de *C. glutamicum* é descrita na SEQ ID NO. 11. A sequência de aminoácido é descrita na SEQ ID NO. 12. O número de acesso do banco de genes é Cgl1574.

 A sequência de ácido nucleico de transaldolase de *C. glutami-*
30 *cum* é descrita na SEQ ID NO. 13. A sequência de aminoácido correspondente é descrita na SEQ ID NO. 14. O número de acesso do banco de genes é Cgl1575.

Os homólogos funcionais correspondentes para as enzimas de *C. glutamicum* supracitadas da via das pentoses-fosfato podem ser facilmente identificados pela pessoa versada para outros organismos por análises de homologia. Isto pode ser feito determinando a porcentagem de identidade entre as sequências de aminoácido ou de ácido nucleico para homólogos putativos e as sequências para os genes ou proteínas codificadas por elas (por exemplo, sequências de ácido nucleico para transcetolase, glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfo-gliconato desidrogenase e quaisquer dos outros genes e proteínas mencionados acima ou abaixo codificados pelas mesmas).

Porcentagem de identidade pode ser determinada, por exemplo, através de inspeção visual ou usando homologia com base em algoritmo.

Por exemplo, para determinar a porcentagem de identidade de duas sequências de aminoácido, o algoritmo alinhará as sequências para propósitos ótimos de comparação (por exemplo, intervalos podem ser introduzidos na sequência de aminoácido de uma proteína para alinhamento ótimo com a sequência de aminoácido de outra proteína). Os resíduos de aminoácido nas posições de aminoácido correspondentes são depois comparados. Quando uma posição em uma sequência for ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido que a posição correspondente na outra, então as moléculas são idênticas naquela posição. A porcentagem de identidade entre as duas sequências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas sequências (isto é, % identidade = N° de posições idênticas/ N° total de posições multiplicado por 100).

Vários programas de computação são conhecidos na técnica para estes propósitos. Por exemplo, porcentagem de identidade de duas sequências de ácido nucleico ou de aminoácido pode ser determinada comparando a informação de sequência usando o programa de computação GAP descrito por Devereux et al. (1984) Nucl. Acids. Res., 12:387 e disponível da University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). Porcentagem de identidade pode ser também determinada alinhando duas sequências de ácido nucleico ou de aminoácido usando o programa Basic Local

Alignment Search Tool (BLAST®) (como descrito por Tatusova et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett., 174:247.

Na data de depósito deste pedido de patente, um pacote de software padrão que fornece o programa BLAST pode ser encontrado no
5 sítio de rede de BLAST do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Por exemplo, se usar-se quaisquer dos SEQ IDs acima mencionados, pode-se executar uma pesquisa BLAST com base na sequência de ácido nucleico ou sequência de amino e identificar homólogos estritamente relacionados das respectivas enzimas, por exemplo, em *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Bacillus subtilis*,
10 etc. Por exemplo, para alinhamentos de sequência de ácido nucleico usando o programa BLAST®, os ajustes predefinidos são como segue: recompensa para emparelhamento é 2, penalidade para disparidade é -2, penalidades de intervalo aberto e de intervalo de extensão são respectivamente 5 e 2, gap.times.dropoff é 50, expectativa é 10, tamanho de palavra é 11, e filtro é
15 OFF.

Pesquisas e análise de sequências comparáveis podem ser executadas na base de dados de EMBL (<http://www.embl.org>) ou na página inicial de Expasy (<http://www.expasy.org/>). Todas as pesquisas de sequências acima são tipicamente executadas com os parâmetros predefinidos como
20 eles são pré-instalados pelos provedores de base de dados na data de depósito do presente pedido de patente. Pesquisas de homologia podem também ser habitualmente executadas usando programas de software tais como o software de gene a laser de DNA Star, Inc., Madison, Winconsin, EUA, usando o método de CLUSTAL (Higgins et al. (1989), Comput. Appl. Biosci., 5(2) 151).
25

A pessoa versada entende que duas proteínas provavelmente executarão a mesma função (por exemplo, fornecer a mesma atividade enzimática) se elas compartilharem um certo grau de identidade como descrito acima. Um limite inferior típico no nível de aminoácido é tipicamente pelo
30 menos cerca de 25% de identidade. No nível de ácido nucleico, o limite inferior é tipicamente pelo menos 45%.

Graus de identidade preferidos para ambos os tipos de sequên-

cias são pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60% ou menos cerca de 70%. Níveis de identidade mais preferidos são pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95%. Estes níveis de identidade são considerados ser significativos.

5 Como aqui usado, os termos "homologia" e "homólogo" não são limitados a designar proteínas tendo um antepassado genético comum teórico, mas incluem proteínas que podem ser geneticamente não-relacionadas que foram, não obstante, evoluídas para executar funções similares e/ou têm estruturas similares. O requerimento que os homólogos deveriam ser funcionais significa que os homólogos aqui descritos abrangem proteínas tendo
10 substancialmente a mesma atividade que a proteína de referência. Para que proteínas tenham homologia funcional, não é requerido necessariamente que elas tenham identidade significativa em suas sequências de aminoácido, mas, do contrário, proteínas tendo homologia funcional são assim definidas
15 tendo atividades similares ou idênticas, por exemplo, atividades enzimáticas.

 Preferivelmente, uma enzima de outro organismo que, por exemplo, as bactérias corineformes hospedeiras que serão consideradas ser um homólogo funcional apresenta pelo menos similaridade significativa, isto é, cerca de 50% de identidade de sequência no nível de aminoácido, e catalisa a mesma reação que sua contraparte na bactéria corineforme. Homólogos funcionais que fornecem a mesma atividade enzimática e compartilham um grau mais alto de identidade tal como pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90% de identidade de sequência no nível de aminoácido são homólogos
20 funcionais preferidos também.

 A pessoa versada na técnica sabe que aquele pode também usar fragmentos ou versões mutadas das enzimas acima mencionadas de bactérias corineformes e de seus homólogos funcionais em outros organismos contanto que estes fragmentos e versões mutadas exibam o mesmo
30 tipo de atividade funcional. Fragmentos funcionalmente ativos típicos exibirão deleções N-terminais e/ou C-terminais enquanto as versões mutadas tipicamente compreendem deleções, inserções ou mutações de ponto.

A título de exemplo, uma sequência de *E. coli* será considerada para codificar para um homólogo funcional de glicose-6-fosfato-desidrogenase de *C. glutamicum* se exibir os níveis de identidade supracitados no nível de aminoácido para SEQ ID NO. 2 e exibir a mesma atividade enzimática. Um exemplo é a contraparte de *E. coli* (número de acesso do Genbank AP_002472. Pode-se também usar fragmentos ou, por exemplo, mutantes de ponto destas sequências contanto que as proteínas resultantes ainda catalisem o mesmo tipo de reação que as enzimas de comprimento total.

De acordo com a presente invenção, aumentando a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato permite a produção melhorada de metionina em bactérias corineformes.

Produção melhorada de metionina em bactérias corineformes significa *inter alia* aumentar a eficiência da síntese de metionina como também aumentar a quantidade de metionina produzida.

O termo "eficiência da síntese de metionina" descreve o rendimento de carbono da metionina. Esta eficiência é calculada como uma porcentagem da entrada de energia que entrou no sistema na forma de um substrato de carbono. Ao longo da invenção, este valor é dado por valores percentuais ((mol de metionina) (mol de substrato de carbono)⁻¹ x 100). O termo "eficiência aumentada da síntese de metionina" desse modo refere-se a uma comparação entre o organismo de partida e a bactéria corineforme atual em que a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma das enzimas da via das pentoses-fosfato foi/foram aumentada(s).

Fontes de carbono preferidas de acordo com a presente invenção são açúcares tais como mono-, di- ou polissacarídeos. Por exemplo, açúcares selecionados do grupo compreendendo glicose, frutose, hanose, galactose, ribose, sorbose, lactose, maltose, sucrose, rafinose, amido ou celulose podem servir como fontes de carbono particularmente preferidas.

Os métodos e bactérias corineformes de acordo com a invenção podem ser também usados para produzir mais metionina comparado ao organismo de partida.

Os métodos e bactérias corineformes de acordo com a invenção podem ser também usados para produzir metionina a uma taxa mais rápida comparado ao organismo de partida. Se, por exemplo, um período de produção típico for considerado, os métodos e bactérias corineformes permitirão
5 produzir metionina a uma taxa mais rápida, isto é, a mesma quantidade de metionina será produzida em um ponto de tempo prematuro comparado ao organismo de partida. Isto particularmente solicita a fase de crescimento logarítmico.

Métodos e bactérias corineformes de acordo com a invenção
10 permitem produzir pelo menos cerca de 3 g de metionina/l de volume de cultura se a cepa for incubada em incubações em frascos agitados. Uma titulação de pelo menos cerca de 4 g de metionina/l de volume de cultura, pelo menos cerca de 5 g de metionina/l de volume de cultura ou pelo menos cerca de 7 g de metionina/l de volume de cultura pode ser preferida se a cepa
15 for incubada em incubações em frascos agitados. Um valor mais preferido soma pelo menos cerca de 10 g de metionina/l de volume de cultura e até mesmo mais preferivelmente para pelo menos cerca de 20 g de metionina/l de massa de célula se a cepa for incubada em incubações em frascos agitados.

20 Métodos e bactérias corineformes de acordo com a invenção permitem produzir pelo menos cerca de 25 g de metionina/l de volume de cultura se a cepa for incubada em experimentos de fermentação usando um fermentador de fonte de carbono agitado e alimentado. Uma titulação de pelo menos cerca de 30 g de metionina/l de volume de cultura, pelo menos
25 cerca de 35 g de metionina/l de volume de cultura ou pelo menos cerca de 40 g de metionina/l de volume de cultura pode ser preferida se a cepa for incubada em experimentos de fermentação usando um fermentador de fonte de carbono agitado e alimentado. Um valor mais preferido soma pelo menos
cerca de 50 g de metionina/l de volume de cultura e até mesmo mais preferi-
velmente pelo menos cerca de 60 g de metionina/l de massa de célula se a
30 cepa for incubada em experimentos de fermentação usando um fermentador de fonte de carbono agitado e alimentado.

Em uma modalidade preferida, os métodos e micro-organismos da invenção permitem aumentar a eficiência da síntese de metionina e/ou a quantidade de metionina e/ou a titulação e/ou a taxa da síntese de metionina em comparação ao organismo de partida em pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10% ou pelo menos cerca de 20%. Em modalidades preferidas, a eficiência da síntese de metionina e/ou a quantidade de metionina e/ou a titulação e/ou a taxa é/são aumentada(s) comparado ao organismo de partida em pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, ou pelo menos cerca de 50%. Até mesmo mais preferido é um aumento de pelo menos cerca de fator 2, pelo menos cerca de fator 3, pelo menos cerca de fator 5 e pelo menos cerca de fator 10. Porém, já pode ser considerado que um aumento de cerca de 5% é uma melhoria significativa.

De acordo com a presente invenção, produção de metionina em bactérias corineformes pode ser melhorada se a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma das sete enzimas supracitadas for(em) aumentada(s) em comparação a um respectivo organismo de partida.

Em um aspecto, é preferido aumentar a quantidade e/ou atividade de transaldolase, glicose-6-fosfato-desidrogenase ou 6-fosfo-gliconato-desidrogenase. Até mesmo mais preferivelmente, isto é feito em *C. glutamicum*.

Se a quantidade e/ou atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase for(em) para ser aumentada(s) em *C. glutamicum*, a pessoa versada estará atenta que deve também aumentar concomitantemente a quantidade e/ou atividade da proteína de OCPA para a qual a sequência de codificação fica localizada 3' do gene para glicose-6-fosfato desidrogenase no genoma em *C. glutamicum*. OCPA deveria ser concomitantemente supraexpressado uma vez que parece funcionar como uma plataforma na qual glicose-6-fosfato desidrogenase funcional é montada (Moritz et al (vide supra)). A sequência de ácido nucleico de OCPA de *C. glutamicum* é descrita na SEQ ID NO. 15. A sequência de aminoácido correspondente é descrita na SEQ ID NO. 16. O número de acesso do banco de genes é Cgl1577.

Em outra modalidade, a quantidade e/ou atividade de pelo menos duas enzimas da via de pentose fosfato é/são aumentada(s) em comparação a um respectivo organismo de partida.

Em uma modalidade preferida, a quantidade e/ou atividade de transcetolase e glicose-6-fosfato-desidrogenase, transcetolase e 6-fosfogliconato-desidrogenase ou glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) concomitantemente. Em uma outra elaboração deste aspecto posterior, isto é feito em *C. glutamicum*.

Em um aspecto da invenção, pode ser preferido aumentar concomitantemente a quantidade e/ou atividade de transcetolase, glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogliconato-desidrogenase. Isto pode ser preferivelmente feito em *C. glutamicum*.

Se a quantidade e/ou atividade de pelo menos quatro enzimas da via das pentoses-fosfato for(em) para ser aumentada(s) em bactérias corineformes, isto é, preferivelmente feito concomitantemente aumentando a quantidade e/ou atividade de transcetolase, transaldolase, glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogliconato-desidrogenase. Isto pode ser preferivelmente feito em *C. Glutamicum*.

A quantidade e/ou atividade das combinações de enzimas preferidas supracitadas da via das pentoses-fosfato é/são preferivelmente aumentada(s) em *C. glutamicum*. Para este fim, pode-se usar uma cepa do tipo selvagem tal como ATCC13032 ou uma cepa que carrega outras modificações genéticas para aumentar e melhorar a síntese de metionina.

Uma tal cepa pode, por exemplo, expressar uma homosserina desidrogenase resistente à retroalimentação (*hom^{fbr}*). Uma tal cepa pode também expressar o aspartato cinase resistente à retroalimentação (*ask^{fbr}*). Um tal cepa pode exibir expressão adicionalmente aumentada de metionina sintase (*metH*). Uma cepa que é adequada para a produção de metionina e que superexpressa uma homosserina desidrogenase resistente à retroalimentação, um aspartato cinase resistente à retroalimentação e metionina sintase é, por exemplo, a DSM17322 acima mencionada do Exemplo.

Outras cepas de partida de *C. glutamicum* que podem ser prefe-

rivelmente usadas para o propósito da presente invenção carregam as modificações acima mencionadas de DSM17322 e são também aperfeiçoadas com respeito à síntese de metionina. Tais cepas podem, por exemplo, expressar níveis aumentados de uma homosserina cinase mutada (*hsk^{mutado}*),
 5 uma homosserina succiniltransferase (*metA*), e uma O-Acetil-homosserina sulfidrilase (*metY*). Uma cepa que carrega todas estas alterações genéticas é, por exemplo, M2014 do Exemplo 1. Um organismo de partida particularmente promissor em *C. glutamicum* para o propósito da presente invenção, portanto exibirá níveis aumentados de *metH*, *metY* e *metA*, *hom^{fbr}*, *ask^{fbr}* e
 10 *hsk^{mutado}*.

Um exemplo de uma homosserina desidrogenase resistente à retroalimentação carrega uma mutação de S393F na posição 393 da SEQ ID NO. 17. Este *hom^{fbr}* mostra inibição de retroalimentação reduzida através de treonina e/ou metionina. Um exemplo de um aspartato cinase
 15 resistente à retroalimentação carrega uma mutação de T311I na posição 311 da SEQ ID NO. 18. Esta *ask^{fbr}* mostra inibição de retroalimentação reduzida através de lisina e/ou treonina. Uma homosserina cinase que carrega a mutação funcional acima mencionada carrega uma mutação T190A na posição 190 da SEQ ID NO. 19 ou uma mutação T190S na posição 190 ou um códon
 20 de começo TTG.

O organismo de partida de *C. glutamicum* que pode carregar as alterações genéticas acima mencionadas tais como M2014 pode ser também melhorado excluindo as sequências de ácido nucleico para o regulador negativo (*mcbR*) (Rey, D., et al. (2005) Mol. Microbiol., 56. 871-887, Rey, D.,
 25 et al. (2003) J. Biotechnol., 103, 51-65, US2005074802) e a lipoproteína ligadora de D-metionina (*metQ*) como também aumentando expressão de N5,10-metileno-tetra-hidrofolato reductase (*metF*). Uma cepa correspondente é descrita no Exemplo 5 como OM469. Cepas que exibem alterações genéticas que são idênticas ou comparáveis com aquelas DSM17322, M2014
 30 ou OM469 podem ser preferidas como organismo de partida de *C. glutamicums*.

Pode-se aumentar a quantidade de uma enzima da via das pen-

tosés-fosfato em uma bactéria corineforme, por exemplo, aumentando o número de cópias de gene, isto é, o número de cópias da sequência de ácido nucleico que codifica a dita enzima, aumentando a transcrição, aumentando a translação, e/ou uma combinação dos mesmos.

5 A pessoa versada na técnica está familiarizada com o tipo de alterações genéticas que são necessários para aumentar o número de cópias de gene das sequências de ácido nucleico, aumentar a transcrição e/ou aumentar a translação.

10 Em geral, pode-se aumentar o número de cópia de uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo expressando um vetor na bactéria corineforme que compreende a sequência nucléica que codifica o dito polipeptídeo. Tais vetores podem ser replicáveis de forma autônoma de forma que eles podem ser estavelmente mantidos dentro da bactéria corineforme. Vetores típicos para expressar polipeptídeos e enzimas da via das
15 pentoses-fosfato em *C. glutamicum* incluem pClik pB e pEKO como descritos em Bott, M. e Eggeling, L., eds. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL; Deb, J. K. et al. (FEMS Microbiol. Lett. (1999), 175(1), 11-20), Kirchner O. et al. (J. Biotechnol. (2003), 104 (1-3), 287-299), WO2006069711 e no WO2007012078.

20 Em outra abordagem para aumentar o número de cópias de sequências de ácido nucleico que codificam um polipeptídeo em uma bactéria corineforme, pode-se integrar cópias adicionais das sequências de ácido nucleico que codificam tais polipeptídeos no cromossomo de *C. glutamicum*. Integração cromossômica pode, por exemplo, ocorrer no locus onde a cópia
25 endógena do respectivo polipeptídeo está localizada. Adicional e/ou alternativamente, multiplicação cromossômica de polipeptídeo que codifica as sequências de ácido nucleico pode ocorrer em outros loci no genoma de uma bactéria corineforme. No caso de *C. glutamicum*, há vários métodos conhecidos à pessoa versada na técnica para aumentar o número de cópias de
30 gene através de integração cromossômica. Um tal método faz uso, por exemplo, do vetor pK19 sacB e foi descrito em detalhes na publicação de Schäfer A, et al. J Bacteriol. 1994 176(23): 7309-7319. Outros vetores para

integração cromossômica de sequências de ácido nucleico de codificação de polipeptídeo incluem ou pCLIK int sacB como descrito no WO2005059093 ou WO2007011845.

5 Aumento da quantidade de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato pode ser também alcançado aumentando a transcrição das sequências de ácido nucleico que codificam as respectivas enzimas. Transcrição aumentada conduzirá a mais mRNA e por fim a uma quantidade mais alta de proteína transladada.

10 A pessoa versada na técnica está atenta que pode aumentar a transcrição de uma sequência de codificação em bactérias corineformes através de numerosas abordagens. Desse modo, pode-se aumentar a transcrição usando promotores fortes e/ou elementos intensificadores fortes. Pode-se também usar ativadores transcricionais tais como, por exemplo, aptâmeros ou supraexpressar fatores de transcrição. O uso de promotores fortes
15 pode ser preferido no contexto da presente invenção.

É considerado que um promotor é um "promotor forte" no contexto da presente invenção se ele provê um grau mais alto de transcrição para uma sequência de ácido nucleico que codifica um respectivo polipeptídeo que o promotor endógeno que precede a respectiva sequência de ácido
20 nucleico na situação do tipo selvagem.

Para o propósito da presente invenção, pode ser considerado o uso do promotor a seguir: P_{SOD} (SEQ ID NO. 20), P_{groES} (SEQ ID NO. 21), P_{EFTu} (SEQ ID NO. 22) e λ_{PR} (SEQ ID NO. 23). Estes promotores são comumente usados em *C. glutamicum* supraexpressando polipeptídeos e a
25 resistência dos promotores é considerada ter a ordem a seguir:

$$P_{\lambda R} > P_{EFTu} > P_{SOD} > P_{groES}.$$

A pessoa versada na técnica está bem atenta sempre que pode não ser desejável usar promotores mais fortes tais como λ_{PR} da lista supracitada. Em alguns casos pode ser necessário e suficiente, por exemplo, ape-
30 nas ligeiramente aumentar a quantidade de uma primeira enzima enquanto seria desejável aumentar a quantidade de uma segunda enzima tanto quanto possível. Em uma tal situação, desse modo pode-se substituir os promoto-

res endógenos da primeira e segunda enzimas em *C. glutamicum* com P_{EFTu} e λ_{PR} , respectivamente. Além de usar promotores fortes transcrionalmente ativos, escolha e sequência do assim chamado sítio de ligação ribossômico pode aumentar a quantidade de uma enzima significativamente tal como a-

5 aquelas descritas acima. Por exemplo, sequências de 5' adjacentes ao códon de começo tal como 15 bp a montante do códon de começo influencia a atividade enzimática profundamente e pode ser encontradas nas sequências de P_{EFTu} (SEQ ID NO. 22), P_{groES} (SEQ ID NO. 21), P_{SOD} (SEQ ID NO. 20) e λ_{PR} (SEQ ID NO. 23).

10 Melhoria de translação pode ser alcançada, por exemplo, otimizando o uso do códon das sequências de ácido nucleico que codificam para as respectivas enzimas. Se usar as sequências de ácido nucleico das enzimas hospedeiras, adaptação do uso do códon tipicamente não é necessária mas pode ser também aplicada. Se porém, a quantidade de por exemplo

15 glicose-6-fosfato-desidrogenase (e OCPA) for para ser aumentada através de supraexpressão da respectiva enzima de *E. coli* em *C. glutamicum*, pode ser de valor considerar adaptar a sequência de codificação da enzima de *E. coli* ao uso de códon de *C. glutamicum*.

Em algumas modalidades da invenção, é preferido aumentar o

20 número de cópias das sequências de ácido nucleico que codificam as enzimas da via das pentoses-fosfato integrando as respectivas sequências de ácido nucleico às cópias múltiplas na posição do gene endógeno no cromossomo da respectiva bactéria corineforme e preferivelmente em *C. glutamicum*. Esta abordagem usualmente preserva a integridade genômica do ge-

25 noma tanto quanto possível.

A pessoa versada na técnica, claro, também visará uma combinação das abordagens acima mencionadas e desse modo considerará, por exemplo, aumentar a quantidade de glicose-6-fosfato-desidrogenase usando o promotor forte P_{SOD} e concomitantemente aumentando o número de cópia

30 de gene para glicose-6-fosfato-desidrogenase em *C. glutamicum*.

Alguns dos genes que codificam para enzimas da via das pentoses-fosfato são organizados em *C. glutamicum* em um óperon. Este óperon

compreende os genes para transcetolase, 6-fosfo-glucono-lactonase, glicose-6-fosfato-desidrogenase e o gene chamado OCPA. O gene para 6-fosfo-gliconato-desidrogenase não faz parte deste óperon em *C. glutamicum*.

De acordo com algumas das modalidades preferidas supracitadas da invenção, é preferido aumentar a quantidade e/ou atividade de combinações de transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase, transcetolase e glicose-6-fosfato-desidrogenase como também glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase. O aumento concomitante destas três enzimas é também preferido.

Em vista da estrutura genômica e localização destas três enzimas em *C. glutamicum*, uma modalidade preferida da presente invenção refere-se, portanto, a métodos e organismos de *C. glutamicum* para produzir metionina na qual o promotor endógeno precedendo o gene de transcetolase em *C. glutamicum* é substituído por um promotor forte definido acima.

Em uma modalidade até mesmo mais preferida da presente invenção, o promotor endógeno que precede transcetolase em *C. glutamicum* é substituído com um promotor forte como definido acima, e a quantidade e/ou atividade de 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) como descrito acima. Usando uma tal abordagem, é possível alcançar um aumento da quantidade das enzimas transcetolase, glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase opcionalmente em *C. glutamicum* fazendo modificações genéticas mínimas.

Foi também descoberto que pode preferivelmente usar o promotor de P_{SOD} ao substituir o promotor endógeno que precede o gene de transcetolase em *C. glutamicum*, visto que este promotor assegura atividade transcricional eficiente para o propósito de aumentar a quantidade de transcetolase e os outros genes do óperon da via de pentose fosfato em *C. glutamicum* para produzir metionina. Similarmente, se aumentar a quantidade de 6-fosfo-gliconato-desidrogenase mediante o uso de um promotor forte, o promotor de P_{SOD} é preferido.

Em uma modalidade particularmente preferida, a presente invenção desse modo refere-se a um organismo de *C. glutamicum* em que o

promotor endógeno que precede *tkf* em *C. glutamicum* é substituído por um promotor forte e em que o promotor endógeno que precede o gene de 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é substituído por um promotor forte, o promotor forte preferivelmente sendo P_{SOD}.

5 Foi exposto acima que a atividade das enzimas da via das pentoses-fosfato pode ser aumentada introduzindo mutações nas sequências de codificação destas enzimas que levam, por exemplo, às versões resistentes à retroalimentação das respectivas enzimas. Exemplos específicos para transcetolase, glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfo-gliconato-
10 desidrogenase serão fornecidos abaixo.

No caso de transcetolase de *C. glutamicum*, uma mutação de alanina em uma posição que corresponde a A293 da SEQ ID Nº 12 para R e/ou alanina em uma posição que corresponde a A327 da SEQ ID Nº 12 para T a troca leva a uma enzima com atividade enzimática melhorada. A pes-
15 soa versada na técnica poderá desenvolver outras mutações ou alternativas com base na informação fornecida.

Uma modalidade particularmente preferida da presente invenção refere-se a micro-organismos e métodos em que a atividade e quantidade das enzimas da via das pentoses-fosfato em *C. glutamicum* são aumentadas substituindo o promotor endógeno em frente ao gene de transcetolase de *C.*
20 *glutamicum* com um promotor forte e preferivelmente com o promotor de P_{SOD}. Nesta modalidade, a transcetolase pode também carregar uma mutação que forneça o mesmo efeito que a mutação A293R e/ou A327T acima mencionada.

25 Alternativa e/ou adicionalmente, o gene de glicose-6-fosfato-desidrogenase pode carregar mutações proveem um efeito similar que as mutações A293R e A327T supracitadas para transcetolase. Estas mutações podem ser, mas não são limitadas às posições que correspondem às posições 243, e/ou 261, e/ou 288, e/ou 289, e/ou 371 da SEQ ID No. 2. Estas
30 posições podem ser mutadas de modo que a proteína resultante carregue outros aminoácidos que A243, A261, Q288, L289, V371 tais como mas não limitados a T243, P261, A288, R289, A371.

Em uma outra elaboração desta modalidade preferida da presente invenção, a quantidade e atividade da 6-fosfo-gliconato-desidrogenase em *C. glutamicum* é aumentada. A quantidade é preferivelmente aumentada usando um promotor forte, e preferivelmente por P_{SOD}. A atividade é aumentada introduzindo mutações na sequência de codificação do gene para 6-fosfo-gliconato-desidrogenase que fornece um efeito similar como as mutações A293R e A327T supracitadas em transcetolase. Em 6-fosfogluconato desidrogenase (SEQ ID No. 6), os aminoácidos que correspondem às posições 150, 209, 269, 288, 329, 330 e/ou 353 da SEQ ID No. 6 podem ser mudados de modo que a proteína resultante carregue outros aminoácidos que P150, R209, R269, A288, D329, V330, S353 tais como mas não limitados a 150S, 209P, 269K, 288R, 329G, 330L, 353F.

A pessoa versada na técnica sabe introduzir tais mutações de ponto nas sequências endógenas, por exemplo, de *C. glutamicum*. Isto pode ser alcançado, por exemplo, por integração cromossômica de uma sequência de ácido nucleico modificada que codifica para a versão mutada, por exemplo transcetolase, no locus natural da transcetolase em *C. glutamicum*. Integração cromossômica no locus original pode ser alcançada de acordo com o método de Schäfer A, et al. J Bacteriol. 1994 176(23): 7309-7319 e WO2007011845. Pode-se, claro, também usar, por exemplo, sequências derivadas do gene que codifica para transcetolase de *E. coli* que carrega a mutação. Neste caso, a mutação deveria ser introduzida em uma posição que corresponde, por exemplo, à posição 293 e/ou 327 da SEQ ID NO. 12.

A presente invenção desse modo em geral refere-se a métodos para aumentar a síntese de metionina em bactérias corineformes como também bactérias corineformes com síntese de metionina aumentada. Ambos os aspectos da invenção são caracterizados em que a quantidade e/ou atividade das enzimas da via das pentoses-fosfato é/são aumentada(s). No que diz respeito aos métodos de acordo com a invenção, a quantidade e/ou atividade de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato é/são aumentada(s) em bactérias corineformes. No tocante às bactérias corineformes, a invenção visa que a quantidade e/ou atividade de pelo menos duas

das enzimas da via das pentoses-fosfato seja(m) aumentada(s).

Em modalidades preferidas da presente invenção, as quantidades de enzimas da via das pentoses-fosfato são aumentadas em *C. glutamicum* substituindo o promotor endógeno em frente ao gene de transcetolase com um promotor forte que preferivelmente é o promotor de P_{SOD} . Em um outro desenvolvimento desta modalidade preferida, a quantidade de 6-fosfogliconato-desidrogenase é adicionalmente elevada, que pode ser também alcançada usando um promotor forte. Em modalidades que são até mesmo mais preferidas, não apenas substituir os promotores endógenos em frente ao gene de transcetolase, mas um também introduzir mutações nas sequências de codificação do gene de transcetolase e opcionalmente do gene de glicose-6-fosfato-desidrogenase que adicionalmente aumenta a atividade destas enzimas. Um outro desenvolvimento deste aspecto preferido da invenção inclui a característica pela qual a quantidade de 6-fosfogliconato-desidrogenase é aumentada em *C. glutamicum* por exemplo substituindo o promotor de 6-fosfogliconato-desidrogenase endógeno com um promotor forte, preferivelmente com P_{SOD} e que a atividade de 6-fosfogliconato-desidrogenase é aumentada introduzindo as mutações acima descritas. Estas alterações genéticas preferidas podem ser introduzidas em qualquer cepa de *C. glutamicum*. Se uma cepa do tipo selvagem for usada, ATCC13032 pode ser preferida. Porém, em algumas modalidades é preferido usar cepas que já são consideradas que são os produtores de metionina, tais como DSM17322. Outras cepas preferidas incluem o tipo de alterações genéticas como descritas acima, isto é, um aumento de *metY*, *metA*, *metH*, *hskfbr*, *ask^{fbr}* e *hom^{mutado}*. Uma cepa de *C. glutamicum* que carrega alterações genéticas correspondentes é, por exemplo, M2014. Tais cepas podem ser também melhoradas por deleção do regulador de *mcbR*, infrarregulação de *metQ* e aumento da expressão de *metF*. Uma cepa que reflete alterações genéticas correspondentes é OM469.

Tabela 1 abaixo dá uma visão geral sobre os números de acesso do Genbank das enzimas da via das pentoses-fosfato para organismos diferentes. Tabela 2 fornece números de acesso do Genbank de algumas

das outras enzimas mencionadas acima para organismos diferentes.

Tabela 1 - Enzimas da via das pentoses-fosfato

Enzima	Número de acesso do banco de genes	Organismo
Glicose-6-fosfato-desidrogenase	Cgl1576, BAB98969, NCgl1514, NCgl1514, cg1778, CE1696, DIP1304, jk0994, RHA1_ro07184, nfa35750, MSMEG_3101, Mmcs_2412, MAP1176c, Mb1482c, MT1494, Rv1447c, SAV6313, Acel_1124, SCO1937, MAV_3329, Lxx11590, BL0440, Arth_2094, Tfu_2005, itte weitere angeben	Corynebacterium glutamicum e similares
Proteína de OPCA	Cgl1577, NP_738307.1, NP_939658.1, YP_250777.1, YP_707105.1, YP_119788.1, ZP_01192082.1, NP_335942.1, ZP_01276169.1, NP_215962.1, ZP_01684361.1, YP_887415.1, ZP_01130849.1, YP_062111.1, ZP_00615668.1, YP_953530.1, ZP_00995403.1, YP_882512.1, NP_960109.1, YP_290062.1, YP_831573.1, NP_827488.1, YP_947837.1, NP_822945.1, NP_626203.1, NP_630735.1, CAH10103.1, ZP_00120910.2, NP_695642.1, YP_909493.1, YP_872881.1, YP_923728.1, YP_056265.1, ZP_01648612.1, ZP_01430762.1, ZP_00569428.1, YP_714762.1, YP_480751.1, NP_301492.1, YP_642845.1, ZP_00767699.1	Corynebacterium glutamicum e similares
6-fosfogluconolactonase	Cgl1578, NCgl1516, NCgl1516, cg1780, CE1698, DIP1306, Mmcs_2410, MSMEG_3099, Mb1480c, MT1492, Rv1445c, MAV_3331, RHA1_ro07182, nfa35770, MAP1174c, ML0579, jk0996, Tfu_2007, FRAAL4578, SAV6311, SCO1939, SCC22.21, TW464	Corynebacterium glutamicum e similares
6-fosfogliconato-desidrogenase	Cgl1452, BAB98845, NCgl1396, cgl1452, NCgl1396, cg1643, DIP1213, CE1588, jk0912, RHA1_ro07246, nfa11750, Mmcs_2812, MSMEG_3632, MT1892, Rv1844c, MAV_2871, MAP1557c, ML2065, SAV724, SCO0975, SCBAC19F3.02, BL0444, Lxx17380, Arth_2449, Mb1875c, OB0185 Bitte weitere angeben	Corynebacterium glutamicum e similares

Enzima	Número de acesso do banco de genes	Organismo
Ribulose-5-P-epimerase	Cgl1598, cg1801, CE1717, DIP1320, MS-MEG_3066, Mb1443, MT1452, Rv1408, MAV_3370, ML0554, jk1011, MAP1135, RHA1_ro07167, Mmcs_2385, nfa36030, SCO1464, SAV6880, FRAAL5223, Acel_1276, BL0753	Corynebacterium glutamicum e similares
Ribose-5-P-isomerase	Cgl2423, cg2658, CE2318, DIP1796, nfa13270, jk0541, RHA1_ro01378, MSMEG_4684, Mmcs_3599, Mb2492c, Rv2465c, MT2540, ML1484, MAV_1707, MAP2285c, SCO2627, SAV5426, Tfu_2202, Arth_2408, PPA1624, Francci3_1162	Corynebacterium glutamicum e similares
Transceto-lase	Cgl1574, YP_225858, cg1774, CE1694, DIP1302, jk0992, nfa35730, RHA1_ro07186, MSMEG_3103, MAP1178c, ML0583, MAV_3327, Mb1484c, MT1496, Rv1449c, Mmcs_2414, Tfu_2002, Arth_2097, Lxx11620, SAV1766, SCO1935, Acel_1127	Corynebacterium glutamicum e similares
Transaldo-lase	Cgl1575, cg1776, CE1695, DIP1303, jk0993, Mmcs_2413, MSMEG_3102, MAP1177c, RHA1_ro07185, MAV_3328, Mb1483c, Rv1448c, MT1495, nfa35740, ML0582, Arth_2096, Lxx11610, SAV1767, Tfu_2003, SCO1936, Francci3_1648	Corynebacterium glutamicum e similares

Tabela 2 - Enzimas de organismos produtores de metionina

Enzima	Número de acesso do banco de genes	Organismo
Metileno tetra-hidrofolato reductase (<i>metF</i>)	Cgl2171, CE2066, cg2383, DIP1611, jk0737, RHA1_ro01105, nfa17400, Tfu_1050, Acel_0991, SAV6100, SCO2103, FRAAL2163, Francci3_1389, aq_1429, TTC1656, TTHA0327, ELI_10095, CT1368, Sala_0035, DP1612, Pcar_1732	<i>C. glutamicum</i> e similares
sintase de metionina dependente de cob(I)alaminas (<i>metH</i>)	Cgl1507, CE1637, cg1701, DIP1259, RHA1_ro00859, nfa31930, Rv2124c, Mb2148c, ML1307, SCO1657, Tfu_1825, SAV6667, Arth_3627, Acel_1174, MT2183, GOX2074, tll1027, GbCGDNIH1_0151, Rru_A1531, alr0308, slr0212	<i>C. glutamicum</i> e similares
O-acetil-homosserina sulf-hidrolase (<i>metY</i>)	Cgl0653, NCgl0625, cg0755, CE0679, DIP0630, jk1694, MAP3457, Mb3372, MT3443, Rv3340, nfa35960, Lxx18930, Tfu_2823, CAC2783, GK0284, BH2603, lmo0595, lin0604, LMOF2365_0624, ABC0432, TTE2151, BT2387, STH2782, str0987, stu0987, BF1406, SH0593, BF1342, lp_2536, L75975, OB3048, BL0933, LIC11852, LA2062, BMAA1890, BPSS0190, SMU.1173, BB1055, PP2528, PA5025, PBPRB1415, GSU1183, RPA2763, WS1015, TM0882, VP0629, BruAb1_0807, BMEI1166, BR0793, CPS_2546, XC_1090, XCC3068, plu3517, PMT0875, SYNW0851, Pro0800, CT0604, NE1697, RB8221, bli1235, syc1143_c, ACIAD3382, eba6307, RSc1562, Daro_2851, DP2506, DR0873, MA2715, PMM0642, PMN2A_0083, IL2014, SPO1431, ECA0820, AGR_C_2311, Atu1251, mlr8465, SMc01809, CV1934, SPBC428.11, PM0738, SO1095, SAR11_1030, PFL_0498, CTC01153, BA_0514, BCE5535, BAS5258, GBAA5656, BA5656, BCZK5104, TTHA0760, TTC0408, BC5406, BT9727_5087, HH0636, YLR303W, ADL031W, CJE1895, spr1095, rrnAC2716, orf19.5645, Cj1727c, VNG2421G, PSPPH_1663, XOO1390, Psyr_1669, PSPTO3810, MCA2488, TDE2200,	<i>C. glutamicum</i> e similares

Enzima	Número de acesso do banco de genes	Organismo
	FN1419, PG0343, Psyc_0792, MS1347, CC3168, Bd3795, MM3085, 389.t00003, NMB1609, SAV3305, NMA1808, GOX1671, APE1226, XAC3602, NGO1149, ZMO0676, SCO4958, l-pl0921, lpg0890, lpp0951, EF0290, BPP2532, CBU2025, BP3528, BLi02853, BL02018, BG12291, CG5345-PA, HP0106, ML0275, jhp0098, At3g57050, 107869, HI0086, NTHI0100, SpyM3_0133, SPs0136, spyM18_0170, M6_Spy0192, SE2323, SERP0095, SPy0172, PAB0605, DDB0191318, ST0506, F22B8.6, PTO1102, CPE0176, PD1812, XF0864, SAR0460, SACOL0503, SA0419, Ta0080, PF1266, MW0415, SAS0418, SSO2368, PAE2420, TK1449, 1491, TVN0174, PH1093, VF2267, Saci_0971, VV11364, CMT389C, VV3008	
Aspartato cinase (ask)	Cgl0251, NCgl0247, CE0220, DIP0277, jk1998, nfa3180, Mb3736c, MT3812, Rv3709c, ML2323, MAP0311c, Tfu_0043, Francci3_0262, SCO3615, SAV4559, Lxx03450, PPA2148, CHY_1909, MCA0390, cbdb_A1731, TWT708, TW725, Gmet_1880, DET1633, GSU1799, Moth_1304, T-cr_1589, Mfla_0567, HCH_05208, PSPPH_3511, Psyr_3555, PSPTO1843, CV1018, STH1686, NMA1701, Tbd_0969, NMB1498, Pcar_1006, Daro_2515, Csal_0626, Tmden_1650, PA0904, PP4473, Sde_1300, HH0618, NGO0956, ACI-AD1252, PFL_4505, ebA637, Noc_0927, WS1729, Pcryo_1639, Psyc_1461, Pfl_4274, LIC12909, LA0693, Rru_A0743, NE2132, RB8926, Cj0582, Nmul_A1941, SYN_02781, TTHA0534, CJE0685, BURPS1710b_2677, BPSL2239, BMA1652, RSc1171, TTC0166, RPA0604, BTH_I1945, B-pro_2860, Rmet_1089, Reut_A1126, RPD_0099, Bxe_A1630, Bcep18194_A5380, aq_1152, RPB_0077, Rfer_1353, RPC_0514, BH3096, BLi02996, BL00324, amb1612, tlr1833, jhp1150, blr0216, Dde_2048, BB1739, BPP2287, BP1913, DVU1913, Nwi_0379, ZMO1653, Jann_3191,	<i>C. glutamicum</i> e similares

Enzima	Número de acesso do banco de genes	Organismo
	HP1229, Saro_3304, Nham_0472, CBU_1051, slr0657, SPO3035, Synpcc7942_1001, BG10350, BruAb1_1850, BAB1_1874, BMEI0189, BT9727_1658, syc0544_d, BR1871, gll1774, BC1748, mll3437, BCE1883, ELI_14545, RSP_1849, BCZK1623, BAS1676, BA_2315, GBAA1811, BA1811, Ava_3642, alr3644, PSHA-a0533, AGR_L_1357, Atu4172, lin1198, BH04030, PMT9312_1740, SMc02438, CYA_1747, RHE_CH03758, Imo1235, LMOF2365_1244, PMN2A_1246, CC0843, Pro1808, BQ03060, PMT0073, Syncc9902_0068, GOX0037, CYB_0217	
Homosserina succinil-transferase (<i>metA</i>)	Cgl0652, CE0678, CE0678, cg0754, DIP0623, jk1695, nfa9220, RHA1_ro06236, MAP3458, MAV_4316, MSMEG_1651, Mmcs_1207, ML0682, Mb3373, Rv3341, MT3444, Tfu_2822, Arth_1318, Francci3_2831, Lxx18950, FRAAL4363, Cag_1206, Adeh_1400, Plut_0593, CT0605, CHY_1903, Moth_1308, Ava_4076, STH1685, SRU_0480, Mbur_0798, Mhun_2201, RPC_4281 Msp_0676	<i>C. glutamicum</i> e similares
Homosserina desidrogenase (<i>hom</i>)	Cgl1183, CE1289, cg1337, DIP1036, jk1352, nfa10490, RHA1_ro01488, MSMEG_4957, Mmcs_3896, MAV_1509, Mb1326, Rv1294, MT1333, MAP2468c, ML1129, SAV2918, SCO5354, FRAAL5951, Francci3_3725, Tfu_2424, Acel_0630	<i>C. glutamicum</i> e similares
Homosserina cinase (<i>hsk</i>)	Cgl1184, cg0307, CE0221, DIP0279, jk1997, RHA1_ro04292, nfa3190, Mmcs_4888, MS-MEG_6256, MAP0310c, MAV_0394, Mb3735c, MT3811, Rv3708c, Acel_2011, ML2322, PPA0318, Lxx03460, SCO2640, SAV5397, CC3485	<i>C. glutamicum</i> e similares
Lipoproteína ligante de D-metionina (<i>metQ</i>)	YP_224930, NP_599871, NP_737241, NP_938985, NP_938984, YP_701727, YP_251505, YP_120623, YP_062481, YP_056445, ZP_00121548, NP_696133, YP_034633, YP_034633, YP_081895, ZP_00390696,	<i>C. glutamicum</i> e similares

Enzima	Número de acesso do banco de genes	Organismo
	YP_016928, YP_026579, NP_842863, YP_081895, ZP_00240243, NP_976671	
mcbR	cg3253, CE2788, DIP2274, jk0101, nfa21280, MSMEG_4517Lxx16190, SCO4454, Bcep18194_A3587, Bamb_0404, Bcen2424_0499, Bcen_2606, Ava_4037, BTH_I2940, RHA1_ro02712, BMA10299_A1735, BMA-SAVP1_A0031, BMA2807, BURPS1710b_3614	<i>C. glutamicum</i> e similares

Os números de acesso acima são os números de acesso oficiais do Genbank ou são sinônimos aos números de acesso que têm referência cruzada no Genbank. Estes números podem ser pesquisados e encontrados em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

- 5 Uma visão geral é dada abaixo para como aumentar e diminuir a quantidade e/ou atividade de polipeptídeos e genes em *C. glutamicum*. A pessoa versada na técnica pode confiar esta informação ao pôr as modalidades além daquelas descritas nos exemplos abaixo em prática.

AUMENTANDO OU INTRODUZINDO A QUANTIDADE E/OU ATIVIDADE

- 10 Com respeito em aumentar a quantidade, dois cenários básicos podem ser diferenciados. No primeiro cenário, a quantidade da enzima é aumentada por expressão de uma versão exógena da respectiva proteína. No outro cenário, expressão da proteína endógena é aumentada influenciando a atividade, por exemplo, do elemento dos sítios de ligação ribossômico de promotor e/ou intensificadores e/ou outras atividades reguladoras que
- 15 regulam as atividades das respectivas proteínas em um nível transcricional, translacional ou pós-translacional.

- Desse modo, o aumento da atividade e da quantidade de uma proteína pode ser alcançado por meio de rotas diferentes, por exemplo trocando mecanismos reguladores inibidores no nível transcricional, translacional, e de proteína ou por aumento da expressão do gene de um ácido nucleico que codifica para estas proteínas comparado com o organismo de partida, por exemplo induzindo transcetolase endógena por um promotor forte e/ou introduzindo ácidos nucleicos que codificam para transcetolase.
- 20

Em uma modalidade, o aumento da quantidade e/ou atividade das enzimas da Tabela 1 ou Tabela 2 é alcançada introduzindo ácidos nucleicos que codificam as enzimas da Tabela 1 ou Tabela 2 nas bactérias coryneformes, preferivelmente *C. glutamicum*.

5 Em princípio, toda proteína de organismos diferentes com uma atividade enzimática das proteínas listadas na Tabela 1 ou 2, pode ser usada. Com sequências de ácido nucleico genômicas de tais enzimas de fontes eucarióticas contendo íntrons, sequências de ácido nucleico já processadas como os cDNAs correspondentes são para ser usadas no caso como o or-
10 ganismo hospedeiro não é capaz ou não pode ser feito capaz de realizar o *splicing* dos mRNAs correspondentes. Todos os ácidos nucleicos mencionados na descrição podem ser, por exemplo, uma sequência de RNA, DNA ou de cDNA.

De acordo com a presente invenção, aumentando ou introduzin-
15 do a quantidade de uma proteína tipicamente compreende as etapas a seguir:

a) produção de um vetor compreendendo as sequências de ácido nucleico a seguir, preferivelmente sequências de DNA, em orientação 5'-3':

20 - uma sequência de promotor funcional nos organismos da invenção

- operativamente ligado a uma sequência de DNA que codifica para uma proteína da este por exemplo Tabela 1, homólogos funcionais, fragmentos funcionais ou versões mutadas funcionais dos mesmos

25 - uma sequência de terminação funcional nos organismos da invenção

b) transferência do vetor da etapa a) para os organismos da invenção tais como *C. glutamicum* e, opcionalmente, integração nos respectivos genomas.

30 Como exposto acima, fragmentos funcionais refere-se a fragmentos de sequências de ácido nucleico que codificam para enzimas, por exemplo, da Tabela 1 ou 2, a expressão destas ainda leva às proteínas ten-

do atividade enzimática da respectiva proteína de comprimento total.

O método supracitado pode ser usado para aumentar a expressão das sequências de DNA que codificam para enzimas, por exemplo, da Tabela 1 ou fragmentos funcionais dos mesmos. O uso de tais vetores compreendendo sequências reguladoras, como as sequências promotoras e de terminação, é conhecido à pessoa versada na técnica. Além disso, a pessoa versada na técnica sabe como um vetor da etapa a) pode ser transferido para organismos tais como *C. glutamicum* e que as propriedades que um vetor tem que ter podem ser integradas em seus genomas.

De acordo com a presente invenção, um aumento da expressão de gene de um ácido nucleico que codifica uma enzima da Tabela 1 ou 2 é também entendido ser a manipulação da expressão das respectivas enzimas endógenas de um organismo, em particular de *C. glutamicum*. Isto pode ser alcançado, por exemplo, alterando a sequência de DNA de promotor para genes que codificam estas enzimas. Uma tal alteração, que causa uma taxa de expressão alterada, preferivelmente aumentada, destas enzimas, pode ser alcançada por substituição com promotores fortes e através de deleção e/ou inserção das sequências de DNA.

Uma alteração da sequência de promotor dos genes endógenos usualmente causa uma alteração da quantidade expressa do gene e portanto também uma alteração da atividade detectável na célula ou no organismo.

Além disso, uma expressão alterada e aumentada, respectivamente, de um gene endógeno pode ser alcançada por uma proteína reguladora que não ocorre no organismo transformado e que interage com o promotor destes genes. Um tal regulador pode ser uma proteína quimérica que consiste em um domínio de ligação de DNA e um domínio ativador de transcrição, como por exemplo descrito em WO 96/06166.

Uma outra possibilidade para aumentar a atividade e o conteúdo dos genes endógenos é suprarregular os fatores de transcrição envolvidos na transcrição dos genes endógenos, por exemplo, por meio de supraexpressão. As medidas para supraexpressão dos fatores de transcrição são conhecidas à pessoa versada na técnica.

A expressão de enzimas endógenas tais como aqueles da Tabela 1 pode ser regulada, por exemplo, por meio da expressão de aptâmeros que especificamente ligam às sequências de promotor dos genes. Dependendo do aptâmero que liga às regiões de promotor estimulantes ou repressoras, a quantidade das enzimas da Tabela 2 pode ser, por exemplo, aumentado.

Além disso, uma alteração da atividade dos genes endógenos pode ser alcançada por mutagênese direcionada das cópias de gene endógenas.

Uma alteração dos genes endógenos que codificam para as enzimas da Tabela 1, por exemplo, pode ser também alcançada influenciando as modificações pós-translacionais das enzimas. Isto pode ocorrer por exemplo regulando a atividade das enzimas como glicose-6-fosfato cinases ou desidrogenases envolvidas na modificação pós-translacional das enzimas por meio de medidas correspondentes como supraexpressão ou silenciamento de gene.

Em outra modalidade, uma enzima pode ser melhorada em eficiência, ou sua região de controle alostérica destruída de modo que inibição de retroalimentação da produção do composto é impedida. Similarmente, uma enzima degradante pode ser deletada ou modificada por substituição, deleção, ou adição de modo que sua atividade degradante é minorada para a enzima desejada da Tabela 1 sem prejudicar a viabilidade da célula. Em cada caso, o rendimento geral, taxa de produção ou quantidade de metionina é aumentada.

É também possível que tais alterações nas proteínas, por exemplo, da Tabela 1, possa melhorar a produção de outras químicas finas tais como outros compostos contendo enxofre como cisteína ou glutatona, outros aminoácidos, vitaminas, cofatores, nutracêuticos, ácidos nucleicos, nucleosídeos, e trealose. Metabolismo de qualquer um composto pode ser entrelaçado com outras vias biossintéticas e degradantes dentro da célula, e cofatores, intermediários, ou substratos necessários em uma via podem ser providos ou limitados por outra tal via. Portanto, modulando a atividade de

uma ou mais das proteínas da Tabela 1, a quantidade, eficiência e taxa das outras químicas finas, além de metionina, podem ser positivamente impactadas.

- Estas estratégias acima mencionadas para aumentar ou introduzir a quantidade e/ou atividade das enzimas da Tabela 1 não são significadas ser limitativas; variações destas estratégias serão facilmente evidentes a um versado na técnica.

REDUZINDO A QUANTIDADE E/OU ATIVIDADE DAS ENZIMAS

- Foi exposto acima que pode ser preferido usar organismo de partida que já foi aperfeiçoado para a produção de metionina. Em *C. glutamicum* pode-se, por exemplo, infrarregular a atividade de *metQ*.

Para reduzir a quantidade e/ou atividade das enzimas, várias estratégias estão disponíveis.

- A expressão de enzimas endógenas tais como aquelas da Tabela 2 pode ser, por exemplo, regulada por meio da expressão de aptâmeros que especificamente ligam às sequências de promotor dos genes. Dependendo do aptâmero que liga às regiões de promotor estimulantes ou represoras, a quantidade e desse modo, neste caso, a atividade, das enzimas da Tabela 2 pode ser por exemplo reduzida.

- Aptâmeros podem também ser projetados de certo modo para especificamente ligar às enzimas em si e reduzir a atividade das enzimas por exemplo ligando ao centro catalítico das respectivas enzimas. A expressão de aptâmeros é usualmente alcançada por supraexpressão com base em vetor (vide acima) e é, como também o projeto e a seleção dos aptâmeros, bem-conhecida à pessoa versada na técnica (Famulok *et al.*, (1999) *Curr Top Microbiol Immunol.*, 243,123-36).

- Além disso, uma diminuição da quantidade e da atividade das enzimas endógenas da Tabela 2 pode ser alcançada por meio de várias medidas experimentais que são bem-conhecidas à pessoa versada na técnica. Estas medidas estão usualmente resumidas sob o termo "silenciamento de gene". Por exemplo, a expressão de um gene endógeno pode ser silenciada transferindo um vetor supracitado que tem uma sequência de DNA que codi-

fica para a enzima ou partes da mesma em ordem antissenso para organismos tais como *C. glutamicum*. Isto é com base no fato que a transcrição de um tal vetor na célula leva a um RNA que pode hibrida com o mRNA transcrito pelo gene endógeno e portanto impede sua translação.

5 Em princípio, a estratégia antissenso pode ser acoplada com um método de ribozima. Ribozimas são sequências de RNA cataliticamente ativas que, se acopladas às sequências antissenso, cataliticamente clivam as sequências-alvo (Tanner et al., (1999) *FEMS Microbiol Rev.* 23 (3), 257-75). Isto pode intensificar a eficiência de uma estratégia antissenso.

10 Para criar um micro-organismo recombinante homólogo, um vetor é preparado contendo pelo menos uma porção de gene que codifica para uma enzima da Tabela 1 à qual uma deleção, adição ou substituição foi introduzida para assim alterar, por exemplo, funcionalmente romper, o gene endógeno.

15 Em uma modalidade, o vetor é projetado de modo que, em recombinação homóloga, o gene endógeno seja rompido funcionalmente (isto é, já não codifica uma proteína funcional). Alternativamente, o vetor pode ser projetado de modo que, em recombinação homóloga, o gene endógeno seja mutado ou do contrário alterado mas ainda codifica a proteína funcional, por exemplo, a região reguladora a montante pode ser alterada para assim alterar a expressão das enzimas endógenas, por exemplo, da Tabela 2. Esta abordagem pode ter a vantagem que expressão de uma enzima não é abolida completamente, mas reduzida para o nível mínimo requerido. A pessoa versada sabe que vetores podem ser usados para substituir ou excluir sequências endógenas. Para *C. glutamicum*, tais vetores incluem pK19 e p-CLIK int sacB. Uma descrição específica para romper sequências cromossômicas em *C. glutamicum* é fornecida abaixo.

20 Para *C. glutamicum*, tais vetores incluem pK19 e p-CLIK int sacB. Uma descrição específica para romper sequências cromossômicas em *C. glutamicum* é fornecida abaixo.

Além disso, repressão de gene é possível reduzindo a quantidade de fatores de transcrição.

30 Fatores que inibem a própria proteína-alvo podem ser também introduzidos em uma célula. Os fatores de ligação de proteína podem ser, por exemplo, os aptâmeros supracitados (Famulok et al., (1999) *Curr Top*

Microbiol Immunol. 243, 123-36).

Como outros fatores de ligação de proteína, a expressão destes pode causar uma redução da quantidade e/ou da atividade das enzimas da tabela 1, anticorpos enzima-específicos podem ser considerados. A produção de anticorpos enzima-específicos recombinantes tais como anticorpos de cadeia simples é conhecida na técnica. A expressão de anticorpos é também conhecida da literatura (Fiedler et al., (1997) *Immunotechnology* 3, 205-216; Maynard e Georgiou (2000) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2, 339-76).

As técnicas mencionadas são bem-conhecidas à pessoa versada na técnica. Portanto, o versado também sabe o tamanho típico que umas construções de ácido nucleico usadas, por exemplo, para os métodos antis-senso têm que ter e que complementaridade, homologia ou identidade as respectivo sequências de ácido nucleico têm que ter. Os termos complementaridade, homologia, e identidade são conhecidos à pessoa versada na técnica.

O termo complementaridade descreve a capacidade de uma molécula de ácido nucleico para hibridar com outra molécula de ácido nucleico devido às ligações de hidrogênio entre as duas bases complementares. A pessoa versada na técnica sabe que duas moléculas de ácido nucleico não têm que exibir uma complementaridade de 100% para serem capazes de hibridarem entre si. Uma sequência de ácido nucleico que é hibridada com outra sequência de ácido nucleico é preferivelmente pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, preferivelmente pelo menos 70%, particularmente preferido pelo menos 80%, também particularmente preferido pelo menos 90%, em particular preferido pelo menos 95% e mais preferivelmente pelo menos 98 ou 100%, respectivamente, complementar com a dita outra sequência de ácido nucleico.

A hibridação de uma sequência antissenso com uma sequência de mRNA endógena tipicamente ocorre *in vivo* sob condições celulares ou *in vitro*. De acordo com a presente invenção, hibridação é realizada *in vivo* ou *in vitro* sob condições que são rigorosas o bastante para assegurar uma hibridação específica.

Condições de hibridação rigorosas *in vitro* são conhecidas à pessoa versada na técnica e podem ser tiradas da literatura (vide, por exemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press (2001)). O termo "hibridação específica" refere-se ao caso em que uma molécula liga-se preferencialmente a uma certa sequência de ácido nucleico sob condições rigorosas, se esta sequência de ácido nucleico faz parte de uma mistura complexa de, por exemplo, moléculas DNA ou de RNA.

O termo "condições rigorosas", portanto, refere-se às condições sob as quais uma sequência de ácido nucleico liga-se preferencialmente a uma sequência-alvo, mas não, ou pelo menos até uma extensão significativamente reduzida, a outras sequências.

Condições rigorosas são dependentes das circunstâncias. Sequências mais longas especificamente hibridam-se em temperaturas mais altas. Em geral, condições rigorosas são escolhidas em um tal modo que a temperatura de hibridação fique cerca de 5°C abaixo do ponto de fundição (T_m) da sequência específica com uma resistência iônica definida e um valor de pH definido. T_m é a temperatura (com um valor de pH definido, uma resistência iônica definida e uma concentração de ácido nucleico definida) na qual 50% das moléculas que são complementares a uma sequência-alvo hibridam-se com a dita sequência-alvo. Tipicamente, condições rigorosas compreendem concentrações de sal entre 0,01 e 1,0 M íons de sódio (ou íons de outro sal) e um valor de pH entre 7,0 e 8,3. A temperatura é pelo menos 30°C para moléculas curtas (por exemplo, para tais moléculas compreendendo entre 10 e 50 ácidos nucleicos). Além disso, condições rigorosas podem compreender a adição de agentes desestabilizantes como, por exemplo, formamida. Hibridação típica e tampões de lavagem são da composição a seguir.

Solução de Pré-hibridação:

0,5% SDS
5x SSC
NaPO₄ a 50 mM, pH 6,8
0,1% Na-pirofosfato

5x reagente de Denhardt
100 µg/esperma de salmão

Solução de hibridação:

Solução de Pré-hibridação

5 1×10^6 cpm/ml de sonda (5-10 min 95°C)

20x SSC:

NaCl a 3 M
citrato de sódio a 0,3 M
ad pH 7 com HCl

10 50x reagente de Denhardt:

5 g Ficoll
5 g polivinilpirrolidona
5 g Albumina de Soro Bovino
ad 500 ml A. dest.

15 Um procedimento típico para a hibridação é como segue:

Opcional: lavar Blot 30 min em 1x SSC / 0,1% SDS a 65°C

Pré-hibridação: pelo menos 2 h a 50-55°C

Hibridação: durante noite a 55-60°C

Lavagem: 05 min 2x SSC / 0,1% SDS

20 Temperatura de hibridação

30 min 2x SSC / 0,1% SDS

Temperatura de hibridação

30 min 1x SSC / 0,1% SDS

Temperatura de hibridação

25 45 min 0,2x SSC / 0,1% SDS 65°C

5 min 0,1x SSC temperatura ambiente

Para propósitos antissenso, complementaridade em comprimentos de sequência de 100 ácidos nucleicos, 80 ácidos nucleicos, 60 ácidos nucleicos, 40 ácidos nucleicos e 20 ácidos nucleicos pode bastar. Comprimentos de ácidos nucleicos mais longos certamente também bastaram. Uma aplicação combinada dos métodos supracitados é também concebível.

30

Se, de acordo com a presente invenção, as sequências de DNA

forem usadas, que são operativamente ligadas em orientação 5'-3' a um promotor ativo no organismo, vetores podem, em geral, ser construídos que, após a transferência para as células do organismo, permitem a supraexpressão da sequência de codificação ou causam a supressão ou competição e bloqueio das sequências de ácido nucleico endógenas e as proteínas expressas das mesmas, respectivamente.

A atividade de uma enzima particular pode ser também reduzida supraexpressando um mutante não-funcional da mesma no organismo. Desse modo, um mutante não-funcional que não é capaz de catalisar a reação em questão, mas que é capaz de ligar, por exemplo, o substrato ou cofator, pode, por via de supraexpressão competir a enzima endógena e, portanto, inibir a reação. Outros métodos para reduzir a quantidade e/ou atividade de uma enzima em uma célula hospedeira são bem-conhecidos à pessoa versada na técnica.

De acordo com a presente invenção, as enzimas não-funcionais têm essencialmente as mesmas sequências de ácido nucleico e sequências de aminoácido, respectivamente, como enzimas funcionais e funcionalmente fragmentos das mesmas, mas têm, em algumas posições, mutações de ponto, inserções ou deleções de ácidos nucleicos ou aminoácidos, que têm o efeito que a enzima não-funcional não é apenas em uma extensão muito limitada capaz de catalisar a respectiva reação. Estas enzimas não-funcionais podem não ser misturadas com as enzimas que ainda são capazes de catalisar a respectiva reação, mas que não são mais reguladas por retroalimentação. De acordo com a presente invenção, o termo "enzima não-funcional" não compreende tais proteínas tendo nenhuma homologia de sequência substancial para as respectivas enzimas funcionais no nível de aminoácido e nível de ácido nucleico, respectivamente. Proteínas incapazes de catalisar as respectivas reações e não tendo nenhuma homologia de sequência substancial com a respectiva enzima são, portanto, por definição, não significadas pelo termo "enzima não-funcional" da presente invenção. Enzimas não-funcionais são, dentro do escopo da presente invenção, também referidas como enzimas inativadas ou inativas.

Portanto, enzimas não-funcionais, por exemplo, da Tabela 2 de acordo com a presente invenção que carregam as mutações de ponto, inserções, e/ou deleções supracitadas são caracterizadas por uma homologia de sequência substancial às enzimas do tipo selvagem, por exemplo, da Tabela 2 de acordo com a presente invenção ou partes funcionalmente equivalentes das mesmas. Para determinar uma homologia de sequência substancial, os graus de identidade acima descritos são para ser aplicados.

VETORES E CÉLULAS HOSPEDEIRAS

Um aspecto da invenção refere-se a vetores, preferivelmente vetores de expressão, contendo umas sequências de ácido nucleico como mencionadas acima. Como aqui usado, o termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligado.

Um tipo de vetor é um "plasmídeo" que se refere a uma alça de DNA de fita dupla circular à qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral.

Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira à qual eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos que têm uma origem bacteriana de replicação e vetores mamíferos episomais). Outros vetores são integrados no genoma de uma célula hospedeira sob introdução na célula hospedeira, e assim são replicados junto com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão dos genes aos quais eles são operativamente ligados.

Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão".

Em geral, vetores de expressão de utilidade nas técnicas de DNA recombinante são frequentemente na forma de plasmídeos. No presente relatório descritivo, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados alternadamente como o plasmídeo é a forma mais comumente usada de vetor. Porém, é intencionado que a invenção inclua outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais que servem funções equivalentes.

Os vetores de expressão recombinantes da invenção podem

compreender um ácido nucleico como mencionado acima em uma forma adequada para expressão do respectivo ácido nucleico em uma célula hospedeira que significa que os vetores de expressão recombinantes incluem uma ou mais sequências reguladoras, selecionadas em base das células hospedeiras a serem usadas para expressão que é operativamente ligada à sequência de ácido nucleico a ser expressada.

Para o propósito da presente invenção, uma ligação operativa é entendida ser o arranjo sequencial de promotor, sequência de codificação, terminador e, opcionalmente, outros elementos reguladores em um tal modo que cada um dos elementos reguladores podem cumprir sua função, de acordo com sua determinação, ao expressar a sequência de codificação.

Dentro de um vetor de expressão recombinante, "operavelmente ligado" é desse modo intencionado significar que a sequência de ácido nucleico de interesse é ligada à(s) sequência(s) reguladora(s) de uma maneira que permite a expressão da sequência de ácido nucleico (por exemplo, em um sistema de transcrição/translação *in vitro* ou em uma célula hospedeira quando o vetor for introduzido na célula hospedeira). O termo "sequência reguladora" é intencionado incluir os promotores, sítios de ligação de repressor, sítios de ligação de ativador, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, terminadores ou outros elementos da estrutura secundária de mRNA). Tais sequências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Sequências reguladoras incluem aquelas que direcionam expressão constitutiva de uma sequência de ácido nucleico em muitos tipos de células hospedeiras e aquelas que dirigem a expressão da sequência de ácido nucleico apenas em certas células hospedeiras. Sequências reguladoras preferidas são, por exemplo, promotores tais como cos-, tac-, trp-, tet-, trp-, tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-, moça-, trc-, ara-, SP6-, arny, SP02, SOD, EFTu, EFTs, GroEL, Metz (todos de *C. glutamicum*) que são usados preferivelmente em bactérias. É também possível usar promotores artificiais. Será apreciado por alguém de habilidade usual na técnica que o projeto do vetor de expressão

pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Os vetores de expressão da invenção podem ser introduzidos em células hospedeiras para assim produzir proteínas ou peptídeos, incluindo proteínas ou peptídeos de fusão, codificados pelas sequências de ácido nucleico supracitadas.

Expressão das proteínas em procariotos é mais frequentemente realizada com vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis que direcionam a expressão das proteínas de fusão ou de não-fusão.

Vetores de fusão acrescentam vários aminoácidos a uma proteína na codificada neles, usualmente para o término amino da proteína recombinante mas também para o término C ou fundido dentro das regiões adequadas nas proteínas. Tais vetores de fusão tipicamente servem três 4 propósitos: 1) aumentar a expressão da proteína recombinante; 2) aumentar a solubilidade da proteína recombinante; e 3) auxiliar na purificação da proteína recombinante agindo como um ligante na purificação por afinidade 4) fornecer um "marcador" para detecção posterior da proteína. Frequentemente, nos vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítico é introduzido na junção da metade de fusão e da proteína recombinante para permitir separação da proteína recombinante da metade de fusão subsequente para purificação da proteína de fusão. Tais enzimas, e suas sequências de reconhecimento de cognato, incluem Fator Xa, trombina e enterocinase.

Vetores de expressão de fusão típicos incluem pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. e Johnson, K. S. (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) e pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fundem Glutathione S-transferase (GST), proteína ligadora E de maltose, ou proteína A, respectivamente.

Exemplos de vetores de expressão de não-fusão induzíveis adequados para bactérias corineformes incluem pHM1519, pBLI, pSA77 ou pAJ667 (Pouwels et al., eds. (1985) Cloning Vectors. Elsevier: Nova Iorque IBSN 0 444 904018). Exemplos de vetores ponte de *C. glutamicum* e *E. coli* adequados são por exemplo pK19, pClik5aMCS pCLIKint sacB ou pode ser encontrado em Eikmanns et al (Gene. (1991) 102, 93-8) e nas publicações e

pedidos de patente a seguir (Schäfer A, et al. J Bacteriol. 1994 176: 7309-7319, Bott, M., e Eggeling, L., eds. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL WO2006069711, WO2006069711). Para outros sistemas de expressão adequados para células procarióticas e eucarióticas vide capítulos 16 e 17 de Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003.

DNA de vetor pode ser introduzido em procariótico por meio de técnicas transformação ou transfecção convencionais. Como aqui usado, os termos "transformação" e "transfecção", "conjugação" e "transdução" são intencionados a referir-se a uma variedade de técnicas reconhecidas na técnica para introduzir ácido nucleico estranho (por exemplo, DNA ou RNA linear (por exemplo, um vetor linearizado ou uma construção de gene sozinho sem um vetor) ou ácido nucleico na forma de um vetor (por exemplo, um plasmídeo, fago, fasmídeo, fagemídeo, transpóson ou outro DNA em uma célula hospedeira, incluindo co-precipitação de fosfato de cálcio ou de cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrano, lipofecção, competência natural, transferência mediada por químicas, ou eletroporação. Métodos adequados para transformar ou transfeccionar células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook, et al. (Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2003), e outros manuais de laboratório.

A fim de identificar e selecionar estes integrantes, um gene que codifica um marcador selecionável (por exemplo, resistência a antibióticos) é em geral introduzido nas células hospedeiras juntamente com o gene de interesse. Marcadores selecionáveis preferidos incluem aqueles que conferem resistência a fármacos, tais como G418, higromicina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina e metotrexato. Ácido nucleico que codifica um marcador selecionável pode ser introduzido em uma célula hospedeira no mesmo vetor como que codificando as sequências de ácido nucleico supracitadas modificadas ou podem ser introduzidos em um vetor separado. Células estavelmente transfeccionadas com o ácido nucleico introduzido podem

ser identificadas através de seleção de fármaco (por exemplo, células que incorporaram o gene marcador selecionável sobreviverão, enquanto as outras células morrerão).

5 Em outra modalidade, micro-organismos recombinantes podem ser produzidos que contém sistemas selecionados que permitem expressão regulada do gene introduzido. Por exemplo, inclusão de uma das sequências de ácido nucleico supracitadas em um vetor que a coloca sob controle do lac óperon permite expressão do gene apenas na presença de IPTG. Tais sistemas reguladores são bem-conhecidos na técnica.

10 Outro aspecto da invenção diz respeito a organismos ou células hospedeiras às quais um vetor de expressão recombinante da invenção foi introduzido. Os termos "célula hospedeira" e "célula hospedeira recombinante" são usados alternadamente aqui. É entendido que tais termos não só referem-se à célula em questão particular mas também à progênie ou pro-
15 gênie potencial de uma tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido à mutação ou influências ambientais, tal progênie não pode, de fato, ser idêntico à célula-pai, mas ainda é incluída dentro do escopo do termo como aqui usado.

20 CRESCIMENTO DE MEIOS DE *C. Glutamicum* E CONDIÇÕES DE CULTURA

Um ensinamento pedagógico geral e dado abaixo sobre o cultivo de *C. glutamicum*. Adaptações serão óbvias à pessoa versada cuja informação correspondente pode ser recuperada de livros de ensino padroes para cultivo de *E. coli*.

25 Corineibactérias geneticamente modificadas são tipicamente cultivadas em meios de crescimento sintéticos ou naturais. Vários meios de crescimento diferentes para corineibactérias são bem-conhecidos e facilmente disponíveis (Lieb et al. (1989) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 205-210; von der Osten et al. (1998) *Biotechnology Letters*, 11: 11-16; Patente
30 DE 4.120.867; Liebl(1992) "The Genus Corynebacterium, in: The Procaryotes, Volume II, Balows, A., et al., eds. Springer-Verlag).

Estes meios consistem em uma ou mais fontes de carbono, fon-

tes de nitrogênio, sais inorgânicos, vitaminas e elementos de traço. Fontes de carbono preferidas são açúcares, tais como mono, di, ou polissacarídeos. Por exemplo, glicose, frutose, manose, galactose, ribose, sorbose, ribose, lactose, maltose, sucrose, rafinose, amido ou celulose servindo como fontes de carbono muito boas.

É também possível prover açúcar aos meios por meio de compostos complexos tais como melado ou outros subprodutos de refinamento do açúcar. Pode ser também vantajoso prover misturas de fontes de carbono diferentes. Outras possíveis fontes de carbono são álcoois e ácidos orgânicos, tais como metanol, etanol, ácido acético ou ácido láctico. Fontes de nitrogênio são compostos de nitrogênio usualmente orgânicos ou inorgânicos, ou materiais contendo estes compostos. Fontes de nitrogênio exemplares incluem gás de amônia ou sais de amônia, tais como NH_4Cl ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , nitrato, uréia, aminoácidos ou fontes de nitrogênio complexas como licor de maceração de milho, farinha de feijão de soja, proteína de feijão de soja, extrato de levedura, extrato de carne e similares.

Compostos de sais inorgânicos que podem ser incluídos nos meios incluem os sais de cloreto, fósforo ou sulfato de cálcio, magnésio, sódio, cobalto, molibdênio, potássio, manganês, zinco, cobre e ferro. Compostos quelantes podem ser acrescentados ao meio para manter os íons de metal na solução. Compostos quelantes particularmente úteis incluem dihidroxifenóis, como catecol ou protocatechuato, ou ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico. É típico para os meios também conterem outros fatores de crescimento, tais como vitaminas ou promotores de crescimento, exemplos destes incluem biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato e piridoxina. Fatores de crescimento e sais frequentemente originam-se de componentes de meios complexos tais como extrato de levedura, melado, licor de maceração de milho e similares. A composição exata dos compostos de meios depende fortemente do experimento imediato e é decidida individualmente para cada caso específico. Informação acerca da otimização dos meios está disponível no livro de ensino "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach (Eds. P. M. Rhodes, P. F. Stanbury, IRL

Press (1997) págs. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). É também possível selecionar meios de crescimento de fornecedores comerciais, como padrão 1 (Merck) ou BHI (infusão de cérebro-coração, DIFCO) ou outros.

5 Todos os componentes dos meios deveriam ser esterilizados, ou através de calor (20 minutos a 0,15 mPa (1,5 bar) e 121°C) ou através de filtração estéril. Os componentes podem ser esterilizados juntos ou, se necessário, separadamente.

10 Todos os componentes dos meios podem estar presentes no começo de crescimento, ou eles podem ser opcionalmente adicionados continuamente ou em modo de batelada. Condições de cultura são separadamente definidas para cada experimento.

15 A temperatura deveria ser em uma faixa entre 15°C e 45°C. A temperatura pode ser mantida constante ou pode ser alterada durante o experimento. O pH do meio pode ser na faixa de 5 a 8,5, preferivelmente ao redor de 7,0, e pode ser mantido pela adição de tampões aos meios. Um tampão exemplar para este propósito é um tampão de fosfato de potássio. Tampões sintéticos tais como MOPS, HEPES, ACES e similares podem ser alternativa ou simultaneamente usados. É também possível manter um pH de cultura constante através da adição de NaOH ou NH₄OH durante o crescimento. Se os componentes complexos do meio forem utilizados tais como extrato de levedura, a necessidade de tampões adicionais pode ser reduzi-
20 da, devido ao fato que muitos compostos complexos têm capacidades de tamponamento altas. Se um fermentador for utilizado para cultivar os micro-organismos, o pH pode ser também controlado usando amônia gasosa.

25 O tempo de incubação usualmente é em uma faixa de várias horas a vários dias. Este tempo é selecionado para permitir a quantidade máxima de produto acumular-se no caldo. Os experimentos de crescimento descritos podem ser realizados em uma variedade de vasos, tais como placas de microtitulação, tubos de vidro, frascos de vidro ou vidro ou fermento-
30 res de metal de tamanhos diferentes. Para triar um número grande de clones, os micro-organismos deveriam ser cultivados em placas de microtitulação, tubos de vidro ou frascos agitados, ou com ou sem septos. Preferivel-

mente frascos agitados de 100 ml ou 250 ml são usados, enchidos com 10% (em volume) do meio de crescimento requerido. Os frascos deveriam ser agitados em um agitador rotativo (amplitude 25 mm) usando uma faixa de velocidade de 100 a 300 rpm. Perdas de evaporação podem ser diminuídas
 5 pela manutenção de uma atmosfera úmida; alternativamente, uma correção matemática para perdas de evaporação deveria ser executada.

Se clones geneticamente modificados forem testados, um clone de controle inalterado ou um clone de controle contendo o plasmídeo básico sem qualquer inserção deve ser também testado. O meio é inoculado a uma
 10 OD600 de 0,5 a 1,5 usando células crescidas em placas de ágar, tais como placas CM (10 g/l glicose, 2,5 g/l NaCl, 2 g/l uréia, 10 g/l polipeptona, 5 g/l extrato de levedura, 5 g/l extrato de carne, 2 g/l uréia, 10 g/l polipeptona, 5 g/l extrato de levedura, 5 g/l extrato de carne, 22 g/l ágar, pH 6,8 com NaOH a 2M) que tinham sido incubadas a 30°C. Inoculação dos meios é realizada
 15 por qualquer introdução de uma suspensão de solução salina das células de *C. glutamicum* das placas CM ou adição de uma pré-cultura líquida desta bactéria. Outros métodos de incubação podem ser tirados de WO2007012078.

MÉTODOS GERAIS

20 Protocolos para métodos gerais podem ser encontrados em Handbook on Corynebacterium glutamicum, (2005) eds.: L. Eggeling, M. Bott., Boca Raton, CRC Press, em Martin et al. (*Biotechnology* (1987) 5, 137-146), Guerrero et al. (*Gene* (1994), 138, 35-41), Tsuchiya e Morinaga (*Biotechnology* (1988), 6, 428-430), Eikmanns et al. (*Gene* (1991), 102, 93-
 25 98), EP 0 472 869, US 4,601,893, Schwarzer e Pühler (*Biotechnology* (1991), 9, 84-87, Reinscheid et al. (*Applied and Environmental Microbiology* (1994), 60,126-132), LaBarre et al. (*Journal of Bacteriology* (1993), 175, 1001-1007), WO 96/15246, Malumbres et al. (*Gene* (1993), 134, 15-24), em JP-A-10-229891, em Jensen e Hammer (*Biotechnology and Bioengineering*
 30 (1998), 58,191-195), Makrides (*Microbiological Reviews* (1996), 60, 512-538) em WO2006069711, em WO2007012078 e nos livros de ensino bem-conhecidos de biologia genética e molecular.

CEPAS, MEIOS E PLASMÍDEOS

Cepas podem ser tiradas, por exemplo da lista a seguir:

- ATCC 13032 de *Corynebacterium glutamicum*,
 ATCC 15806 de *Corynebacterium acetoglutamicum*,
 5 ATCC 13870 de *Corynebacterium acetoacidophilum*,
 FERM BP-1539 de *Corynebacterium thermoaminogenes*,
 ATCC 17965 de *Corynebacterium melassecola*,
 ATCC 14067 de *Brevibacterium flavum*,
 ATCC 13869 de *Brevibacterium lactofermentum*, e
 10 ATCC 14020 de *Brevibacterium divaricatum* ou cepas que foram derivadas das mesmas tais como KFCC10065, DSM 17322 ambas de *Corynebacterium glutamicum*, ou ATCC21608 de *Corynebacterium glutamicum*.

TECNOLOGIA DE DNA RECOMBINANTE

Protocolos podem ser encontrados em: Sambrook, J., Fritsch, E.

- 15 F., e Maniatis, T., em Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edição (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3, e Handbook on *Corynebacterium glutamicum* (2005) eds. L. Eggeling, M. Bott., Boca Raton, CRC Press.

QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E INTERMEDIÁRIOS DE METIONINA.

20

A análise é feita por HPLC (Agilent 1100, Agilent, Waldbronn, Alemanha) com um cartucho de guarda e uma coluna de Synergi 4 µm (MAX-RP 80 Å, 150 * 4,6 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg, Alemanha). Antes da injeção os analitos são derivatizados usando o-ftaldialdeído (OPA) e mercaptoetanol como agente redutor (2-MCE). Adicionalmente grupos sulfidríla são bloqueados com ácido iodoacético. A separação é realizada a uma taxa de fluxo de 1 ml/min usando NaH₂PO₄ a 40 mM (eluente A, pH = 7,8, ajustado com NaOH) como polar e uma mistura de água e metanol (100 / 1) como fase não-polar (eluente B). O gradiente a seguir é aplicado: começo 0% B; 39 min 39% B; 70 min 64% B; 100% B por 3,5 min; 2 min 0% B
 25 e mercaptoetanol como agente redutor (2-MCE). Adicionalmente grupos sulfidríla são bloqueados com ácido iodoacético. A separação é realizada a uma taxa de fluxo de 1 ml/min usando NaH₂PO₄ a 40 mM (eluente A, pH = 7,8, ajustado com NaOH) como polar e uma mistura de água e metanol (100 / 1) como fase não-polar (eluente B). O gradiente a seguir é aplicado: começo 0% B; 39 min 39% B; 70 min 64% B; 100% B por 3,5 min; 2 min 0% B
 30 para equilíbrio. A derivatização à temperatura ambiente é automatizada como descrita abaixo. Inicialmente 0,5 µl de 0,5% de 2-MCE em bicina (a 0,5

M, pH 8,5) é misturado com 0,5 µl de extrato de célula. Subsequentemente 1,5 µl de 50 mg/ml de ácido iodoacético em bicina (a 0,5 M, pH 8,5) é adicionado, seguido por adição de 2,5 µl de tampão de bicina (a 0,5 M, pH 8,5). A derivatização é feita adicionando 0,5 µl de 10 mg/ml de reagente de OPA dissolvido em 1/45/54 v/v/v de 2-MCE/MeOH/bicina (a 0,5 M, pH 8,5). Por fim a mistura é diluída com 32 µl de H₂O. Entre cada uma das etapas de pipetagem acima há um tempo de espera de 1 min. Um volume total de 37,5 µl é depois injetado sobre a coluna. Note que os resultados analíticos podem ser melhorados significativamente, se a agulha do classificador automática for limpa periodicamente durante (por exemplo, dentro de tempo de espera) e após a preparação de amostra. A detecção é executada por um detector de fluorescência (excitação de 340 nm, emissão 450 nm, Agilent, Waldbronn, Alemanha). Para quantificação de ácido aminobutírico (ABA) foi como padrão interno.

15 DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE RECOMBINAÇÃO

A seguir será descrito como uma cepa de *C. glutamicum* com eficiência aumentada de produção de metionina pode ser construída implementando as descobertas das predições acima. Antes da construção da cepa ser descrita, uma definição de um evento/protocolo de recombinação é dada que será usada a seguir.

"Campbell in", como aqui usado, refere-se a um transformante de uma célula hospedeira original em que uma molécula de DNA de fita dupla circular inteira (por exemplo, um plasmídeo sendo com base em pCLIK int sacB ou pK19 integrado em um cromossomo por um evento de recombinação homólogo simples (um evento *crossover*), e que efetivamente resulta na inserção de uma versão linearizada da dita molécula de DNA circular em uma primeira sequência de DNA do cromossomo que é homóloga a uma primeira sequência de DNA da dita molécula de DNA circular. "Campbell in" refere-se à sequência de DNA linearizada que foi integrada no cromossomo do transformante "Campbell in". Um "Campbell in" contém uma duplicação da primeira sequência de DNA homóloga, cada cópia desta inclui e circunda uma cópia do ponto *crossover* de recombinação homóloga. O nome

vem do Professor Alan Campbell que primeiro propôs este tipo de recombinação.

"Campbell out", como aqui usado, refere-se a uma célula que descende de um transformante "Campbell in" em que um segundo evento de recombinação homóloga (um evento *crossover*) ocorreu entre uma segunda sequência de DNA que é contida no DNA inserido linearizado do DNA "Campbelled in", e uma segunda sequência de DNA de origem cromossômica que é homóloga à segunda sequência de DNA da dita inserção linearizada, o segundo evento de recombinação resultando na deleção (retirada) de uma porção da sequência de DNA integrada, mas, importantemente, também resultando em uma porção (esta pode ser tão pequena quanto uma única base) do Campbelled integrado no DNA que permanece no cromossomo, de modo que comparado à célula hospedeira original, a célula "Campbell out" contém uma ou mais alterações intencionais no cromossomo (por exemplo, uma substituição de base simples, substituições de base múltiplas, inserção de um gene heterólogo ou sequência de DNA, inserção de uma cópia adicional ou cópias de um gene homólogo ou um gene homólogo modificado, ou inserção de uma sequência de DNA que compreende mais que um destes exemplos acima mencionados listados acima).

Uma célula ou cepa "Campbell out" é usualmente, mas não necessariamente, obtida por uma contrasseleção junto de um gene que é contido em uma porção (a porção sendo desejada ser retirada) da sequência de DNA "Campbelled in", por exemplo o gene *sacB* de *Bacillus subtilis* que é letal quando expresso em uma célula que é crescida na presença de cerca de 5% a 10% de sucrose. Ou com ou sem uma contrasseleção, uma célula "Campbell out" desejada pode ser obtida ou identificada tirando para a célula desejada, usando qualquer fenótipo tirável, tal como, mas não limitado a, morfologia de colônia, cor de colônia, presença ou ausência de resistência a antibiótico, presença ou ausência de uma sequência de DNA dada por reação em cadeia de polimerase, presença ou ausência de uma auxotrofia, presença ou ausência de uma enzima, hibridação de ácido nucleico de colônia, triagem de anticorpo, etc.. O termo "Campbell in" e "Campbell out" podem

ser também usados como verbos em vários tempos para referirem-se ao método ou processo descrito acima.

É entendido que os eventos de recombinação homóloga que levam a um "Campbell in" ou "Campbell out" podem ocorrer em uma faixa de bases de DNA dentro da sequência de DNA homóloga, e uma vez que as sequências homólogas são idênticas umas às outras pelo menos parte desta faixa, não é usualmente possível especificar exatamente onde o evento de *crossover* ocorreu. Em outras palavras, não é possível especificar precisamente que sequência foi originalmente do DNA inserido, e qual foi originalmente do DNA cromossômico. Além disso, a primeira sequência de DNA homóloga e a segunda sequência de DNA homóloga são usualmente separadas por uma região de não-homologia parcial, e é esta região de não-homologia que permanece depositada em um cromossomo da célula "Campbell out".

Para viabilidade, em *C. glutamicum*, as primeira e segunda sequências de DNA homólogas típicas de pelo menos cerca de 200 pares de base em comprimento, e pode ser até vários mil pares de base em comprimento, porém, desde que o procedimento possa ser feito para trabalhar com sequências mais curtas ou mais longas. Por exemplo, um comprimento para as primeira e segunda sequências homólogas pode variar de cerca de 500 a 2000 bases, e a obtenção de um "Campbell out" de um "Campbell in" é facilitada dispondo para as primeira e as segundas sequências homólogas ser cerca do mesmo comprimento, preferivelmente com uma diferença de menos de 200 pares de base e mais preferivelmente com o mais curto dos dois sendo pelo menos 70% do comprimento do mais longo em pares de base. Uma descrição do método de Campbell in e out pode ser tirada de WO2007012078.

EXEMPLOS

Os experimentos a seguir demonstram como a supraexpressão de transcetolase de *C. glutamicum* leva à produção de metionina aumentada. Estes exemplos não são intencionados de maneira alguma, porém, a limitar a invenção.

EXPERIMENTOS DE FRASCOS AGITADOS E ENSAIO DE HPLC

Experimentos de frascos agitados foram executados com o meio de melado padrão, com cepas em duplicata ou quadruplicata. Meio de melado continha em um litro de meio: 40 g de glicose; 60 g de melado; 20 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,4 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,6 g de KH_2PO_4 ; 10 g de extrato de levedura (DIFCO); 5 ml de treonina a 400 mM; 2 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; e 50 g de CaCO_3 (Riedel-de Haen), com o volume composto de ddH₂O. O pH foi ajustado para 7,8 com 20% de NH_4OH , 20 ml de meio continuamente agitado (para manter CaCO_3 suspenso) foi acrescentados a 250 ml de frascos agitados de Bellco com septos e os frascos foram submetidos à autoclave por 20 min. Subsequente à submissão em autoclave, 4 ml de "solução 4B" foram adicionados por litro do meio de base (ou 80 µl / frasco). A "solução 4B" continha por litro: 0,25 g de cloridrato de tiamina (vitamina B1), 50 mg de cianocobalamina (vitamina B12), 25 mg de biotina, 1,25 g de cloridrato de piridoxina (vitamina B6) e foi tamponada com KPO_4 a 12,5 mM, pH 7.0 para dissolver a biotina, e foi esterilizado em filtro. Culturas foram crescidas em frascos com septos cobertos com papel Bioshield presos por bandas de borracha durante 48 horas a 28°C ou 30°C e a 200 ou 300 rpm em um agitador de piso New Brunswick Scientific. As amostras foram tiradas em 24 horas e/ou 48 horas. As células foram removidas por centrifugação seguido por diluição do sobrenadante com um volume igual de 60% de acetonitrila e depois filtração de membrana da solução usando colunas de giro de 0,45 µm Centricon. Os filtrados foram ensaiados usando HPLC para as concentrações de metionina, glicina mais homoserina, O-acetil-homoserina, treonina, isoleucina, lisina, e outros aminoácidos indicados.

Para o ensaio de HPLC, sobrenadantes filtrados foram diluídos 1:100 com Na_2EDTA a 1 mM filtrado em 0,45 µm e 1 µl da solução foi derivatizado com reagente OPA (AGILENT) em tampão de Borato (NaBO_3 a 80 mM, EDTA a 2,5 mM, pH 10,2) e injetados sobre uma coluna de AA-ODS de 200 x 4,1 mm de 5 µm Hypersil operada em uma HPLC série Agilent 1100 equipada com um detector de fluorescência G1321A (AGILENT). O comprimento de onda de excitação foi 338 nm e o comprimento de onda de emis-

são monitorado foi 425 nm. Soluções padrão de aminoácido foram cromatografadas e usadas para determinar os tempos de retenção e áreas de pico padrão para os vários aminoácidos. Chem Station, o pacote de software associado fornecido por Agilent, foi usado para controle do instrumento, aquisição dos dados e manipulação dos dados. O hardware era um computador HP Pentium 4 que suporta Microsoft Windows NT 4.0 atualizado com um Microsoft Service Pack (SP6a).

EXPERIMENTO 1 - GERAÇÃO DA CEPA M2014

Cepa de ATCC 13032 de *C. glutamicum* foi transformado com DNA A (também referido como pH273) (SEQ ID NO: 24) e "Campbelled in" para render uma cepa "Campbell in". A cepa "Campbell in" foi depois "Campbelled out" para render uma cepa "Campbell out", M440 contendo um gene que codifica uma enzima de homosserina desidrogenase resistente à retroalimentação (*hom^{fbr}*). A proteína de homosserina desidrogenase resultante incluiu uma alteração de aminoácido onde S393 foi alterado para F393 (referido como Hsdh S393F).

A cepa M440 foi subsequentemente transformada com DNA B (também referido como pH373) (SEQ ID NO: 25) para render uma cepa "Campbell in". A cepa "Campbell in" é depois "Campbelled out" para render uma cepa "Campbell out", M603 contendo um gene que codifica uma enzima de aspartato cinase resistente à retroalimentação (*askfbr*) (codificada por *lysC*). Na proteína de aspartato cinase resultante, T311 foi alterado para I311 (referido como LysC T311I).

Foi descoberto que a cepa M603 produziu cerca de lisina a 17,4 mM, enquanto a cepa de ATCC13032 não produziu nenhuma quantidade mensurável de lisina. Adicionalmente, a cepa M603 produziu cerca de homosserina a 0,5 mM, comparado a nenhuma quantidade mensurável produzida pela cepa de ATCC13032, como sumarizado na Tabela 3.

Tabela 3: quantidades de homosserina, O-acetil-homosserina, metionina e lisina produzidas pelas cepas ATCC13032 e M603.

Cepa	Homosserina (mM)	O-acetil homosserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
ATCC13032	0,0	0,4	0,0	0,0
M603	0,5	0,7	0,0	17,4

A cepa M603 foi transformada com DNA C (também referido como pH304) (SEQ ID NO:26) para render uma cepa "Campbell in" que foi depois "Campbelled out" para render uma cepa "Campbell out", M690. A cepa M690 continha um promotor P_{groES} a montante do gene de *metH* (referido como *metH* de P497). A sequência do promotor de P497 é descrita na SEQ ID NO: 21. A cepa M690 produziu cerca de lisina a 77,2 mM e cerca de homosserina a 41,6 mM, como mostrado abaixo na Tabela 4.

10 Tabela 4: quantidades de homosserina, O-acetil homosserina, metionina e lisina produzidas pelas cepas M603 e M690.

Cepa	Homosserina (mM)	O-acetil homosserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M603	0,5	0,7	0,0	17,4
M690	41,6	0,0	0,0	77,2

A cepa M690 foi subsequentemente mutagenizada como segue: uma cultura durante a noite de M603, crescida em meio de BHI (BECTON DICKINSON), foi lavada em tampão de citrato a 50 mM, pH 5,5, tratada por 15 20 min a 30°C com N-metil-N-nitrosoguanidina (10 mg/ml em citrato a 50 mM, pH 5,5). Após tratamento, as células foram lavadas novamente em tampão de citrato a 50 mM, pH 5,5 e banhadas em um meio contendo os ingredientes a seguir: (todas as quantidades mencionados são calculadas para 500 ml de meio) 10 g de $(NH_4)_2SO_4$; 0,5 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,125 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 21 g de MOBS; 50 mg de $CaCl_2$; 15 mg de ácido protocatechuico; 0,5 mg de biotina; 1 mg de tiamina; e 5 g/l de D,L-etionina (SIGMA CHEMICALS, CATÁLOGO #E5139), ajustado em pH 7,0 com KOH. Além disso o meio continha 0,5 ml de uma solução de metal de traço composto de: 10 g/l de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$; 0,1 g/l de 25 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,02 g/l de $CuSO_4$; e 0,002 g/l de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, todos dissolvi-

dos em HCl a 0,1 M. O meio final foi esterilizado através de filtração e ao meio, 40 ml de solução a 50% de glicose estéril (40 ml) e ágar estéril para uma concentração final de 1,5% foram adicionados. O meio contendo ágar final foi vertido nas placas de ágar e foi marcado como meio de etionina mínima. As cepas mutagenizadas foram esparramadas nas placas (etionina mínima) e incubadas durante de 3 a 7 dias a 30°C. Clones que cresceram no meio foram isolados e re-corridos no mesmo meio de etionina mínima. Vários clones foram selecionados para análise de produção de metionina.

Produção de metionina foi analisada como segue. Cepas foram crescidas em meio de Cm-ágar durante dois dias a 30°C que continham: 10 g/l de D-glicose, 2,5 g/l de NaCl; 2 g/l de uréia; 10 g/l de Bacto Peptone (DIFCO); 5 g/l de Extrato de Levedura (DIFCO); 5 g/l de Extrato de carne de boi (DIFCO); 22 g/l de Ágar (DIFCO); e que foi submetido à autoclave por 20 min a cerca de 121°C.

Após as cepas estarem crescidas, as células foram raspadas e ressuspensas em NaCl a 0,15 M. Para a cultura principal, uma suspensão de células raspadas foi adicionada a uma OD de partida de 600 nm a cerca de 1,5 a 10 ml de Meio II (vide abaixo) junto com 0,5 g de CaCO₃ sólido e submetido à autoclave (RIEDEL DE HAEN) e as células foram incubadas em um frasco agitado de 100 ml sem septos por 72 h em uma plataforma agitadora orbital a cerca de 200 rpm a 30°C. Meio II continha: 40 g/l de sucrose; 60 g/l de açúcar total de melado (calculado para o conteúdo de açúcar); 10 g/l de (NH₄)₂SO₄; 0,4 g/l de MgSO₄*7H₂O; 0,6 g/l de KH₂PO₄; 0,3 mg/l de tiamina*HCl; 1 mg/l de biotina; 2 mg/l de FeSO₄; e 2 mg/l de MnSO₄. O meio foi ajustado para pH 7,8 com NH₄OH e submetido à autoclave a cerca de 121°C durante cerca de 20 min). Após submissão à autoclave e esfriamento, vitamina B12 (cianocobalamina) (SIGMA CHEMICALS) foi adicionada de uma solução de matéria-prima estéril em filtro (200 µg/ml) para uma concentração final de 100 µg/l.

As amostras foram tiradas do meio e ensaiadas para conteúdo de aminoácido. Aminoácidos produzidos, incluindo metionina, foram determinados usando o método de aminoácido Agilent em um Sistema de HPLC

Agilent 1100 Série LC. (AGILENT). Uma derivatização de pré-coluna da amostra com orto-ftalaldeído permitiu a quantificação dos aminoácidos produzidos após separação em uma coluna AA de Hypersil (AGILENT).

Clones que mostraram uma titulação de metionina que era pelo menos duas vezes que em M690 foram isolados. Um tal clone, usado em outros experimentos, foi nomeado M1197 e foi depositado no dia 18 de maio de 2005, na coletânea de cepa de DSMZ como número de cepa DSM 17322. Produção de aminoácido por esta cepa foi comparada à pela cepa M690, como sumarizado abaixo na Tabela 5.

10 Tabela 5: quantidades de homosserina, O-acetil-homosserina, metionina e lisina produzidas pelas cepas M690 e M1197.

Cepa	Homosserina (mM)	O-acetil-homosserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M690	41,6	0,0	0,0	77,2
M1179	26,4	1,9	0,7	79,2

A cepa M1197 foi transformada com DNA F (também referido como pH399, SEQ ID NO: 27) para render uma cepa "Campbell in" que foi subsequentemente "Campbelled out" para render a cepa M1494. Esta cepa contém uma mutação no gene para a homosserina cinase que resulta em uma alteração de aminoácido na enzima de homosserina cinase resultante de T190 para A190 (referido como HskT190A). Produção de aminoácido pela cepa M1494 foi comparada à produção pela cepa M1197, como sumarizado abaixo na Tabela 6.

20 Tabela 6: quantidades de homosserina, O-acetil-homosserina, metionina e lisina produzidas pelas cepas M1197 e M1494.

Cepa	Homosserina (mM)	O-acetil-homosserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M1197	26,4	1,9	0,7	79,2
M1494	18,3	0,2	2,5	50,1

A cepa M1494 foi transformada com DNA D (também referida como pH484, SEQ ID NO:28) para render uma cepa "Campbell in" que foi subsequentemente "Campbelled out" para render a cepa M1990. A cepa

M1990 supraexpressa um alelo de *metY* usando um promotor *groES* e um promotor EFTU (Tu) de fator de alongamento (referido como *metY* de P₄₉₇P₁₂₈₄). A sequência do promotor de P₄₉₇P₁₂₈₄ é exposta na SEQ ID NO: 29. A produção de aminoácido pela cepa M1494 foi comparada à produção pela cepa M1990, como sumarizado abaixo na Tabela 7.

Tabela 7: quantidades de homosserina, O-acetil-homosserina, metionina e lisina produzidas pelas cepas M1494 e M1990.

Cepa	Homosserina (mM)	O-acetil-homosserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M1494	18,3	0,2	2,5	50,1
M1990	18,2	0,3	5,6	48,9

A cepa M1990 foi transformada com DNA E (também referido como pH 491, SEQ ID NO: 30) para render uma cepa "Campbell in" que foi depois "Campbelled out" para render uma cepa "Campbell out" M2014. A cepa M2014 supraexpressa um alelo de *metA* usando um promotor de superóxido dismutase (referido como *metA* de P₃₁₁₉). A sequência do promotor de P₃₁₁₉ é exposta na SEQ ID NO: 20. Produção de aminoácido pela cepa M2014 foi comparada à produção pela cepa M1990, como sumarizado abaixo na Tabela 8.

Tabela 8: quantidades de homosserina, O-acetil-homosserina, metionina e lisina produzidas pelas cepas M1494 e M1990.

Cepa	Homosserina (mM)	O-acetil-homosserina (mM)	Metionina (mM)	Lisina (mM)
M1990	18,2	0,3	5,6	48,9
M2014	12,3	1,2	5,7	49,2

EXPERIMENTO 2 - DELEÇÃO DE *mcbR* DE M2014

Plasmídeo PH429 contendo uma deleção de RXA00655, (SEQ ID No. 31) foi usado para introduzir a deleção de *mcbR* em *C. glutamicum* por meio de integração e excisão (vide WO 2004/050694 A1).

Plasmídeo PH429 foi transformado na cepa M2014 com seleção para resistência à canamicina (Campbell in). Usando contrasseleção de *sacB*, os derivados sensíveis à canamicina da cepa transformada foram isolados que presumivelmente tinham perdido o plasmídeo integrado através de

excisão (Campbell out). A cepa transformada produziu derivados sensíveis à canamicina que fizeram colônias pequenas e colônias maiores. Colônias de ambos os tamanhos foram tiradas por PCR para detectar a presença de deleção de *mcbR*. Nenhuma das colônias maiores continha a deleção, enquanto que de 60 a 70% das colônias menores continham a deleção de *mcbR* esperada.

Quando um isolado original foi corrido para colônias simples em placas de BHI, uma mistura de colônias minúsculas e pequenas apareceu. Quando as colônias minúsculas foram recorridas em BHI, mais uma vez uma mistura de colônias minúsculas e pequenas apareceu. Quando as colônias pequenas foram recorridas em BHI, o tamanho da colônia foi usualmente pequeno e uniforme. Os dois isolados de colônia simples pequena, chamados OM403-4 e OM403-8, foram selecionados para outro estudo.

Experimentos com frasco agitado (Tabela 9) mostraram que OM403-8 produziu pelo menos duas vezes a quantidade de metionina que M2014-pai. Esta cepa também produziu menos que um quinto da quantidade de lisina que M2014, sugerindo uma diversão do fluxo de carbono de semi-aldeído de aspartato para homoserina. Uma terceira diferença notável foi um aumento maior que 10 vezes na acumulação de isoleucina por OM403 com relação a M2014. Culturas foram crescidas durante 48 horas em meio de melado padrão.

Tabela 9: produção de aminoácido por isolados da cepa de OM403 em culturas de frasco agitado inoculadas com células recentemente crescidas

Cepa	Tamanho da colônia	Deleção $\Delta mcbR$	Met (g/l)	Lys (g/l)	Hse+Gly (g/l)	Ile (g/l)
M2014	Grande	nenhuma	0,2	2,4	0,3	0,04
			0,2	2,5	0,3	0,03
			0,2	2,4	0,3	0,03
			0,4	3,1	0,4	0,03
OM403-8	Pequena	$\Delta RXA0655$	1,0	0,3	0,8	0,8
			1,0	0,3	0,8	0,8
			0,9	0,3	0,8	0,8
			1,0	0,3	0,8	0,6

Também como mostrado na Tabela 10, houve uma diminuição

- maior que 15 vezes na acumulação de O-acetil-homosserina por OM403 com relação a M2014. A explanação mais provável para este resultado é que a maioria da O-acetil-homosserina que acumula em M2014 está sendo convertida para metionina, homocisteína, e isoleucina em OM403. Culturas foram crescidas durante 48 horas em meio de melado padrão.

Tabela 10: produção de aminoácido por dois isolados de OM403 em culturas de frasco agitado inoculadas com células recentemente crescidas.

Cepa	Deleção $\Delta mcbR$	Met (g/l)	OAc-Hse (g/l)	Ile (g/l)
M2014	Nenhuma	0,4	3,4	0,1
		0,4	3,2	0,1
OM403-4	$\Delta RXA0655$	1,7	0,2	0,3
		1,5	0,1	0,3
OM403-8	$\Delta RXA0655$	2,2	<0,05	0,6
		2,5	<0,05	0,6

EXPERIMENTO 3 - DIMINUINDO EXPRESSÃO DE *metQ*

- Para diminuir a importação de metionina em OM403-8, o promotor e porção 5' do gene *metQ* foram deletados. O gene *metQ* codifica uma subunidade de um complexo de importação de metionina que é requerido para o complexo funcionar. Isto foi realizado usando a técnica padrão de Campbelling in e Campbelling out com plasmídeo pH449 (SEQ ID NO: 32). OM403-8 e OM456-2 foram ensaiados para produção de metionina em ensaios de frasco agitado. Os resultados (Tabela 11) mostram que OM456-2 produziu mais metionina que OM403-8. Culturas foram crescidas durante 48 horas em meio de melado padrão.

Tabela 11: ensaios em frasco agitado de OM456-2

Cepa	vetor	[Met] (g/l)	[Lys] (g/l)	[Gly/Hse] (g/l)	[OAcHS] (g/l)	[Ile] (g/l)
OM403-8	nenhum	4,0	0,8	2,2	0,4	1,9
		3,9	0,6	2,2	0,4	1,9
OM456-2	nenhum	4,2	0,4	2,3	0,4	2,3
		4,3	0,5	2,4	0,4	2,3

EXPERIMENTO 4 - CONSTRUÇÃO DE OM469

Uma cepa referida como OM469 foi construída que incluiu tanto deleção de *metQ* como supraexpressão de *metF* substituindo o promotor de *metF* com o promotor de P_R lambda de fago em OM456-2. Isto foi realizado usando a técnica padrão de Campbelling in e Campbelling out com plasmídeo pOM427 (SEQ ID NO 33). Quatro isolados de OM469 foram ensaiados para produção de metionina em ensaios de cultura com frasco agitado onde todos eles produziram mais metionina que OM456-2, como mostrado na Tabela 12. Culturas foram crescidas durante 48 horas em meio de melado padrão contendo treonina a 2 mM.

Tabela 12: ensaios em frasco agitado de OM469, um derivado de OM456-2 contendo o promotor de P_R lambda de fago no lugar do promotor de *metF*.

Cepa	promotor de <i>metF</i>	MetQ	[Met] (g/l)	[Lys] (g/l)	[Gly/Hs e] (g/l)	[OAcHS] (g/l)	[Ile] (g/l)
OM428-2	λ_{PR}	nativo	4,5	0,5	2,6	0,4	2,6
			4,6	0,4	2,6	0,3	2,5
OM456-2	Nativo	$\Delta metQ$	4,2	0,4	2,4	0,3	2,5
			4,2	0,5	2,4	0,3	2,5
OM469-1	λ_{PR}	$\Delta metQ$	5,0	0,5	2,7	0,4	3,1
-2			4,9	0,5	2,7	0,4	2,8
-3			4,8	0,4	2,6	0,4	2,7
-4			4,7	0,5	2,6	0,4	2,8

EXPERIMENTO 5 - CONSTRUÇÃO DE M2543

A cepa OM469-2 foi transformada através de eletroporação com o plasmídeo pCLIK5A int sacB PSD TKT como descrito na SEQ ID NO. 34 (figura 1a)). Isto foi realizado usando a técnica padrão de Campbelling in e Campbelling out.

Isolados de OM 469 PSOD TKT que eram M2543 marcada foram ensaiados para produção de metionina em ensaios de cultura com frasco agitado onde eles produziram mais metionina que OM469-2. Os resulta-

dos da cepa M2543 são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. ensaios com frasco agitado de OM469 e M2543

Cepa	plas- mí- deo	genes Met no plasmí- deo	[Met] (mM)	[Lys] (mM)	[Gly] (mM)	[Hse] (mM)	[AHs] (mM)	[Ile] (mM)
OM469-2		Nenhum	14	3,4	16	1,7	0,3	11,8
M2543 #		Nenhum	20,4	1,9	21,8	0,8	<0,1	12,4

EXPERIMENTO 6 - CONSTRUÇÃO DE CEPAS CONTENDO UM PROMO- TOR E / OU MUTAÇÕES NA 6-FOSFOGLUCONATO DESIDROGENASE

- 5 A cepa OM469-2 ou M2543 foi transformada por eletroporação com o plasmídeo pCLIK5A PSODH661 PSOD6PGDH como descrito na SEQ ID No. 35 (figura 1b). Isto foi realizado usando a técnica padrão de Campbel-
ling in e Campbelling out. As cepas resultantes continham apenas o promo-
tor P_{SOD} ou o promotor juntamente com uma ou duas mutações como descri-
10 tas na tabela 14.

Isolados de M2543 PSOD 6PGDH que são GK 1508, 1511 e GK1513 marcados foram ensaiados para produção de metionina em ensaios de cultura com frasco agitado onde eles produziram mais metionina que M2543. Os resultados são mostrados na Tabela 14.

- 15 Tabela 14. ensaios com frasco agitado de OM469 e M2543

Cepa	Promotor introduzido	Mutação	[Met] (mM)
M2543	Nenhum	Nenhum	21,6
GK1508	P _{SOD}	P150S, S353F	24,6
GK1511	P _{SOD}	Nenhum	24,7
GK1513	P _{SOD}	P150S	25,9

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

	<110>	BASF Aktiengesellschaft	
	<120>	BASF Aktiengesellschaft	
	<130>	B 8571 / DB	
5	<150>	EP 07 102 257.9	
	<151>	19.02.2007	
	<160>	35	
	<170>	PatentIn versão 3.3	
	<210>	1	
10	<211>	1545	
	<212>	DNA	
	<213>	Corynebacterium glutamicum	
	<220>		
	<221>	sequência de ácido nucléico	
15	<222>	(1) .. (1545)	
	<223>	glucose-6-fosfato-desidrogenase	
	<400>	1	
	gtgagcaciaa acacgacccc ctccagctgg acaaaccacac tgcgcgaccc gcaggataaa	60	
	cgactccccc gcatcgctgg cocttcgggc atggtgatct tcggtgtcac tggcgacttg	120	
20	gctcgaaaga agctgctccc cgccatttat gatctagcaa accgcggatt gctgccccca	180	
	ggattctcgt tggtaggtta cggccgcgcg gaattggtcca aagaagactt tgaaaaatac	240	
	gtacgcgatg ccgcaagtgc tgggtgctcgt acggaattcc gtgaaaatgt ttgggagcgc	300	
	ctcgccgagg gtatggaatt tggttcgggc aactttgatg atgatgcagc tttcgacaac	360	
	ctcgctgcaa cactcaagcg catcgacaaa acccgcgga cgcgcggcaa ctgggcttac	420	
25	tacctgtcca ttccaccaga ttccttcaca gcggtctgcc accagctgga gcgttcgggc	480	
	atggctgaat ccaccgaaga agcatggcgc cgcgtgatca tcgagaagcc tttcggccac	540	
	aacctcgaat ccgcacacga gctcaaccag ctgggtcaacg cagtcttccc agaattctct	600	
	gtgttccgca tcgaccacta tttgggcaag gaaacagttc aaaacatcct ggctctgcgt	660	
	tttgctaacc agctgtttga gccactgtgg aactccaact acgttgacca cgtccagatc	720	
30	accatggctg aagatattgg cttgggtgga cgtgctggtt actacgacgg catcggcgca	780	
	gcccgcgacg tcatccagaa ccacctgatc cagctcttgg ctctggttgc catggaagaa	840	
	ccaatttctt tcgtgccagc gcagctgcag gcagaaaaga tcaaggtgct ctctgcgaca	900	

	aagccgtgct acccattgga taaaacctcc gctcgtggtc agtacgctgc cggttggcag	960
	ggctctgagt tagtcaaggg acttcgcgaa gaagatggct tcaacctga gtccaccact	1020
	gagacttttg cggcttgtag cttagagatc acgtctcgtc gctgggctgg tgtgccgttc	1080
	tacctgcgca ccggttaagcg tcttggtcgc cgtgttactg agattgccgt ggtgtttaaa	1140
5	gacgcaccac accagccttt cgacggcgac atgactgtat cccttggcca aaacgccatc	1200
	gtgattcgcg tgcagcctga tgaaggtgtg ctcacccgct tcggttccaa ggttccaggt	1260
	tctgccatgg aagtccgtga cgtcaacatg gacttctcct actcagaatc cttcactgaa	1320
	gaatcacctg aagcatatga gcgcctcatt ttggatgcgc tgtagatga atccagcctc	1380
	ttccctacca acgaggaagt ggaactgagc tggaagattc tggatccaat tcttgaagca	1440
10	tgggatgccg atggagaacc agaggattac ccagcgggta cgtgggggtcc aaagagcgct	1500
	gatgaaatgc tttcccgcaa cggtcacacc tggcgcaggc cataa	1545
	<210> 2	
	<211> 514	
	<212> PRT	
15	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<220>	
	<221> sequência de aminoácido	
	<222> (1)..(514)	
	<223> glucose-6-fosfato-desidrogenase	
20	<400> 2	
	Met Ser Thr Asn Thr Thr Pro Ser Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp	
	1 5 10 15	
	Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val	
	20 25 30	
25	Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu Pro Ala	
	35 40 45	
	Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe Ser Leu	
	50 55 60	
	Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu Lys Tyr	
30	65 70 75 80	
	Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg Glu Asn	
	85 90 95	

Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly Asn Phe
 100 105 110
 Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys Arg Ile
 115 120 125
 5 Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu Ser Ile
 130 135 140
 Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
 10 165 170 175
 Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
 180 185 190
 Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
 195 200 205
 15 Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
 210 215 220
 Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
 225 230 235 240
 Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
 20 245 250 255
 Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
 260 265 270
 Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln
 275 280 285
 25 Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
 290 295 300
 Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
 305 310 315 320
 Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro
 30 325 330 335
 Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser
 340 345 350

Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu
 355 360 365
 Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His
 370 375 380
5 Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile
 385 390 395 400
 Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser
 405 410 415
 Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe
10 420 425 430
 Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg
 435 440 445
 Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn
 450 455 460
15 Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
 465 470 475 480
 Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly
 485 490 495
 Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg
20 500 505 510
 Arg Pro
 <210> 3
 <211> 708
 <212> DNA
25 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> sequência de ácido nucléico
 <222> (1)..(708)
 <223> 6-fosfogluconolactonase
30 <400> 3
 atggttgatg tagtacgcgc acgcgatact gaagatttgg ttgcacaggc tgcctccaaa 60
 ttcataggagg ttgttgaagc agcaactgcc aataatggca ccgcacagggt agtgctcacc 120

ggtggtggcg ccggcatcaa gttgctggaa aagctcagcg ttgatgcggc tgaccttgcc 180
 tgggatcgca ttcatgtgtt cttcggcgat gagcgcaatg tccctgtcag tgattctgag 240
 tccaatgagg gccaggctcg tgaggcactg ttgtccaagg tttctatccc tgaagccaac 300
 attcacggat atggtctcgg cgacgtagat cttgcagagg cagcccgcgc ttacgaagct 360
5 gtgttgatg aattcgcacc aaacggcttt gatcttcacc tgctcggcat ggggtggcgaa 420
 ggccatatca actccctggt ccctcacacc gatgcagtca aggaatcctc cgcaaaggtc 480
 atcgcggtgt ttgattcccc taagcctcct tcagagcgtg caactctaac ctttcctgcg 540
 gttcactccg caaagcgcggt gtggttgctg gtttctggtg cggagaaggc tgaggcagct 600
 gcggcgatcg tcaacggtga gcctgctggt gagtggcctg ctgctggagc taccggatct 660
10 gaggaacgg tattgttctt ggctgatgat gctgcaggaa atctctaa 708
 <210> 4
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
15 <220>
 <221> sequência de aminoácido
 <222> (1)..(235)
 <223> 6-fosfogluconolactonase
 <400> 4
20 Met Val Asp Val Val Arg Ala Arg Asp Thr Glu Asp Leu Val Ala Gln
 1 5 10 15
 Ala Ala Ser Lys Phe Ile Glu Val Val Glu Ala Ala Thr Ala Asn Asn
 20 25 30
 Gly Thr Ala Gln Val Val Leu Thr Gly Gly Gly Ala Gly Ile Lys Leu
25 35 40 45
 Leu Glu Lys Leu Ser Val Asp Ala Ala Asp Leu Ala Trp Asp Arg Ile
 50 55 60
 His Val Phe Phe Gly Asp Glu Arg Asn Val Pro Val Ser Asp Ser Glu
 65 70 75 80
30 Ser Asn Glu Gly Gln Ala Arg Glu Ala Leu Leu Ser Lys Val Ser Ile
 85 90 95
 Pro Glu Ala Asn Ile His Gly Tyr Gly Leu Gly Asp Val Asp Leu Ala

	100	105	110
	Glu Ala Ala Arg Ala Tyr Glu Ala Val Leu Asp Glu Phe Ala Pro Asn		
	115	120	125
	Gly Phe Asp Leu His Leu Leu Gly Met Gly Gly Glu Gly His Ile Asn		
5	130	135	140
	Ser Leu Phe Pro His Thr Asp Ala Val Lys Glu Ser Ser Ala Lys Val		
	145	150	155
	Ile Ala Val Phe Asp Ser Pro Lys Pro Pro Ser Glu Arg Ala Thr Leu		
	165	170	175
10	Thr Leu Pro Ala Val His Ser Ala Lys Arg Val Trp Leu Leu Val Ser		
	180	185	190
	Gly Ala Glu Lys Ala Glu Ala Ala Ala Ile Val Asn Gly Glu Pro		
	195	200	205
	Ala Val Glu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Thr Gly Ser Glu Glu Thr Val		
15	210	215	220
	Leu Phe Leu Ala Asp Asp Ala Ala Gly Asn Leu		
	225	230	235
	<210>	5	
	<211>	1455	
20	<212>	DNA	
	<213>	Corynebacterium glutamicum	
	<220>		
	<221>	sequência de ácido nucléico	
	<222>	(1)..(1455)	
25	<223>	6-fosfo-gluconato-desidrogenase	
	<400>	5	
	atgactaatg gagataatct cgcacagatc ggcgttgtag gcctagcagt aatgggctca	60	
	aacctcgccc gcaacttcgc ccgcaacggc aacctgtcg ctgtctacaa ccgcagcact	120	
	gacaaaaccg acaagctcat cgccgatcac ggctccgaag gcaacttcat cccttctgca	180	
30	accgtcgaag agttcgtagc atccctggaa aagccacgcc gcgccatcat catggttcag	240	
	gctggtaacg ccaccgacgc agtcatcaac cagctggcag atgccatgga cgaaggcgac	300	
	atcatcatcg acggcggcaa cgccctctac accgacacca ttcgtcgcca gaaggaaatc	360	

	tccgcacgcg gtctccactt cgtcgggtgct ggtatctccg gcggcgaaga aggcgcactc	420
	aacggcccat ccatcatgcc tgggtggcca gcaaagtcct acgagtcctt cggaccactg	480
	cttgagtcca tcgctgccaa cgttgacggc accccatgtg tcacccacat cggcccagac	540
	ggcgccggcc acttcgtcaa gatgggtccac aacggcatcg agtacgccga catgcaggtc	600
5	atcggcgagg cataccacct tctccgtac gcagcaggca tgcagccagc tgaaatcgct	660
	gaggttttca aggaatggaa cgcaggcgac ctggattcct acctcatcga aatcaccgca	720
	gaggtttctt cccagggtga tgctgaaacc ggcaagccac taatcgacgt catcgttgac	780
	gctgcaggtc agaagggcac cggacgttg accgtcaagg ctgctcttga tctgggtatt	840
	gctaccaccg gcatcgccga agctgttttc gcacgtgcac tctccggcgc aaccagccag	900
10	cgcgctgcag cacagggcaa cctacctgca ggtgtcctca ccgatctgga agcacttggc	960
	gtggacaagg cacagtctgt cgaagacgtt cgccgtgcac tgtacgcata caagcttggt	1020
	gcttacgcac agggcttcga cgagatcaag gctgggtccg acgagaacaa ctgggacgtt	1080
	gacctcgcg acctcgctac catctggcgc ggcggtgca tcattcgcg taagtctctc	1140
	aaccgcatcg tcgaagcata cgatgcaaac gctgaacttg agtccctgct gctcgatcct	1200
15	tacttcaaga gcgagctcgg cgacctcata gattcatggc gtcgcgtgat tgtcaccgcc	1260
	accagccttg gcctgccaat cccagtgttc gcttcctccc tgtctacta cgacagcctg	1320
	cgtgcagagc gtctgccagc agccctgata caaggacagc gcgacttctt cgggtgcgcac	1380
	acctacaagc gcatcgacaa ggatggctcc ttccacaccg agtgggtccg cgaccgctcc	1440
	gaggttgaag cttaa	1455
20	<210> 6	
	<211> 484	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<220>	
25	<221> sequência de aminoácido	
	<222> (1)..(483)	
	<223> fosfo-gluconato-desidrogenase	
	<220>	
	<221> sequência de aminoácido	
30	<222> (1)..(484)	
	<223> fosfo-gluconato-desidrogenase	
	<400> 6	

Met Thr Asn Gly Asp Asn Leu Ala Gln Ile Gly Val Val Gly Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Met Gly Ser Asn Leu Ala Arg Asn Phe Ala Arg Asn Gly Asn Thr
 20 25 30
 5 Val Ala Val Tyr Asn Arg Ser Thr Asp Lys Thr Asp Lys Leu Ile Ala
 35 40 45
 Asp His Gly Ser Glu Gly Asn Phe Ile Pro Ser Ala Thr Val Glu Glu
 50 55 60
 Phe Val Ala Ser Leu Glu Lys Pro Arg Arg Ala Ile Ile Met Val Gln
 10 65 70 75 80
 Ala Gly Asn Ala Thr Asp Ala Val Ile Asn Gln Leu Ala Asp Ala Met
 85 90 95
 Asp Glu Gly Asp Ile Ile Ile Asp Gly Gly Asn Ala Leu Tyr Thr Asp
 100 105 110
 15 Thr Ile Arg Arg Glu Lys Glu Ile Ser Ala Arg Gly Leu His Phe Val
 115 120 125
 Gly Ala Gly Ile Ser Gly Gly Glu Glu Gly Ala Leu Asn Gly Pro Ser
 130 135 140
 Ile Met Pro Gly Gly Pro Ala Lys Ser Tyr Glu Ser Leu Gly Pro Leu
 20 145 150 155 160
 Leu Glu Ser Ile Ala Ala Asn Val Asp Gly Thr Pro Cys Val Thr His
 165 170 175
 Ile Gly Pro Asp Gly Ala Gly His Phe Val Lys Met Val His Asn Gly
 180 185 190
 25 Ile Glu Tyr Ala Asp Met Gln Val Ile Gly Glu Ala Tyr His Leu Leu
 195 200 205
 Arg Tyr Ala Ala Gly Met Gln Pro Ala Glu Ile Ala Glu Val Phe Lys
 210 215 220
 Glu Trp Asn Ala Gly Asp Leu Asp Ser Tyr Leu Ile Glu Ile Thr Ala
 30 225 230 235 240
 Glu Val Leu Ser Gln Val Asp Ala Glu Thr Gly Lys Pro Leu Ile Asp
 245 250 255

Val Ile Val Asp Ala Ala Gly Gln Lys Gly Thr Gly Arg Trp Thr Val
 260 265 270
 Lys Ala Ala Leu Asp Leu Gly Ile Ala Thr Thr Gly Ile Gly Glu Ala
 275 280 285
5 Val Phe Ala Arg Ala Leu Ser Gly Ala Thr Ser Gln Arg Ala Ala Ala
 290 295 300
 Gln Gly Asn Leu Pro Ala Gly Val Leu Thr Asp Leu Glu Ala Leu Gly
 305 310 315 320
 Val Asp Lys Ala Gln Phe Val Glu Asp Val Arg Arg Ala Leu Tyr Ala
10 325 330 335
 Ser Lys Leu Val Ala Tyr Ala Gln Gly Phe Asp Glu Ile Lys Ala Gly
 340 345 350
 Ser Asp Glu Asn Asn Trp Asp Val Asp Pro Arg Asp Leu Ala Thr Ile
 355 360 365
15 Trp Arg Gly Gly Cys Ile Ile Arg Ala Lys Phe Leu Asn Arg Ile Val
 370 375 380
 Glu Ala Tyr Asp Ala Asn Ala Glu Leu Glu Ser Leu Leu Leu Asp Pro
 385 390 395 400
 Tyr Phe Lys Ser Glu Leu Gly Asp Leu Ile Asp Ser Trp Arg Arg Val
20 405 410 415
 Ile Val Thr Ala Thr Gln Leu Gly Leu Pro Ile Pro Val Phe Ala Ser
 420 425 430
 Ser Leu Ser Tyr Tyr Asp Ser Leu Arg Ala Glu Arg Leu Pro Ala Ala
 435 440 445
25 Leu Ile Gln Gly Gln Arg Asp Phe Phe Gly Ala His Thr Tyr Lys Arg
 450 455 460
 Ile Asp Lys Asp Gly Ser Phe His Thr Glu Trp Ser Gly Asp Arg Ser
 465 470 475 480
 Glu Val Glu Ala
30 <210> 7
 <211> 660
 <212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> sequência de ácido nucléico
 <222> (1)..(660)
 5 <223> ribulose-5-fosfato epimerase
 <400> 7
 atggcacaaac gtactccact aatcgcccca tccattcttg ctgctgattt ctcccgtta 60
 ggggagcagg tggtggctgt tcctgatgct gactggattc acgtcgacat catggacgga 120
 cacttcgttc caaacttgag ctttggcgcg gatatacacag ctgcggtcaa ccgcgttacg 180
 10 gacaaagaac tagacgtcca cctgatgacg gaaaaccag agaagtgggt ggacaactac 240
 atcgacgctg gcgcggactg cattgttttc cacgttgaag ccaccgaagg tcacgttgag 300
 ttggctaagt acatccgttc caaggggtgtg cgtgcaggtt tctccctgcg ccctggaact 360
 cccatcgagg attacttgga tgacctcgag cacttcgatg aagtcatcgt catgagcgtc 420
 gagcctggat tcggtggcca aagcttcacg cctgaacaac tggaaaaggt tcgtaccctg 480
 15 cgcaagggtca tcgatgagcg cggctctgaac accgtcatcg agatcgacgg cggcattagc 540
 gccaagacca tcaagcaggc tgccgacgct ggcgtggatg ccttcgttgc aggttccgct 600
 gtgtacggcg ctgaggatcc caacaaggcg atccaggagt tgcgagcact cgcgcagtaa 660
 <210> 8
 <211> 219
 20 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> sequência de aminoácido
 <222> (1)..(219)
 25 <223> ribulose-5-fosfato epimerase
 <400> 8
 Met Ala Gln Arg Thr Pro Leu Ile Ala Pro Ser Ile Leu Ala Ala Asp
 1 5 10 15
 Phe Ser Arg Leu Gly Glu Gln Val Leu Ala Val Pro Asp Ala Asp Trp
 30 20 25 30
 Ile His Val Asp Ile Met Asp Gly His Phe Val Pro Asn Leu Ser Phe
 35 40 45

Gly Ala Asp Ile Thr Ala Ala Val Asn Arg Val Thr Asp Lys Glu Leu
 50 55 60
 Asp Val His Leu Met Ile Glu Asn Pro Glu Lys Trp Val Asp Asn Tyr
 65 70 75 80
5 Ile Asp Ala Gly Ala Asp Cys Ile Val Phe His Val Glu Ala Thr Glu
 85 90 95
 Gly His Val Glu Leu Ala Lys Tyr Ile Arg Ser Lys Gly Val Arg Ala
 100 105 110
 Gly Phe Ser Leu Arg Pro Gly Thr Pro Ile Glu Asp Tyr Leu Asp Asp
10 115 120 125
 Leu Glu His Phe Asp Glu Val Ile Val Met Ser Val Glu Pro Gly Phe
 130 135 140
 Gly Gly Gln Ser Phe Met Pro Glu Gln Leu Glu Lys Val Arg Thr Leu
 145 150 155 160
15 Arg Lys Val Ile Asp Glu Arg Gly Leu Asn Thr Val Ile Glu Ile Asp
 165 170 175
 Gly Gly Ile Ser Ala Lys Thr Ile Lys Gln Ala Ala Asp Ala Gly Val
 180 185 190
 Asp Ala Phe Val Ala Gly Ser Ala Val Tyr Gly Ala Glu Asp Pro Asn
20 195 200 205
 Lys Ala Ile Gln Glu Leu Arg Ala Leu Ala Gln
 210 215
 <210> 9
 <211> 474
25 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <220>
 <221> sequência de ácido nucléico
 <222> (1)..(474)
30 <223> ribose-5-fosfato isomerase
 <400> 9
 atgcgcgtat accttggagc agaccacgct ggttttcgaaa ctaaaaaatgc aatcgcagaa 60

caccttaagg cccacggcca cgaagtgatc gactgaggag cccacaccta tgatgcagaa 120
 gatgactacc cagccttctg catcgaagca gctagccgca cagtaaacga cccaggctca 180
 ctcggcatcg tcctgggtgg atccggaaac ggcgagcaga tcgccgcaa caaggtcaag 240
 ggtgcacggt gtgcacttgc ttggtctggt gaaactgcac gcctcgcccg cgagcacaac 300
 5 aatgcgaacc tcacggcat cggcgccgc atgcactcag aggaagaggc attggcaatt 360
 gtcgacgcct tcctcgagca ggaatggagc aacgccgagc gccaccagcg tcgtatcgac 420
 atcctcgctg attacgagcg cactggaatc gcacctgtcg ttcctaacga ataa 474
 <210> 10
 <211> 157
 10 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> sequência de aminoácido
 <222> (1)..(157)
 15 <223> ribose-5-fosfato isomerase
 <400> 10
 Met Arg Val Tyr Leu Gly Ala Asp His Ala Gly Phe Glu Thr Lys Asn
 1 5 10 15
 Ala Ile Ala Glu His Leu Lys Ala His Gly His Glu Val Ile Asp Cys
 20 20 25 30
 Gly Ala His Thr Tyr Asp Ala Glu Asp Asp Tyr Pro Ala Phe Cys Ile
 35 40 45
 Glu Ala Ala Ser Arg Thr Val Asn Asp Pro Gly Ser Leu Gly Ile Val
 50 55 60
 25 Leu Gly Gly Ser Gly Asn Gly Glu Gln Ile Ala Ala Asn Lys Val Lys
 65 70 75 80
 Gly Ala Arg Cys Ala Leu Ala Trp Ser Val Glu Thr Ala Arg Leu Ala
 85 90 95
 Arg Glu His Asn Asn Ala Asn Leu Ile Gly Ile Gly Gly Arg Met His
 30 100 105 110
 Ser Glu Glu Glu Ala Leu Ala Ile Val Asp Ala Phe Leu Glu Gln Glu
 115 120 125

Trp Ser Asn Ala Glu Arg His Gln Arg Arg Ile Asp Ile Leu Ala Asp

130

135

140

Tyr Glu Arg Thr Gly Ile Ala Pro Val Val Pro Asn Glu

145

150

155

- 5** <210> 11
 <211> 2103
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <220>
10 <221> sequência de ácido nucléico
 <222> (1)..(2103)
 <223> transcetolase
 <400> 11

ttgaccacct tgacgctgtc acctgaactt caggcgctca ctgtacgcaa ttaccctct 60
15 gattggctccg atgtggacac caaggctgta gacactgttc gtgtcctcgc tgcagacgct 120
 gtagaaaact gtggctccgg ccaccaggc accgcaatga gcctggctcc cttgcatac 180
 acctgtacc agcgggttat gaacgtagat ccacaggaca ccaactgggc aggccgtgac 240
 cgcttcgttc tttcttgtgg ccaactcctct ttgaccagt acatccagct ttacttgggt 300
 ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca cctgggattc cttgacccca 360
20 ggacaccctg agtaccgcca caccaagggc gttgagatca ccaactggccc tcttgccag 420
 ggtcttgcac ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc gtgagcgtgg cctattcgac 480
 ccaaccgctg ctgagggcga atccccattc gaccaccaca tctacgtcat tgcttctgat 540
 ggtgacctgc aggaaggtgt cacctctgag gcatcctcca tcgctggcac ccagcagctg 600
 ggcaacctca tcgtgttctg ggatgacaac cgcactctcca tcgaagacaa cactgagatc 660
25 gctttcaacg aggacgttgt tgctcgttac aaggcttacg gctggcagac cattgaggtt 720
 gaggctggcg aggacgttgc agcaatcgaa gctgcagtgg ctgaggctaa gaaggacacc 780
 aagcgacctc cttcatccg cgcttcgacc atcatcggct tcccagctcc aactatgatg 840
 aacaccggtg ctgtgcacgg tgctgctctt ggcgagctg aggttgcagc aaccaagact 900
 gagcttggat tcgatcctga ggctcacttc gcgatcgacg atgaggttat cgctcacacc 960
30 cgctccctcg cagagcgcg tgacacagaag aaggctgcat ggcaggtcaa gttcgatgag 1020
 tgggcagctg ccaaccctga gaacaaggct ctgttcgatc gcctgaactc ccgtgagctt 1080
 ccagcgggct acgctgacga gctcccaaca tgggatgcag atgagaaggg cgctcgcaact 1140

	cgtaaggctt ccgaggctgc acttcaggca ctgggcaaga cccttcctga gctgtggggc	1200
	ggttccgctg acctcgcagg ttccaacaac accgtgatca agggctcccc ttccttcggc	1260
	cctgagtcca tctccaccga gacctggtct gctgagcctt acggccgtaa cctgcacttc	1320
	ggtatccgtg agcacgctat gggatccatc ctcaacggca tttccctcca cgggtggcacc	1380
5	cgcccatagc gcggaacctt cctcatcttc tccgactaca tgcgtcctgc agttcgtctt	1440
	gcagctctca tggagaccga cgcttactac gtctggaccc acgactccat cggctctgggc	1500
	gaagatggcc caaccaccca gcctgttgaa accttggctg cactgcgcgc catcccaggt	1560
	ctgtccgtcc tgcgtcctgc agatgcgaac gagaccgcc aggcttgggc tgcagcactt	1620
	gagtacaagg aaggccctaa gggctcttga ctgaccgcc agaacgttcc tgttctggaa	1680
10	ggcaccaagg agaaggctgc tgaaggcgtt cgccgcggtg gctacgtcct ggttgagggt	1740
	tccaaggaaa cccagatgt gatcctcatg ggctccggct ccgaggttca gcttgagtt	1800
	aacgctgcga aggctctgga agctgagggc gttgcagctc gcgttgtttc cgttccttgc	1860
	atggattggt tccaggagca ggacgcagag tacatcgagt ccgttctgcc tgcagctgtg	1920
	accgctcgtg tgtctgttga agctggcatc gcaatgcctt ggtaccgctt cttgggcacc	1980
15	cagggccgtg ctgtctccct tgagcacttc ggtgcttctg cggattacca gaccctgttt	2040
	gagaagttcg gcatcaccac cgatgcagtc gtggcagcgg ccaaggactc cattaacggt	2100
	taa	2103
	<210>	12
	<211>	700
20	<212>	PRT
	<213>	Corynebacterium glutamicum
	<220>	
	<221>	sequência de aminoácido
	<222>	(1)..(700)
25	<223>	transcetolase
	<400>	12
	Met Thr Thr Leu Thr Leu Ser Pro Glu Leu Gln Ala Leu Thr Val Arg	
	1 5 10 15	
	Asn Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Asp Val Asp Thr Lys Ala Val Asp Thr	
30	20 25 30	
	Val Arg Val Leu Ala Ala Asp Ala Val Glu Asn Cys Gly Ser Gly His	
	35 40 45	

Pro Gly Thr Ala Met Ser Leu Ala Pro Leu Ala Tyr Thr Leu Tyr Gln
 50 55 60
 Arg Val Met Asn Val Asp Pro Gln Asp Thr Asn Trp Ala Gly Arg Asp
 65 70 75 80
5 Arg Phe Val Leu Ser Cys Gly His Ser Ser Leu Thr Gln Tyr Ile Gln
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gly Gly Phe Gly Leu Glu Met Asp Asp Leu Lys Ala Leu
 100 105 110
 Arg Thr Trp Asp Ser Leu Thr Pro Gly His Pro Glu Tyr Arg His Thr
10 115 120 125
 Lys Gly Val Glu Ile Thr Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Leu Ala Ser
 130 135 140
 Ala Val Gly Met Ala Met Ala Ala Arg Arg Glu Arg Gly Leu Phe Asp
 145 150 155 160
15 Pro Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ser Pro Phe Asp His His Ile Tyr Val
 165 170 175
 Ile Ala Ser Asp Gly Asp Leu Gln Glu Gly Val Thr Ser Glu Ala Ser
 180 185 190
 Ser Ile Ala Gly Thr Gln Gln Leu Gly Asn Leu Ile Val Phe Trp Asp
20 195 200 205
 Asp Asn Arg Ile Ser Ile Glu Asp Asn Thr Glu Ile Ala Phe Asn Glu
 210 215 220
 Asp Val Val Ala Arg Tyr Lys Ala Tyr Gly Trp Gln Thr Ile Glu Val
 225 230 235 240
25 Glu Ala Gly Glu Asp Val Ala Ala Ile Glu Ala Ala Val Ala Glu Ala
 245 250 255
 Lys Lys Asp Thr Lys Arg Pro Thr Phe Ile Arg Val Arg Thr Ile Ile
 260 265 270
 Gly Phe Pro Ala Pro Thr Met Met Asn Thr Gly Ala Val His Gly Ala
30 275 280 285
 Ala Leu Gly Ala Ala Glu Val Ala Ala Thr Lys Thr Glu Leu Gly Phe
 290 295 300

Asp Pro Glu Ala His Phe Ala Ile Asp Asp Glu Val Ile Ala His Thr
 305 310 315 320
 Arg Ser Leu Ala Glu Arg Ala Ala Gln Lys Lys Ala Ala Trp Gln Val
 325 330 335
 5 Lys Phe Asp Glu Trp Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Lys Ala Leu Phe
 340 345 350
 Asp Arg Leu Asn Ser Arg Glu Leu Pro Ala Gly Tyr Ala Asp Glu Leu
 355 360 365
 Pro Thr Trp Asp Ala Asp Glu Lys Gly Val Ala Thr Arg Lys Ala Ser
 10 370 375 380
 Glu Ala Ala Leu Gln Ala Leu Gly Lys Thr Leu Pro Glu Leu Trp Gly
 385 390 395 400
 Gly Ser Ala Asp Leu Ala Gly Ser Asn Asn Thr Val Ile Lys Gly Ser
 405 410 415
 15 Pro Ser Phe Gly Pro Glu Ser Ile Ser Thr Glu Thr Trp Ser Ala Glu
 420 425 430
 Pro Tyr Gly Arg Asn Leu His Phe Gly Ile Arg Glu His Ala Met Gly
 435 440 445
 Ser Ile Leu Asn Gly Ile Ser Leu His Gly Gly Thr Arg Pro Tyr Gly
 20 450 455 460
 Gly Thr Phe Leu Ile Phe Ser Asp Tyr Met Arg Pro Ala Val Arg Leu
 465 470 475 480
 Ala Ala Leu Met Glu Thr Asp Ala Tyr Tyr Val Trp Thr His Asp Ser
 485 490 495
 25 Ile Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Val Glu Thr Leu
 500 505 510
 Ala Ala Leu Arg Ala Ile Pro Gly Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Asp
 515 520 525
 Ala Asn Glu Thr Ala Gln Ala Trp Ala Ala Ala Leu Glu Tyr Lys Glu
 30 530 535 540
 Gly Pro Lys Gly Leu Ala Leu Thr Arg Gln Asn Val Pro Val Leu Glu
 545 550 555 560

Gly Thr Lys Glu Lys Ala Ala Glu Gly Val Arg Arg Gly Gly Tyr Val
 565 570 575
 Leu Val Glu Gly Ser Lys Glu Thr Pro Asp Val Ile Leu Met Gly Ser
 580 585 590
5 Gly Ser Glu Val Gln Leu Ala Val Asn Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala
 595 600 605
 Glu Gly Val Ala Ala Arg Val Val Ser Val Pro Cys Met Asp Trp Phe
 610 615 620
 Gln Glu Gln Asp Ala Glu Tyr Ile Glu Ser Val Leu Pro Ala Ala Val
10 625 630 635 640
 Thr Ala Arg Val Ser Val Glu Ala Gly Ile Ala Met Pro Trp Tyr Arg
 645 650 655
 Phe Leu Gly Thr Gln Gly Arg Ala Val Ser Leu Glu His Phe Gly Ala
 660 665 670
15 Ser Ala Asp Tyr Gln Thr Leu Phe Glu Lys Phe Gly Ile Thr Thr Asp
 675 680 685
 Ala Val Val Ala Ala Ala Lys Asp Ser Ile Asn Gly
 690 695 700
 <210> 13
20 <211> 1083
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <220>
 <221> sequência de ácido nucléico
25 <222> (1)..(1083)
 <223> Transaldolase
 <400> 13
 atgtctcaca ttgatgatct tgcacagctc ggcacttcca cttggctcga cgacctctcc 60
 cgcgagcgca ttacttccgg caatctcagc caggttattg aggaaaagtc tgtagtcggt 120
30 gtcaccacca acccagctat tttcgcagca gcaatgtcca agggcgattc ctacgacgct 180
 cagatcgcag agctcaaggc cgctggcgca tctgttgacc aggctgttta cgccatgagc 240
 atcgacgacg ttcgcaatgc ttgtgatctg ttcaccggca tcttcgagtc ctccaacggc 300

	tacgacggcc gcgtgtccat cgaggttgac ccacgtatct ctgctgaccg cgacgcaacc	360
	ctggctcagg ccaaggagct gtgggcaaag gttgatcgtc caaacgtcat gatcaagatc	420
	cctgcaaccc caggttcttt gccagcaatc accgacgctt tggctgaggg catcagcggt	480
	aacgtcacct tgatcttctc cgttgctcgc taccgcgagg tcatcgctgc gttcatcgag	540
5	ggcatcaagc aggctgctgc aaacggccac gacgtctcca agatccactc tgtggcttcc	600
	ttcttcgtct cccgcgtcga cgttgagatc gacaagcgcc tcgaggcaat cggatccgat	660
	gaggcttttg ctctgcgcgg caaggcaggc gttgccaacg ctacgcgcgc ttacgctgtg	720
	tacaaggagc ttttcgacgc cgccgagctg cctgaagggtg ccaacactca gcgcccactg	780
	tgggcatcca ccggcgtgaa gaaccctgcg tacgctgcaa ctctttacgt ttccgagctg	840
10	gctgggtccaa acaccgtcaa caccatgcc aagggcacca tcgacgcggt tctggagcag	900
	ggcaacctgc acggtgacac cctgtccaac tccgcggcag aagctgacgc tgtgttctcc	960
	cagcttgagg ctctgggcgt tgacttggca gatgtcttcc aggtcctgga gaccgaggg	1020
	gtggacaagt tcgttgcttc ttggagcgaa ctgcttgagt ccatggaagc tcgcctgaag	1080
	tag	1083
15	<210> 14	
	<211> 360	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<220>	
20	<221> sequência de aminoácido	
	<222> (1)..(360)	
	<223> Transaldolase	
	<400> 14	
	Met Ser His Ile Asp Asp Leu Ala Gln Leu Gly Thr Ser Thr Trp Leu	
25	1 5 10 15	
	Asp Asp Leu Ser Arg Glu Arg Ile Thr Ser Gly Asn Leu Ser Gln Val	
	20 25 30	
	Ile Glu Glu Lys Ser Val Val Gly Val Thr Thr Asn Pro Ala Ile Phe	
	35 40 45	
30	Ala Ala Ala Met Ser Lys Gly Asp Ser Tyr Asp Ala Gln Ile Ala Glu	
	50 55 60	
	Leu Lys Ala Ala Gly Ala Ser Val Asp Gln Ala Val Tyr Ala Met Ser	

	65		70		75		80									
	Ile	Asp	Asp	Val	Arg	Asn	Ala	Cys	Asp	Leu	Phe	Thr	Gly	Ile	Phe	Glu
				85						90						95
	Ser	Ser	Asn	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Val	Ser	Ile	Glu	Val	Asp	Pro	Arg
5				100						105						110
	Ile	Ser	Ala	Asp	Arg	Asp	Ala	Thr	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys	Glu	Leu	Trp
				115						120						125
	Ala	Lys	Val	Asp	Arg	Pro	Asn	Val	Met	Ile	Lys	Ile	Pro	Ala	Thr	Pro
				130						135						140
10	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Ile	Thr	Asp	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Ser	Val
				145						150						160
	Asn	Val	Thr	Leu	Ile	Phe	Ser	Val	Ala	Arg	Tyr	Arg	Glu	Val	Ile	Ala
				165						170						175
	Ala	Phe	Ile	Glu	Gly	Ile	Lys	Gln	Ala	Ala	Ala	Asn	Gly	His	Asp	Val
15				180						185						190
	Ser	Lys	Ile	His	Ser	Val	Ala	Ser	Phe	Phe	Val	Ser	Arg	Val	Asp	Val
				195						200						205
	Glu	Ile	Asp	Lys	Arg	Leu	Glu	Ala	Ile	Gly	Ser	Asp	Glu	Ala	Leu	Ala
				210						215						220
20	Leu	Arg	Gly	Lys	Ala	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Gln	Arg	Ala	Tyr	Ala	Val
				225						230						240
	Tyr	Lys	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr
				245						250						255
	Gln	Arg	Pro	Leu	Trp	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	Lys	Asn	Pro	Ala	Tyr	Ala
25				260						265						270
	Ala	Thr	Leu	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	Ala	Gly	Pro	Asn	Thr	Val	Asn	Thr
				275						280						285
	Met	Pro	Glu	Gly	Thr	Ile	Asp	Ala	Val	Leu	Glu	Gln	Gly	Asn	Leu	His
				290						295						300
30	Gly	Asp	Thr	Leu	Ser	Asn	Ser	Ala	Ala	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Phe	Ser
				305						310						320
	Gln	Leu	Glu	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Leu	Ala	Asp	Val	Phe	Gln	Val	Leu

		325		330		335	
		Glu Thr Glu Gly Val Asp Lys Phe Val Ala Ser Trp Ser Glu Leu Leu					
		340		345		350	
		Glu Ser Met Glu Ala Arg Leu Lys					
5		355		360			
	<210>	15					
	<211>	960					
	<212>	DNA					
	<213>	Corynebacterium glutamicum					
10	<220>						
	<221>	sequência de ácido nucléico					
	<222>	(1)..(960)					
	<223>	C. glutamicum OCPA					
	<400>	15					
15	atgatctttg aacttccgga taccaccacc cagcaaattt ccaagaccct aactcgactg					60	
	cgtgaatcgg gcacccaggt caccaccggc cgagtgtca ccctcatcgt ggctactgac					120	
	tccgaaagcg atgtcgctgc agttaccgag tccaccaatg aagcctcgcg cgagcaccga					180	
	tctcgctga tcattttggt gggtggcgat aaaactgcag aaaacaaagt tgacgcagaa					240	
	gtcogtatcg gtggcgacgc tgggtgcttc gagatgatca tcatgcatct caacggacct					300	
20	gtcgctgaca agctccagta tgtcgtcaca ccaactgttg ttcctgacac ccccatcggt					360	
	gcttggtggc caggtgaatc accaaagaat ccttcccagg acccaattgg acgcatcgca					420	
	caacgacgca tcaactgatgc tttgtacgac cgtgatgacg cactagaaga tcgtgttgag					480	
	aactatcacc caggtgatac cgacatgacg tgggcgcgcc ttaccagtg gcggggactt					540	
	gttgccctcct cattggatca cccaccacac agcgaaatca cttccgtgag gctgaccggt					600	
25	gcaagcggca gtacctcggt ggatttggct gcaggctggt tggcgcgag gctgaaagtg					660	
	cctgtgatcc gcgaggtgac agatgctccc accgtgccaa ccgatgagtt tgggtactcca					720	
	ctgctggcta tccagcgctt ggagatcggt cgcaccaccg gctcgatcat catcaccatc					780	
	tatgacgctc atacccttca ggtagagatg ccggaatccg gcaatgcccc atcgctggtg					840	
	gctattgggtc gtcgaagtga gtccgactgc ttgtctgagg agcttcgcca catggatcca					900	
30	gatttgggct accagcacgc actatccggc ttgtccagcg tcaagctgga aaccgtctaa					960	
	<210>	16					
	<211>	319					

<212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum
 <220>
 <221> sequência de aminoácido
 5 <222> (1)..(319)
 <223> C. glutamicum OCPA
 <400> 16

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

195 200 205
 Leu Ala Ala Gly Trp Leu Ala Arg Arg Leu Lys Val Pro Val Ile Arg
 210 215 220
 Glu Val Thr Asp Ala Pro Thr Val Pro Thr Asp Glu Phe Gly Thr Pro
5 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Ile Gln Arg Leu Glu Ile Val Arg Thr Thr Gly Ser Ile
 245 250 255
 Ile Ile Thr Ile Tyr Asp Ala His Thr Leu Gln Val Glu Met Pro Glu
 260 265 270
10 Ser Gly Asn Ala Pro Ser Leu Val Ala Ile Gly Arg Arg Ser Glu Ser
 275 280 285
 Asp Cys Leu Ser Glu Glu Leu Arg His Met Asp Pro Asp Leu Gly Tyr
 290 295 300
 Gln His Ala Leu Ser Gly Leu Ser Ser Val Lys Leu Glu Thr Val
15 305 310 315
 <210> 17
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> artificial
20 <220>
 <223> homoserina desidrogenase
 <400> 17
 Met Thr Ser Ala Ser Ala Pro Ser Phe Asn Pro Gly Lys Gly Pro Gly
 1 5 10 15
25 Ser Ala Val Gly Ile Ala Leu Leu Gly Phe Gly Thr Val Gly Thr Glu
 20 25 30
 Val Met Arg Leu Met Thr Glu Tyr Gly Asp Glu Leu Ala His Arg Ile
 35 40 45
 Gly Gly Pro Leu Glu Val Arg Gly Ile Ala Val Ser Asp Ile Ser Lys
30 50 55 60
 Pro Arg Glu Gly Val Ala Pro Glu Leu Leu Thr Glu Asp Ala Phe Ala
 65 70 75 80

Leu Ile Glu Arg Glu Asp Val Asp Ile Val Val Glu Val Ile Gly Gly
 85 90 95
 Ile Glu Tyr Pro Arg Glu Val Val Leu Ala Ala Leu Lys Ala Gly Lys
 100 105 110
5 Ser Val Val Thr Ala Asn Lys Ala Leu Val Ala Ala His Ser Ala Glu
 115 120 125
 Leu Ala Asp Ala Ala Glu Ala Ala Asn Val Asp Leu Tyr Phe Glu Ala
 130 135 140
 Ala Val Ala Gly Ala Ile Pro Val Val Gly Pro Leu Arg Arg Ser Leu
10 145 150 155 160
 Ala Gly Asp Gln Ile Gln Ser Val Met Gly Ile Val Asn Gly Thr Thr
 165 170 175
 Asn Phe Ile Leu Asp Ala Met Asp Ser Thr Gly Ala Asp Tyr Ala Asp
 180 185 190
15 Ser Leu Ala Glu Ala Thr Arg Leu Gly Tyr Ala Glu Ala Asp Pro Thr
 195 200 205
 Ala Asp Val Glu Gly His Asp Ala Ala Ser Lys Ala Ala Ile Leu Ala
 210 215 220
 Ser Ile Ala Phe His Thr Arg Val Thr Ala Asp Asp Val Tyr Cys Glu
20 225 230 235 240
 Gly Ile Ser Asn Ile Ser Ala Ala Asp Ile Glu Ala Ala Gln Gln Ala
 245 250 255
 Gly His Thr Ile Lys Leu Leu Ala Ile Cys Glu Lys Phe Thr Asn Lys
 260 265 270
25 Glu Gly Lys Ser Ala Ile Ser Ala Arg Val His Pro Thr Leu Leu Pro
 275 280 285
 Val Ser His Pro Leu Ala Ser Val Asn Lys Ser Phe Asn Ala Ile Phe
 290 295 300
 Val Glu Ala Glu Ala Ala Gly Arg Leu Met Phe Tyr Gly Asn Gly Ala
30 305 310 315 320
 Gly Gly Ala Pro Thr Ala Ser Ala Val Leu Gly Asp Val Val Gly Ala
 325 330 335

Ala Arg Asn Lys Val His Gly Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ser Thr Tyr
340 345 350

Ala Asn Leu Pro Ile Ala Asp Phe Gly Glu Thr Thr Thr Arg Tyr His
355 360 365

5 Leu Asp Met Asp Val Glu Asp Arg Val Gly Val Leu Ala Glu Leu Ala
370 375 380

Ser Leu Phe Ser Glu Gln Gly Ile Ser Leu Arg Thr Ile Arg Gln Glu
385 390 395 400

10 Glu Arg Asp Asp Asp Ala Arg Leu Ile Val Val Thr His Ser Ala Leu
405 410 415

Glu Ser Asp Leu Ser Arg Thr Val Glu Leu Leu Lys Ala Lys Pro Val
420 425 430

Val Lys Ala Ile Asn Ser Val Ile Arg Leu Glu Arg Asp
435 440 445

15 <210> 18
<211> 421
<212> PRT
<213> artificial
<220>

20 <223> aspartato cinase
<400> 18

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
1 5 10 15

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
20 25 30

25 Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
35 40 45

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
50 55 60

30 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
65 70 75 80

Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr

	85	90	95
	Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg		
	100	105	110
	Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly		
5	115	120	125
	Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg		
	130	135	140
	Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala		
	145	150	155
10	160		
	Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val		
	165	170	175
	Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys		
	180	185	190
	Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly		
15	195	200	205
	Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn		
	210	215	220
	Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu		
	225	230	235
20	240		
	Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr		
	245	250	255
	Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile		
	260	265	270
	Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp		
25	275	280	285
	Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu		
	290	295	300
	Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg		
	305	310	315
30	320		
	Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr		
	325	330	335
	Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala		

340 345 350
 Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
 355 360 365
 Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
5 370 375 380
 Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
 385 390 395 400
 Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
 405 410 415
10 Ala Gly Thr Gly Arg
 420
 <210> 19
 <211> 309
 <212> PRT
15 <213> artificial
 <220>
 <223> homoserina cinase
 <400> 19
 Met Ala Ile Glu Leu Asn Val Gly Arg Lys Val Thr Val Thr Val Pro
20 1 5 10 15
 Gly Ser Ser Ala Asn Leu Gly Pro Gly Phe Asp Thr Leu Gly Leu Ala
 20 25 30
 Leu Ser Val Tyr Asp Thr Val Glu Val Glu Ile Ile Pro Ser Gly Leu
 35 40 45
25 Glu Val Glu Val Phe Gly Glu Gly Gln Gly Glu Val Pro Leu Asp Gly
 50 55 60
 Ser His Leu Val Val Lys Ala Ile Arg Ala Gly Leu Lys Ala Ala Asp
 65 70 75 80
 Ala Glu Val Pro Gly Leu Arg Val Val Cys His Asn Asn Ile Pro Gln
30 85 90 95
 Ser Arg Gly Leu Gly Ser Ser Ala Ala Ala Ala Val Ala Gly Val Ala
 100 105 110

Ala Ala Asn Gly Leu Ala Asp Phe Pro Leu Thr Gln Glu Gln Ile Val
115 120 125
Gln Leu Ser Ser Ala Phe Glu Gly His Pro Asp Asn Ala Ala Ala Ser
130 135 140
5 Val Leu Gly Gly Ala Val Val Ser Trp Thr Asn Leu Ser Ile Asp Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gln Pro Gln Tyr Ala Ala Val Pro Leu Glu Val Gln Asp Asn
165 170 175
Ile Arg Ala Thr Ala Leu Val Pro Asn Phe His Ala Ser Thr Glu Ala
10 180 185 190
Val Arg Arg Val Leu Pro Thr Glu Val Thr His Ile Asp Ala Arg Phe
195 200 205
Asn Val Ser Arg Val Ala Val Met Ile Val Ala Leu Gln Gln Arg Pro
210 215 220
15 Asp Leu Leu Trp Glu Gly Thr Arg Asp Arg Leu His Gln Pro Tyr Arg
225 230 235 240
Ala Glu Val Leu Pro Ile Thr Ser Glu Trp Val Asn Arg Leu Arg Asn
245 250 255
Arg Gly Tyr Ala Ala Tyr Leu Ser Gly Ala Gly Pro Thr Ala Met Val
20 260 265 270
Leu Ser Thr Glu Pro Ile Pro Asp Lys Val Leu Glu Asp Ala Arg Glu
275 280 285
Ser Gly Ile Lys Val Leu Glu Leu Glu Val Ala Gly Pro Val Lys Val
290 295 300
25 Glu Val Asn Gln Pro
305
<210> 20
<211> 192
<212> DNA
30 <213> artificial
<220>
<223> promotor P3119 = PSOD

	<400>	20		
			gagctgccaa ttattccggg cttgtgaccc gctacccgat aaataggtcg gctgaaaaat	60
			ttcgttgcaa tatcaacaaa aaggcctatc attgggaggt gtcgcaccaa gtacttttgc	120
			gaagcgccat ctgacggatt ttcaaaagat gtatatgctc ggtgcggaaa cctacgaaag	180
5			gatttttttac cc	192
	<210>	21		
	<211>	184		
	<212>	DNA		
	<213>	artificial		
10	<220>			
	<223>	promotor P497 = PgroES		
	<400>	21		
			ggtcgagcgg cttaaagttt ggctgccatg tgaattttta gcaccctcaa cagttgagtg	60
			ctggcactct cgggggtaga gtgccaaata ggttgtttga cacacagttg ttcaccgcgc	120
15			acgacggctg tgctggaaac ccacaaccgg cacacacaaa atttttctca tggagggatt	180
			catc	184
	<210>	22		
	<211>	192		
	<212>	DNA		
20	<213>	artificial		
	<220>			
	<223>	promotor P1284 = PEFTU		
	<400>	22		
			gagctgccaa ttattccggg cttgtgaccc gctacccgat aaataggtcg gctgaaaaat	60
25			ttcgttgcaa tatcaacaaa aaggcctatc attgggaggt gtcgcaccaa gtacttttgc	120
			gaagcgccat ctgacggatt ttcaaaagat gtatatgctc ggtgcggaaa cctacgaaag	180
			gatttttttac cc	192
	<210>	23		
	<211>	114		
30	<212>	DNA		
	<213>	artificial		
	<220>			

	<223>	promotor	
	<400>	23	
		gtcgactcat acgttaaadc taccaccgca agggataaat atctaaccac gtgcgtgttg	60
		actatatttac ctctggcggt gataatgggt gcatgtacta aggaggatta atta	114
5	<210>	24	
	<211>	7070	
	<212>	DNA	
	<213>	artificial	
	<220>		
10	<223>	Plasmideo pH273	
	<400>	24	
		tcgagaggcc tgacgtcggg cccgggtacca cgcgtcatat gactagttgg agaatacatga	60
		cctcagcatc tgccccaagc ttttaaccccg gcaagggtcc cggctcagca gtcggaattg	120
		cccttttagg attcgggaaca gtcggcactg aggtgatgag tctgatgacc gactacggtg	180
15		atgaacttgc gcaccgcatt ggtggccac tggaggttcg tggcattgct gtttctgata	240
		tctcaaagcc acgtgaagcc gttgcacctg agctgctcac tgaggacgct tttgcaactca	300
		tcgagcgcga ggatgttgac atcgctcgtt aggttatcgg cggcattgag taccacgtg	360
		aggtagttct cgcagctctg aaggccggca agtctgttgt taccgccaat aaggctcttg	420
		ttgcagctca ctctgctgag ctctgctgat cagcgggaag cgcgaacgtt gacctgtact	480
20		tcgaggctgc tggtgcaggc gcaattccag tgggtggccc actgcgtcgc tccctggctg	540
		gcgatcagat ccagtctgtg atgggcatcg ttaacggcac caccaacttc atcttgagcg	600
		ccatggattc caccggcgct gactatgcag attctttggc tgaggcaact cgtttgggtt	660
		acgccgaagc tgatccaact gcagacgtcg aaggccatga cgccgcatcc aaggctgcaa	720
		ttttggcatc catcgctttc cacaccgctg ttaccgcgga tgatgtgtac tgcgaaggta	780
25		tcagcaacat cagcgtgcc gacattgagg cagcacagca ggcaggccac accatcaagt	840
		tggtggccat ctgtgagaag ttcaccaaca aggaaggaaa gtcggctatt tctgctcgcg	900
		tgcacccgac tctattacct gtgtcccacc cactggcgct ggtaaacaag tcctttaatg	960
		caatctttgt tgaagcagaa gcagctggtc gcctgatgtt ctacggaaac ggtgcagggtg	1020
		gcgcgccaac cgcgtctgct gtgcttggcg acgtcgttgg tgccgcacga aacaagggtgc	1080
30		acggtggccg tgctccagggt gactccacct acgctaacct gccgatcgct gatttcgggtg	1140
		agaccaccac tcgttaccac ctgcacatgg atgtggaaga tcgctgtggg gttttggctg	1200
		aattggctag cctgttctct gagcaaggaa tcttcctgcg tacaatccga caggaagagc	1260

	gcgatgatga tgcacgtctg atcgtgggtca ccactctgc gctggaatct gatctttccc	1320
	gcaccgttga actgctgaag gctaagcctg ttgttaaggc aatcaacagt gtgatccgcc	1380
	tcgaaagga ctaattttac tgacatggca attgaactga acgtcggtcg taaggttacc	1440
	gtcacggtac ctggatcttc tgcaaacctc ggacctggct ttgacacttt aggtttggca	1500
5	ctgtcggtat acgacactgt cgaagtggaa attattccat ctggcttgga agtggaagtt	1560
	tttggcgaag gccaaaggca agtccctctt gatggctccc acctggtggt taaagctatt	1620
	cgtgctggcc tgaaggcagc tgacgctgaa gttcctggat tgcgagtggg gtgccacaac	1680
	aacattccgc agtctcgtgg tcttggctcc tctgctgcag cggcggttgc tgggtgtgct	1740
	gcagctaata gtttggcgga tttcccgctg actcaagagc agattgttca gttgtcctct	1800
10	gcctttgaag gccacccaga taatgctgcg gcttctgtgc tgggtggagc agtggtgtcg	1860
	tggacaaatc tgtctatcga cggcaagagc cagccacagt atgctgctgt accacttgag	1920
	gtgcaggaca atattcgtgc gactgcgctg gttcctaatt tccacgcac caccgaagct	1980
	gtgcgccgag tccttccac tgaagtcact cacatcgatg cgcgatttaa cgtgtcccgc	2040
	gttgcagtga tgatcgttgc gttgcagcag cgtcctgatt tgctgtggga gggactcgt	2100
15	gaccgtctgc accagcctta tcgtgcagaa gtgttgccata ttacctctga gtgggtaa	2160
	cgctgcgca accgtggcta cgcggcatac ctttccggtg ccggcccaac cgccatggtg	2220
	ctgtccactg agccaattcc agacaagggt ttggaagatg ctctgagtc tggcattaag	2280
	gtgcttgagc ttgaggttgc gggaccagtc aagggtgaag ttaaccaacc ttaggccc	2340
	caaggaaggc ccccttcgaa tcaagaaggg ggccttatta gtgcagcaat tattcgtga	2400
20	acacgtgaac cttacaggtg cccggcgctg tgagtggttt gagttccagc tggatgcggt	2460
	tgttttcacc gaggtttct tggatgaatc cggcgtggat ggcgcagacg aaggctgatg	2520
	ggcgtttgtc gttgaccaca aatgggcagc tgtgtagagc gagggagttt gcttcttcgg	2580
	tttcggtggg gtcaaagccc atttcgcgga ggcggttaat gagcggggag agggcttcgt	2640
	cgagttcttc ggcttcggcg tggtaaatgc ccatgacgtg tgcccactgg gttccgatgg	2700
25	aaagtgcctt ggcgcggagg tcggggttgt gcattgcgtc atcgtcgaca tcgccgagca	2760
	tgttggccat gagttcgatc agggatgatg attctttggc gacagcgcgg ttgtcgggga	2820
	cgcgtgtttg gaagatgagg gaggggcggg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag	2880
	cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc	2940
	ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc	3000
30	aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa	3060
	gcgaaccgga attgccagct ggggcgccct ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa	3120
	actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgagc gggatcaaga tctgatcaag	3180

	agacaggatg aggatcgttt cgcattgattg aacaagatgg attgcacgca gggtctccgg	3240
	ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg	3300
	atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccggg tctttttgtc aagaccgacc	3360
	tgtccgggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga	3420
5	cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc	3480
	tattgggcca agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag	3540
	tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgtg tgatccggct acctgcccac	3600
	tcgaccacca agcgaaacat cgcattcgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg	3660
	tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca	3720
10	ggctcaaggc gcgcattgcc gacggcggag atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct	3780
	tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg	3840
	gtgtggcggc ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgc tgatattgct gaagagcttg	3900
	gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacgggtat cgcgcgtccc gattcgcagc	3960
	gcattcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg gggtcgaaat	4020
15	gaccgaccaa gcgacgcccc acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta	4080
	tgaaagggtg ggcttcggaa tcgtttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg	4140
	ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaaa	4200
	taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tctcgcctca	4260
	ctgactcgtc gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg	4320
20	taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc	4380
	agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gttttttccat aggtccgccc	4440
	cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac	4500
	tataaagata ccaggcgttt ccccttgga gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc	4560
	tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata	4620
25	gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	4680
	acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca	4740
	accgggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	4800
	cgaggatatgt aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta	4860
	gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	4920
30	gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tgggtttttt gtttgcaagc	4980
	agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	5040
	ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa	5100

	ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gccgcggccg ccatcgccat tttcttttgc	5160
	gtttttatctt gttaactggt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg	5220
	ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt	5280
	agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta	5340
5	cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgtaggatc aagatccatt tttaacacaa	5400
	ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca	5460
	tgtaaatact gtttagacgta atgccgtcaa tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga	5520
	acaggtagca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg	5580
	tgtagatgc aatcagcggc ttcactcatt ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa	5640
10	tcataccgag agcgccgttt gctaaactcag ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt	5700
	tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag	5760
	attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt	5820
	ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtcgctt gagctgtagt	5880
	tgcttctatc gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg	5940
15	atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt	6000
	gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac	6060
	ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggcttttta	6120
	ggatagaatc atttgcacgc aatttgcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc	6180
	agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg	6240
20	catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag	6300
	tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga	6360
	tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgcgtgt	6420
	cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg	6480
	gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag	6540
25	taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcggt catgtctcct	6600
	tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt	6660
	tagttacgca caataaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact	6720
	ttgcccttta cacatttttag gtcttgcttg ctttatcagt acaaaccg cgcgatttac	6780
	ttttcgacct cattctatta gactctcggt tggattgcaa ctgggtctatt ttctctttt	6840
30	gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc cttaaagaact aaaaaatcta	6900
	tctgtttctt ttcatctctt gtatttttta tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc	6960
	tttttaata caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg	7020

```

caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaatac 7070
<210>      25
<211>      7070
<212>      DNA
5  <213>      artificial
<220>
<223>      Plasmideo pH373
<400>      25

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttgg agaatcatga 60
10 cctcagcatc tgccccaagc ttttaacccc gcaaggggtcc cggtcagca gtcggaattg 120
cccttttagg attcggaaca gtcggcactg aggtgatgcy tctgatgacc gagtacggtg 180
atgaacttgc gcaccgcatt ggtggccac tggaggttcg tggcattgct gtttctgata 240
tctcaaagcc acgtgaaggc gttgcacctg agctgctcac tgaggacgct tttgcactca 300
tcgagcgcga ggatgttgac atcgtcgttg aggttatcgg cggcattgag taccacgtg 360
15 aggtagttct cgcagctctg aaggccggca agtctgttgt taccgccaat aaggctcttg 420
ttgcagctca ctctgctgag cttgctgatg cagcggaagc cgcaaacgtt gacctgtact 480
tcgaggctgc tgttgcaagg gcaattccag tggttggccc actgcgtcgc tccttggtg 540
gcgatcagat ccagtctgtg atgggcatcg ttaacggcac caccaacttc atcttgagac 600
ccatggattc caccggcgct gactatgcag attctttggc tgaggcaact cgtttgggtt 660
20 acgccgaagc tgatccaact gcagacgtcg aaggccatga cgcgcacatc aaggctgcaa 720
ttttggcatc catcgcttcc cacaccgtg ttaccgcgga tgatgtgtac tgcgaaggta 780
tcagcaacat cagcgtgcc gacattgagg cagcacagca ggcaggccac accatcaagt 840
tgttggccat ctgtgagaag ttcaccaaca aggaaggaaa gtcggctatt tctgctcgcg 900
tgcacccgac tctattacct gtgtcccacc cactggcgctc ggtaaacaag tcctttaatg 960
25 caatctttgt tgaagcagaa gcagctggtc gcctgatggt ctacggaaac ggtgcagggtg 1020
gcgcgccaac cgcgtctgct gtgcttggcg acgtcgttgg tgccgcacga aacaagggtgc 1080
acggtggccg tgctccaggt gattccacct acgctaacct gccgatcgct gatttcggtg 1140
agaccaccac tcgttaccac ctgcacatgg atgtggaaga tcgcgtgggg gttttggctg 1200
aattggctag cctgttctct gagcaaggaa tcttcctgcy tacaatccga caggaagagc 1260
30 gcgatgatga tgcacgtctg atcgtggtca cccactctgc gctggaatct gatctttccc 1320
gcaccgttga actgctgaag gctaagcctg ttgttaaggc aatcaacagt gtgatccgcc 1380
tcgaaaggga ctaattttac tgacatggca attgaactga acgtcggctc taaggttacc 1440

```

	gtcacggtac ctggatcttc tgcaaacctc ggacctggct ttgacacttt aggtttggca	1500
	ctgtcgggat acgacactgt cgaagtggaa attattccat ctggcttgga agtgggaagt	1560
	tttggcgaag gccaaaggcga agtccctctt gatggctccc acctggtggt taaagctatt	1620
	cgtgctggcc tgaaggcagc tgacgctgaa gttcctggat tgcgagtggg gtgccacaac	1680
5	aacattccgc agtctcgtgg tcttggctcc tctgctgcag cggcggttgc tgggtgtgct	1740
	gcagctaata gtttggcgga tttcccgtg actcaagagc agattgttca gttgtcctct	1800
	gcctttgaag gccacccaga taatgctgcg gcttctgtgc tgggtggagc agtgggtgctg	1860
	tggacaaatc tgtctatcga cggcaagagc cagccacagt atgctgctgt accacttgag	1920
	gtgcaggaca atattcgtgc gactgcgctg gttcctaatt tccacgcac caccgaagct	1980
10	gtgcgccgag tccttccac tgaagtcact cacatcgatg cgcgatttaa cgtgtcccgc	2040
	gttgacgtga tgatcgttgc gttgcagcag cgtcctgatt tgctgtggga gggactcgt	2100
	gaccgtctgc accagcctta tcgtgcagaa gtgttgccca ttacctctga gtgggtaaac	2160
	cgcttgcgca accgtggcta cgcggcctac ctttccggtg ccggcccaac cgccatggtg	2220
	ctgtccactg agccaattcc agacaagggt ttggaagatg ctgctgagtc tggcattaag	2280
15	gtgcttgagc ttgaggttgc gggaccagtc aagggtgaag ttaaccaacc ttaggcccaa	2340
	caaggaaggc ccccttcgaa tcaagaaggg ggccttatta gtgcagcaat tattcgctga	2400
	acacgtgaac cttacaggtg cccggcgcgt tgagtggttt gagttccagc tggatgcggt	2460
	tgttttcacc gaggttttct tggatgaatc cggcgtggat ggcgcagacg aaggctgatg	2520
	ggcgtttgtc gttgaccaca aatgggcagc tgtgtagagc gagggagttt gcttcttcgg	2580
20	tttcggtggg gtcaaagccc atttcgcgga ggcggttaat gagcggggag agggcttcgt	2640
	cgagttcttc ggcttcggcg tgggttaatgc ccatgacgtg tgccactgg gttccgatgg	2700
	aaagtgcctt ggcgcggagg tcggggttgt gcattgcgtc atcgctcgaca tcgccgagca	2760
	tgttgcccat gagttcgatc aggggtgatgt attctttggc gacagcgcgg ttgtcgggga	2820
	cgcgtgtttg gaagatgagg gaggggagg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag	2880
25	cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc	2940
	ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caaggga aaa cgcaagcgca aagagaaagc	3000
	aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa	3060
	gcgaaccgga attgccagct ggggcgcct ctggttaagg tgggaagccc tgcaaagtaa	3120
	actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag	3180
30	agacaggatg aggatcgttt cgcattgatt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg	3240
	ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg	3300
	atgccgccgt gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccgt tctttttgtc aagaccgacc	3360

	tgtccggtgc	cctgaatgaa	ctgcaggacg	aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	3420
	cgggcgttcc	ttgcgcagct	gtgctcgacg	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	3480
	tattgggcga	agtgccgggg	caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctcct	gccgagaaaag	3540
	tatccatcat	ggctgatgca	atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgccccat	3600
5	tcgaccacca	agcgaaacat	cgcacgcagc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggtcttg	3660
	tcgatcagga	tgatctggac	gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	3720
	ggctcaaggc	gcgcattgcc	gacggcgagg	atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgct	3780
	tgccgaatat	catggtggaa	aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	3840
	gtgtggcgga	ccgctatcag	gacatagcgt	tggctacccg	tgatattgct	gaagagcttg	3900
10	gcggcgaatg	ggctgaccgc	ttcctcgtgc	tttacggtat	cgcgcgtccc	gattcgcagc	3960
	gcatcgcctt	ctatcgcctt	cttgacgagt	tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	4020
	gaccgaccaa	gcgacgccca	acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	4080
	tgaaaggttg	ggcttcggaa	tcgttttccg	ggacgccggc	tgatgatcc	tccagcgcg	4140
	ggatctcatg	ctggagttct	tcgcccacgc	tagcggcgcg	ccggccggcc	cgggtgtgaaa	4200
15	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	gcatcaggcg	ctcttcgct	tcctcgctca	4260
	ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	4320
	taatacggtt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaaggcc	4380
	agcaaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	4440
	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	caagtcagag	gtggcgaaaac	ccgacaggac	4500
20	tataaagata	ccaggcgttt	ccccctggaa	gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	4560
	tgccgcttac	cggatacctg	tccgcctttc	tccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	4620
	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	4680
	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	4740
	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	4800
25	cgaggatatgt	aggcgggtgct	acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	4860
	gaaggacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	4920
	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	4980
	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacgggggt	5040
	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	ggatcatgaga	ttatcaaaaa	5100
30	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaaggccg	gccgcggccg	ccatcggcac	tttcttttgc	5160
	gtttttat	gttaactgtt	aattgtcctt	gttcaaggat	gctgtctttg	acaacagatg	5220
	ttttcttgcc	tttgatgttc	agcaggaagc	tcggcgcaaa	cgttgattgt	ttgtctgcgt	5280

	agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta	5340
	cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgtaggatc aagatccatt tttaacacaa	5400
	ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca	5460
	tgtaaatatc gttagacgta atgccgtcaa tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga	5520
5	acaggtagca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg	5580
	tgtagatgc aatcagcggg ttcacactt ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa	5640
	tcataccgag agcgccgttt gctaactcag ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt	5700
	tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag	5760
	attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt	5820
10	ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtatg gttgtgcgct gagctgtagt	5880
	tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg	5940
	atttataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt	6000
	gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac	6060
	ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggctcttta	6120
15	ggatagaatc atttgcatcg aatttgtcgc tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc	6180
	agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaactgat gtgtcatccg	6240
	catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag	6300
	tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga	6360
	tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt	6420
20	cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg	6480
	gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag	6540
	taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcggt catgtctcct	6600
	tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt	6660
	tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgccaa agtatacact	6720
25	ttgcccttta cacattttag gtcttgccgt ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac	6780
	ttttcgacct cattctatta gactctcggt tggattgcaa ctgggtctatt ttctctttt	6840
	gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta	6900
	tctgtttctt ttcattctct gtatttttta tagtttctgt tgcattgggca taaagttgcc	6960
	tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg	7020
30	caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaatac	7070
	<210> 26	
	<211> 8766	

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Plasmideo pH304

5 <400> 26

	tcgagaggcc	tgacgtcggg	cccggtagca	cgcgtagcat	gactagttcg	gacctaggga	60
	tatcgtcgac	atcgatgctc	ttctgcgtta	attaacaatt	gggatctctc	aactaatgca	120
	gcgatgcgtt	ctttccagaa	tgctttcatg	acagggatgc	tgtcttgatc	aggcaggcgt	180
	ctgtgctgga	tgccgaagct	ggattttattg	tcgcctttgg	aggtgaagtt	gacgctcact	240
10	cgagaatcat	cgcccaacca	tttggcattg	aatgttctag	gttcggaggc	ggagggttttc	300
	tcaatttagt	cgggatcgag	ccactgcgcc	cgaggtcat	cgtctccgaa	gagcttccac	360
	actttttcga	ccggcagggt	aagggttttg	gaggcattgg	ccgcgaaccc	atcgctggtc	420
	atcccgggtt	tgccgatgcc	acgttcgtat	tcataaccaa	tcgcgatgcc	ttgagcccac	480
	cagccactga	catcaaagtt	gtccacgatg	tgctttgcga	tgtgggtgtg	agtccaagag	540
15	gtggctttta	cgtcgtcaag	caatttttagc	cactcttccc	acggctttcc	ggtgccgttg	600
	aggatagctt	caggggacat	gcctgggtgtt	gagccttgcg	gagtggagtc	agtcatgcga	660
	ccgagactag	tgccgctttg	ggtaccgggc	ccccctcga	ggtcgagcgg	cttaaagtgt	720
	ggctgccatg	tgaattttta	gcaccctcaa	cagttgagtg	ctggcactct	cgggggtaga	780
	gtgcaaata	ggttggttga	cacacagttg	ttcaccgcg	acgacggctg	tgctggaaac	840
20	ccacaaccgg	cacacacaaa	atttttctca	tggagggatt	catcatgtcg	acttcagtta	900
	cttcaccagc	ccacaacaac	gcacattcct	ccgaattttt	ggatgcgttg	gcaaaccatg	960
	tgttgatcgg	cgacggcgcc	atgggcaccc	agctccaagg	ctttgacctg	gacgtggaaa	1020
	aggatttcct	tgatctggag	gggtgtaatg	agattctcaa	cgacaccgcg	cctgatgtgt	1080
	tgaggcagat	tcaccgcgcc	tactttgagg	cgggagctga	cttggttgag	accaataactt	1140
25	ttggttgcaa	cctgccgaac	ttggcggatt	atgacatcgc	tgatcgttgc	ctgagccttg	1200
	cctacaaggg	cactgcagtg	gctaggggaag	tggctgatga	gatggggccg	ggccgaaacg	1260
	gcatgcggcg	tttcgtgggt	ggttccttgg	gacctggaac	gaagcttcca	tcgctggggc	1320
	atgcaccgta	tgacgatttg	cgtgggcact	acaaggaagc	agcgcttggc	atcatcgacg	1380
	gtggtggcga	tgcttttttg	attgagactg	ctcaggactt	gcttcaggtc	aaggctgcgg	1440
30	ttcacggcgt	tcaagatgcc	atggctgaac	ttgatacatt	cttgccatt	atttgccacg	1500
	tcaccgtaga	gaccaccggc	accatgctca	tgggttctga	gatcggtgcc	gcgttgacag	1560
	cgctgcagcc	actgggtatc	gacatgattg	gtctgaactg	cgccaccggc	ccagatgaga	1620

	tgagcgagca cctgcgttac ctgtccaagc acgccgatat tcctgtgtcg gtgatgccta	1680
	acgcaggtct tcctgtcctg ggtaaaaacg gtgcagaata cccacttgag gctgaggatt	1740
	tggcgcaggc gctggctgga ttcgtctccg aatatggcct gtccatggtg ggtggttgtt	1800
	gtggcaccac acctgagcac atccgtgcgg tccgcgatgc ggtggttggg gttccagagc	1860
5	aggaaacctc cacactgacc aagatccctg caggccctgt tgagcaggcc tcccgcgagg	1920
	tggagaaaga ggactccgtc gcgtcgtgt acacctcggg gccattgtcc caggaaaccg	1980
	gcatttccat gatcggtagag cgcaccaact ccaacggttc caaggcattc cgtgaggcaa	2040
	tgctgtctgg cgattgggaa aagtgtgtgg atattgcaa gcagcaaacc cgcgatggtg	2100
	cacacatgct ggatctttgt gtggattacg tgggacgaga cggcaccgcc gatatggcga	2160
10	ccttggcagc acttcttgct accagctcca ctttgccaat catgattgac tccaccgagc	2220
	cagaggttat tcgcacaggc cttgagcact tgggtggacg aagcatcggt aactccgtca	2280
	actttgaaga cggcgatggc cctgagtccc gctaccagcg catcatgaaa ctggtaaagc	2340
	agcacggtgc ggccgtggtt gcgctgacca ttgatgagga aggccaggca cgtaccgctg	2400
	agcacaaggt gcgcattgct aaacgactga ttgacgatat caccggcagc tacggcctgg	2460
15	atatcaaaga catcgttgtg gactgcctga ccttcccgat ctctactggc caggaagaaa	2520
	ccaggcgaga tggcattgaa accatcgaag ccatccgcga gctgaagaag ctctaccag	2580
	aaatccacac caccctgggt ctgtccaata tttccttcgg cctgaaccct gctgcacgcc	2640
	aggttcttaa ctctgtgttc ctcaatgagt gcattgaggc tgggtctggac tctgcgattg	2700
	cgcacagctc caagattttg ccgatgaacc gcattgatga tcgccagcgc gaagtggcgt	2760
20	tggatatggt ctatgatcgc cgcaccgagg attacgatcc gctgcaggaa ttcatgcagc	2820
	tgtttgaggg cgtttctgct gccgatgcca aggatgctcg cgtgaacag ctggccgcta	2880
	tgctttgtt tgagcgtttg gcacagcgca tcatcgacgg cgataagaat ggccttgagg	2940
	atgatctgga agcaggcatg aaggagaagt ctctatttgc gatcatcaac gaggaccttc	3000
	tcaacggcat gaagaccgtg ggtgagctgt ttggttccgg acagatgcag ctgccattcg	3060
25	tgctgcaatc ggcagaaacc atgaaaactg cgggtggccta tttggaaccg ttcattggaag	3120
	aggaagcaga agctaccgga tctgcgcagg cagagggcaa gggcaaaatc gtcgtggcca	3180
	ccgtcaaggg tgacgtgcac gatatcggca agaacttggg ggacatcatt ttgtccaaca	3240
	acggttacga cgtggtgaac ttgggcatca agcagccact gtccgccatg ttggaagcag	3300
	cgaagaaca caaagcagac gtcacggca tgtcgggact tcttgtgaag tccaccgtgg	3360
30	tgatgaagga aaaccttgag gagatgaaca acgccggcg atccaattac ccagtcattt	3420
	tgggtggcgc tgcgtgacg cgtacctacg tggaaaacga tctcaacgag gtgtacaccg	3480
	gtgaggtgta ctacgcccgat gatgctttcg agggcctgcg cctgatggat gaggtgatgg	3540

	cagaaaagcg	tggtgaagga	cttgatccca	actcaccaga	agctattgag	caggcgaaga	3600
	agaaggcgga	acgtaaggct	cgtaatgagc	gttcccgcga	gattgccgcg	gagcgtaaag	3660
	ctaattgcgc	tcccgtgatt	gttccggagc	gttctgatgt	ctccaccgat	actccaaccg	3720
	cggcaccacc	gttctgggga	acccgcattg	tcaagggctc	gcccttggcg	gagttcttgg	3780
5	gcaaccttga	tgagcgcgcc	ttgttcatgg	ggcagtgagg	tctgaaatcc	acccgcggca	3840
	acgagggtcc	aagctatgag	gatttggtgg	aaactgaagg	ccgaccacgc	ctgcgctact	3900
	ggctggatcg	cctgaagtct	gagggcattt	tggaccacgt	ggccttgggtg	tatggctact	3960
	tcccagcggg	cgcggaaggc	gatgacgtgg	tgatcttggg	atccccggat	ccacacgcag	4020
	ccgaacgc	gcgctttagc	ttcccacgcc	agcagcgcg	caggttcttg	tgcatcgcg	4080
10	atttcattcg	cccacgcgag	caagctgtca	aggacggcca	agtggacgtc	atgccattcc	4140
	agctggtcac	catgggta	cctattgctg	atttcgccaa	cgagttgttc	gcagccaatg	4200
	aataccgcga	gtacttggaa	gttcacggca	tcggcggtga	gctcaccgaa	gcattggccg	4260
	agtactggca	ctcccagtg	cgacgcgaac	tcaagctgaa	cgacgggtga	tctgtcgtcg	4320
	attttgatcc	agaagacaag	accaagttct	tcgacctgga	ttaccgcggc	gcccgttctt	4380
15	cctttgggta	cggttcttgc	cctgatctgg	aagaccgcgc	aaagctgggtg	gaattgctcg	4440
	agccaggccg	tatcggcgtg	gagttgtccg	aggaaactcca	gctgcaccca	gagcagtcca	4500
	cagacgcgtt	tgtgctctac	caccacagagg	caaagtactt	taacgtctaa	tctagaccgc	4560
	ggatttaaat	cgctagcggg	ctgctaaagg	aagcgggaaca	cgtagaaagc	cagtccgcag	4620
	aaacgggtgct	gaccccggt	gaatgtcagc	tactgggcta	tctggacaag	ggaaaacgca	4680
20	agcgcaaaga	gaaagcaggt	agcttgcagt	gggcttacat	ggcgatagct	agactgggcg	4740
	gttttatgga	cagcaagcga	accggaattg	ccagctgggg	cgccctctgg	taaggttggg	4800
	aagccctgca	aagtaaaactg	gatggctttc	ttgccgccaa	ggatctgatg	gcgcagggga	4860
	tcaagatctg	atcaagagac	aggatgagga	tcgtttcgca	tgattgaaca	agatggattg	4920
	cacgcagggt	ctccggccgc	ttgggtggag	aggctattcg	gctatgactg	ggcacaacag	4980
25	acaatcggct	gctctgatgc	cgccgtgttc	cggctgtcag	cgcaggggcg	cccgttctt	5040
	tttgtcaaga	ccgacctgtc	cggtgccctg	aatgaactgc	aggacgaggc	agcgcggtca	5100
	tcgtggctgg	ccacgacggg	cggttcttgc	gcagctgtgc	tcgacgttgt	cactgaagcg	5160
	ggaagggact	ggctgctatt	gggcgaagtg	ccggggcagg	atctcctgtc	atctcacctt	5220
	gctcctgccg	agaaagtatc	catcatggct	gatgcaatgc	ggcgggtgca	tacgcttgat	5280
30	ccggctacct	gcccatcgca	ccaccaagcg	aaacatcgca	tcgagcgagc	acgtactcgg	5340
	atggaagccg	gtcttgtcga	tcaggatgat	ctggacgaag	agcatcaggg	gctcgcgcca	5400
	gccgaactgt	tcgccaggct	caaggcgcg	atgcccgcgc	gcgaggatct	cgtcgtgacc	5460

	catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc	5520
	gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccctgat	5580
	attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc	5640
	gctcccgatt cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg acgagtctt ctgagcggga	5700
5	ctctgggggtt cgaaatgacc gaccaagcga cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt	5760
	ccaccgccgc cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga	5820
	tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg agttcttcgc ccacgctagc ggcgcgccgg	5880
	ccggcccgggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcac caggcgctct	5940
	tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca	6000
10	gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaagaac	6060
	atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt gctggcggtt	6120
	ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg	6180
	cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc ctcgtgcgc	6240
	tctcctgttc cgaccctgcc gcttacggga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc	6300
15	gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc	6360
	aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac	6420
	tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggt	6480
	aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct	6540
	aactacggct acactagaag gacagtatctt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc	6600
20	ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtggt	6660
	ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatccttg	6720
	atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc	6780
	atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa aggccggccg cggccgccat	6840
	cggcattttc ttttgcttt ttatttgta actgttaatt gtccttgttc aaggatgctg	6900
25	tctttgacaa cagatgtttt cttgcctttg atgttcagca ggaagctcgg cgcaaacgtt	6960
	gattgtttgt ctgcgtagaa tcctctgttt gtcatatagc ttgtaatcac gacattgttt	7020
	cctttcgctt gaggtacagc gaagtgtgag taagtaaagg ttacatcgtt aggatcaaga	7080
	tccattttta acacaaggcc agttttgttc agcggcttgt atgggccagt taaagaatta	7140
	gaaacataac caagcatgta aatatcgta gacgtaatgc cgtcaatcgt catttttgat	7200
30	ccgcgggagt cagtgaacag gtaccatttg ccgttcattt taaagacgtt cgcgcgttca	7260
	atttcatctg ttactgtgtt agatgcaatc agcggtttca tcactttttt cagtgtgtaa	7320
	tcacgtttta gctcaatcat accgagagcg ccgttttgcta actcagccgt gcgtttttta	7380

	tcgctttgca gaagtttttg actttcttga cggaagaatg atgtgctttt gccatagtat	7440
	gctttgttaa ataaagattc ttcgccttgg tagccatctt cagttccagt gtttgcttca	7500
	aataactaagt atttgtggcc tttatcttct acgtagtgag gatctctcag cgtatggttg	7560
	tcgcctgagc tgtagttgcc ttcacogatg aactgctgta ctttttgata cgtttttccg	7620
5	tcaccgtcaa agattgattt ataatcctct acaccgttga tgttcaaaga gctgtctgat	7680
	gctgatacgt taacttgtgc agttgtcagt gtttgtttgc cgtaatgttt accggagaaa	7740
	tcagtgtaga ataaacggat ttttcogtca gatgtaaagtg tggctgaacc tgaccattct	7800
	tgtgtttggt ctttttaggat agaatcattt gcatcgaatt tgtoctgtgc tttaaagacg	7860
	cggccagcgt ttttcagct gtcaatagaa gtttcgccga ctttttgata gaacatgtaa	7920
10	atcgatgtgt catccgcatt tttaggatct ccggctaagtg caaagacgat gtggtagccg	7980
	tgatagtttg cgacagtgcc gtcagcgttt tgtaatggcc agctgtccca aacgtccagg	8040
	ccttttgcag aagagatatt ttttaattgtg gacgaatcaa attcagaaac ttgatatttt	8100
	tcattttttt gctgttcagg gatttgcagc atatcatggc gtgtaatatg ggaaatgccg	8160
	tatgtttcct tatatggctt ttggttcggt tctttcgcaa acgcttgagt tgcgcctcct	8220
15	gccagcagtg cggtagtaaa ggtaataact gttgcttggt ttgcaaactt tttgatgttc	8280
	atcgttcatg tctccttttt tatgtactgt gttagcggtc tgcttcttcc agccctcctg	8340
	tttgaagatg gcaagttagt tacgcacaat aaaaaaagac ctaaaatatg taaggggtga	8400
	cgccaaagta tacactttgc cctttacaca ttttaggtct tgccctgcttt atcagtaaca	8460
	aaccgcgcgc atttactttt cgacctcatt ctattagact ctcgttttga ttgcaactgg	8520
20	tctattttcc tcttttggtt gatagaaaat cataaaagga tttgcagact acgggcctaa	8580
	agaactaaaa aatctatctg tttcttttca ttctctgtat tttttatagt ttctgttgca	8640
	tgggcataaa gttgcctttt taatcacaat tcagaaaata tcataaatatc tcatttcaact	8700
	aaataatagt gaacggcagg tatatgtgat ggggtaaaaa ggatcggcgg ccgctcgatt	8760
	taaatc	8766
25	<210> 27	
	<211> 7070	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> Plasmideo pH399	
	<400> 27	
	tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtacca cgcgtcatat gactagttgg agaatacatga	60

	cctcagcatc	tgccccaagc	ttaacccccg	gcaaggggtcc	cggtcagca	gtcgggaattg	120
	cccttttagg	attcggaaca	gtcggcactg	aggtgatgcg	tctgatgacc	gagtacggtg	180
	atgaacttgc	gcaccgcatt	ggtggcccac	tggagggttcg	tggcattgct	gtttctgata	240
	tctcaaagcc	acgtgaaggc	gttgcacctg	agctgctcac	tgaggacgct	tttgactca	300
5	tcgagcgcga	ggatgttgac	atcgctcgtt	aggttatcgg	cggcattgag	taccacgtg	360
	aggtagttct	cgcagctctg	aaggccggca	agtctgttgt	taccgccaat	aaggctcttg	420
	ttgcagctca	ctctgctgag	cttgctgatg	cagcggaagc	cgcaaacgtt	gacctgtact	480
	tcgaggctgc	tggtgcaggc	gcaattocag	tggttgggcc	actgcgtcgc	tccttggtg	540
	gcgatcagat	ccagtctgtg	atgggcatcg	ttaacggcac	caccaacttc	atcttgacg	600
10	ccatggattc	caccggcgct	gactatgcag	attctttggc	tgaggcaact	cgtttgggtt	660
	acgccgaagc	tgatccaact	gcagacgtcg	aaggccatga	cgccgcatcc	aaggctgcaa	720
	ttttggcatc	catcgctttc	cacaccgctg	ttaccgcgga	tgatgtgtac	tgcaaggta	780
	tcagcaacat	cagcgctgcc	gacattgagg	cagcacagca	ggcaggccac	accatcaagt	840
	tgttggccat	ctgtgagaag	ttcaccaaca	aggaaggaaa	gtcggctatt	tctgctcgcg	900
15	tgaccccgac	tctattacct	gtgtcccacc	cactggcgtc	ggtaaacaag	tcctttaatg	960
	caatctttgt	tgaagcagaa	gcagctgggtc	gcctgatgtt	ctacggaaac	ggtgcagggtg	1020
	gcgcgccaac	cgctctgct	gtgcttggcg	acgtcgttgg	tgccgcacga	aacaagggtgc	1080
	acggtggccg	tgctccaggt	gagtcacact	acgctaacct	gccgatcgct	gatttcggtg	1140
	agaccaccac	tcgttaccac	ctcgacatgg	atgtggaaga	tcgcgtgggg	gttttggtcg	1200
20	aattggctag	cctgttctct	gagcaaggaa	tcttcctgcg	tacaatccga	caggaagagc	1260
	gcgatgatga	tgacgtctg	atcggtgtca	cccactctgc	gctggaatct	gatctttccc	1320
	gcaccgttga	actgctgaag	gctaagcctg	ttgttaaggc	aatcaacagt	gtgatccgcc	1380
	tcgaaaggga	ctaattttac	tgacatggca	attgaactga	acgtcggctg	taaggttacc	1440
	gtcacggtac	ctggatcttc	tgcaaaccct	ggacctggct	ttgacacttt	aggtttggca	1500
25	ctgtcggtat	acgacactgt	cgaagtggaa	attattccat	ctggcttggga	agtgggaagtt	1560
	tttggcgaag	gccaaaggcga	agtcctctct	gatggctccc	acctggtggt	taaagctatt	1620
	cgtgctggcc	tgaaggcagc	tgacgctgaa	gttcctggat	tgcgagtggg	gtgccacaac	1680
	aacattccgc	agtctcgtgg	tcttggctcc	gctgctgcag	cggcggttgc	tggtgttgct	1740
	gcagctaata	gtttggcgga	tttcccgctg	actcaagagc	agattgttca	gttgtcctct	1800
30	gcctttgaag	gccaccacga	taatgctgcg	gcttctgtgc	tgggtggagc	agtgggtgctg	1860
	tggacaaatc	tgtctatcga	cggcaagagc	cagccacagt	atgctgctgt	accacttgag	1920
	gtgcaggaca	atattcgtgc	gactgcgctg	gttcctaatt	tccacgcac	caccgaagct	1980

	gtgcgccgag	tccttcccac	tgaagtcact	cacatcgatg	cgcgatttaa	cggtgtcccgc	2040
	gttgacagtga	tgatcggtgc	gttgacagcag	cgctcctgatt	tgctgtggga	gggtactcgt	2100
	gaccgtctgc	accagcctta	tcgtgcagaa	gtgttgcccta	ttacctctga	gtgggtaaac	2160
	cgcttgccga	accgtggcta	cgcggcatac	ctttccggtg	ccggcccaac	cgccatgggtg	2220
5	ctgtccactg	agccaattcc	agacaagggt	ttggaagatg	ctcgtgagtc	tggcattaag	2280
	gtgcttgagc	ttgaggttgc	gggaccagtc	aagggtgaag	ttaaccaacc	ttaggcccac	2340
	caaggaaggc	ccccttcgaa	tcaagaaggg	ggccttatta	gtgcagcaat	tattcgctga	2400
	acacgtgaac	cttacagggtg	cccggcgcgt	tgagtggttt	gagttccagc	tggatgcggt	2460
	tgttttcacc	gaggctttct	tggatgaatc	cggcgtggat	ggcgcagacg	aaggctgatg	2520
10	ggcgtttgtc	gttgaccaca	aatgggcagc	tgtgtagagc	gagggagttt	gcttcttcgg	2580
	tttcggtggg	gtcaaagccc	atttcgcgga	ggcggttaat	gagcggggag	agggcttcgt	2640
	cgagttcttc	ggcttcggcg	tggttaatgc	ccatgacgtg	tgccactggg	gttccgatgg	2700
	aaagtgcctt	ggcgcggagg	tcggggttgt	gcattgcgtc	atcgtcgaca	tcgccgagca	2760
	tggtggccat	gagttcgatc	aggggtgatgt	attctttggc	gacagcgcg	ttgtcgggga	2820
15	cgcggttttg	gaagatgagg	gaggggcggg	atcctctaga	cccgggattt	aaatcgctag	2880
	cgggctgcta	aaggaagcgg	aacacgtaga	aagccagtcc	gcagaaacgg	tgctgacccc	2940
	ggatgaatgt	cagctactgg	gctatctgga	caagggaaaa	cgcaagcgca	aagagaaaagc	3000
	aggtagcttg	cagtgggctt	acatggcgat	agctagactg	ggcggtttta	tggacagcaa	3060
	gcgaaccgga	attgccagct	ggggcgccct	ctggtaaggt	tgggaagccc	tgcaaagtaa	3120
20	actggatggc	tttcttgccg	ccaaggatct	gatggcgagc	gggatcaaga	tctgatcaag	3180
	agacaggatg	aggatcgctt	cgcattgattg	aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	3240
	ccgcttgggg	ggagaggcta	ttcggctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	3300
	atgccgccgt	gttccggctg	tcagcgcagg	ggcgcccggt	tctttttgtc	aagaccgacc	3360
	tgtccgggtg	cctgaatgaa	ctgcaggacg	aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	3420
25	cgggcgttcc	ttgcgcagct	gtgctcgacg	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	3480
	tattgggcga	agtgccgggg	caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctcct	gccagaaaag	3540
	tatccatcat	ggctgatgca	atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgcccac	3600
	tcgaccacca	agcgaaacat	cgcacgcagc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggtcttg	3660
	tcgatcagga	tgatctggac	gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	3720
30	ggctcaaggc	gcgcattgcc	gacggcgagg	atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgct	3780
	tgccgaatat	catggtggaa	aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	3840
	gtgtggcgga	ccgctatcag	gacatagcgt	tggctaccgc	tgatattgct	gaagagcttg	3900

	gcggcgcaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc	3960
	gcatcgcctt ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg gggtcgaaat	4020
	gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta	4080
	tgaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcg	4140
5	ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtaaa	4200
	taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtca	4260
	ctgactcgtt gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggc atcagctcac tcaaaggcgg	4320
	taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc	4380
	agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc	4440
10	cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac	4500
	tataaagata ccaggcgttt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gtcccgaccc	4560
	tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata	4620
	gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc	4680
	acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca	4740
15	acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	4800
	cgaggatatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta	4860
	gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	4920
	gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc	4980
	agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	5040
20	ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggaattt ggtcatgaga ttatcaaaaa	5100
	ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg gcccgggccg ccatcggcatt tttcttttgc	5160
	gtttttatct gtttaactgtt aattgtcctt gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg	5220
	ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt	5280
	agaatcctct gtttgtcata tagcttgtaa tcacgacatt gtttccttcc gcttgaggta	5340
25	cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat cgtaggatac aagatccatt tttaacacaa	5400
	ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc cagttaaaga attagaaaca taaccaagca	5460
	tgtaaataac gttagacgta atgccgtcaa tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga	5520
	acaggtagca tttgccgttc attttaaaga cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg	5580
	tgtagatgc aatcagcggc ttcacactt ttttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa	5640
30	tcataccgag agcgccgttt gctaactcag ccgtgcgttt tttatcgctt tgcagaagtt	5700
	tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag	5760
	attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt	5820

	ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc tcagcgtagt gttgtcgctt gagctgtagt	5880
	tgccttcatc gatgaactgc tgtacatctt gatacgcttt tccgtcaccg tcaaagattg	5940
	atctataatc ctctacaccg ttgatgttca aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt	6000
	gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac	6060
5	ggatctttcc gtcagatgta aatgtggctg aacctgacca ttcttgtgtt tggctcttta	6120
	ggatagaatc atttgcacgc aatttgtcgc tgtcttttaa gacgcggcca gcgtttttcc	6180
	agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg	6240
	catttttagg atctccggct aatgcaaaga cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag	6300
	tgccgtcagc gttttgtaat gccagctgt cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga	6360
10	tatttttaat tgtggacgaa tcaaatcag aaacttgata tttttcattt ttttgctgtt	6420
	cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg	6480
	gcttttggtt cgtttctttc gcaaacgctt gagttgcgcc tcctgccagc agtgcggtag	6540
	taaagggtta tactgttgct tgttttgcaa actttttgat gttcatcggt catgtctcct	6600
	tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt	6660
15	tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa tatgtaaggg gtgacgcaa agtataact	6720
	ttgcccttta cacatttttag gtcttgcttg ctttatcagt aacaaaccg cgcgatttac	6780
	ttttcgacct cattctatta gactctcggt tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt	6840
	gtttgataga aaatcataaa aggatttgca gactacgggc cttaaagaact aaaaaatcta	6900
	tctgtttctt ttcattctct gtatttttta tagtttctgt tgcattgggca taaagttgcc	6960
20	tttttaatca caattcagaa aatatcataa tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg	7020
	caggatatatg tgatgggtta aaaaggatcg gcggccgctc gatttaaata	7070
	<210> 28	
	<211> 6625	
	<212> DNA	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> pH484	
	<400> 28	
	tcgagaggcc tgacgtcggg ccggtaccg ttgctcgctg atctttcggc ttaacaactt	60
30	tgtattcaat cagtcgggca tagaaagaaa acgcaatgat ataggaaacca actgccgcca	120
	aaaccagcca cacagagttg attgtttcgc cacgggagaa agcgattgct cccaaccca	180
	ccgccgcgat aaccccaaag acaaggagac caacgcgggc ggtcggtgac attttagggg	240

	acttcttcac gcctactgga aggtcagtag cgttgctgta caccaaatca tcgtcattga	300
	tgttgtcagt ctgttttatg gtcacgatct ttactgtttt ctcttcgggt cgtttcaaag	360
	ccactatgcg tagaaacagc gggcagaaac agcgggcaga aactgtgtgc agaaatgcat	420
	gcagaaaaag gaaagttcgg ccagatgggt gtttctgtat gccgatgac ggatctttga	480
5	cagctgggta tgcgacaaat caccgagagt tgttaattct taacaatgga aaagtaacat	540
	tgagagatga ttatataccat cctgcacat ttagagtggg gctagtcata cccccataac	600
	cctagctgta cgcaatcgat ttcaaatcag ttggaaaaag tcaagaaaat taccgagac	660
	atatgcggct taaagtttg ctgccatgtg aatttttagc accctcaaca gttgagtgtc	720
	ggcactctcg agggtagagt gccaaatagg ttgtttgaca cacagttgtt caccgcgac	780
10	gacggctgtg ctggaaaccc acaaccggca cacacaaaat tttctcatg gccgttacct	840
	tgcgatgtc cacagggtag ctggtagttt gaaaatcaac gccgttgccc ttaggattca	900
	gtaactggca cttttgtaa tgcgctagat ctgtgtgtc agtcttcag gctgcttacc	960
	acagtgaag caaaaccaat tcgtggctgc gaaagtcgta gccaccagc agtccaggag	1020
	gacatacaat gccaaagtac gacaattcca atgctgacca gtggggcttt gaaaccgct	1080
15	ccattcacgc aggccagtca gtagacgcac agaccagcgc acgaaacctt ccgatctacc	1140
	aatccaccgc tttcgtgttc gactccgctg agcacgcaa gcagcgtttc gacttgagg	1200
	atctaggccc tgtttactcc cgctcacca acccaaccgt tgaggctttg gaaaaccgca	1260
	tcgtctccct cgaaggtggc gtccacgctg tagcgttctc ctccggacag gccgcaacca	1320
	ccaacgccat tttgaacctg gcaggagcgg gcgaccacat cgtcacctcc ccacgcctct	1380
20	acggtggcac cgagactcta ttcttatca ctcttaaccg cctgggtatc gatgtttcct	1440
	tcgtggaaaa ccccgacgac cctgagtcct ggcaggcagc cgttcagcca aacaccaaag	1500
	cattcttcgg cgagactttc gccaaaccac aggcagacgt cctggatatt cctgcggtgg	1560
	ctgaagttgc gcaccgcaac agcgttccac tgatcatcga caacaccatc gctaccgcag	1620
	cgctcgtgcg cccgctcgag ctgggcgcag acgttgctgt cgttccctc accaagttct	1680
25	acaccggcaa cggctccgga ctgggcggcg tgcttatcga cggcggaag ttcgattgga	1740
	ctgtcgaaaa ggatggaaag ccagtattcc cctacttcgt cactccagat gctgcttacc	1800
	acggattgaa gtacgcagac cttggtgcac cagccttcgg cctcaagggt cgcgttgccc	1860
	ttctacgca caccggtcc accctctccg cattcaacgc atgggctgca gtccagggca	1920
	tcgacaccct ttccctgcgc ctggagcgcc acaacgaaaa cgccatcaag gttgcagaat	1980
30	tcctcaacaa ccacgagaag gtggaaaagg ttaacttcgc aggcctgaag gattccccct	2040
	ggtacgcaac caaggaaaag cttggcctga agtacaccgg ctccgttctc accttcgaga	2100
	tcaaggcgcg caaggatgag gcttgggcat ttatcgacgc cctgaagcta cactccaacc	2160

	ttgcaaacat	cggcgatggt	cgctccctcg	ttgttcaccc	agcaaccacc	acccattcac	2220
	agtccgacga	agctggcctg	gcacgcgcgg	gcgttaccca	gtccaccgtc	cgcctgtccg	2280
	ttggcatcga	gaccattgat	gatatcatcg	ctgacctcga	aggcggcttt	gctgcaatct	2340
	agcactagtt	cggacctagg	gatatcgtcg	acatcgatgc	tcttctgcgt	taattaacaa	2400
5	ttgggatcct	ctagaccctg	gatttaaate	gctagcgggc	tgctaaagga	agcggaacac	2460
	gtagaaagcc	agtccgcaga	aacgggtgctg	accccgatg	aatgtcagct	actgggctat	2520
	ctggacaagg	gaaaacgcaa	gcgcaaagag	aaagcaggta	gcttgacgtg	ggcttacatg	2580
	gcgatagcta	gactgggcgg	ttttatggac	agcaagcgaa	ccggaattgc	cagctggggc	2640
	gccctctggt	aagggtggga	agccctgcaa	agtaaactgg	atggctttct	tgccgccaag	2700
10	gatctgatgg	cgcaggggat	caagatctga	tcaagagaca	ggatgaggat	cgtttcgcac	2760
	gattgaacaa	gatggattgc	acgcaggttc	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	2820
	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	2880
	gcaggggcgc	ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	2940
	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	3000
15	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	3060
	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	3120
	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	3180
	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	tcttgtcgat	caggatgatc	tggaacgaaga	3240
	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	gcgcaggctc	aaggcgcgca	tgcccgacgg	3300
20	cgaggatctc	gtcgtgaccc	atggcgatgc	ctgcttgccg	aatatcatgg	tggaaaatgg	3360
	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaccgct	atcaggacat	3420
	agcgttggct	acccgtgata	ttgctgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	accgcttctc	3480
	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccatttc	gcagcgcac	gccttctatc	gccttcttga	3540
	cgagttcttc	tgagcgggac	tctgggggtc	gaaatgaccg	accaagcgac	gccccacctg	3600
25	ccatcacgag	atttcgattc	caccgcgcgc	ttctatgaaa	ggttgggctt	cggaatcggt	3660
	ttccgggacg	ccggctggat	gatcctccag	cgcggggatc	tcatgctgga	gttcttcgcc	3720
	cacgctagcg	gcgcgcgggc	cggcccgggtg	tgaaataaccg	cacagatgcg	taaggagaaa	3780
	ataccgcac	aggcgtcttt	ccgcttcttc	gtcactgac	tcgctgcgct	cggctcgttcg	3840
	gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	ggcggtaata	cggttatcca	cagaatcagg	3900
30	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	3960
	ggccgcggtt	ctggcggttt	tccataggct	ccgccccct	gacgagcatc	acaaaaatcg	4020
	acgctcaagt	cagaggtggc	gaaacccgac	aggactataa	agataccagg	cgtttccccc	4080

	tggaagctcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	4140
	ctttctccct	tcggaagcg	tggcgcttcc	tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	4200
	ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	tgtgcacgaa	ccccccgttc	agcccgaccg	4260
	ctgcgcctta	tccggtaact	atcgtcttga	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	4320
5	actggcagca	gccactggta	acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	4380
	gttcttgaag	tgggtggccta	actacggcta	cactagaagg	acagtatttg	gtatctgcgc	4440
	tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	4500
	caccgctggt	agcggtggtt	tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	4560
	atctcaagaa	gatcctttga	tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtggg	acgaaaactc	4620
10	acgttaaggg	attttgggtca	tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tcctttttaa	4680
	ggccggccgc	ggccgccatc	ggcattttct	tttgcgtttt	tatttggtta	ctgttaattg	4740
	tccttgttca	aggatgctgt	ctttgacaac	agatgttttc	ttgcctttga	tgttcagcag	4800
	gaagctcggc	gcaaacgttg	attgtttgtc	tgcgtagaat	cctctgtttg	tcatatagct	4860
	tgtaatcacg	acattgtttc	ctttcgcttg	aggtacagcg	aagtgtgagt	aagtaaagg	4920
15	tacatcggtta	ggatcaagat	ccatttttaa	cacaaggcca	gttttgttca	gcggcttgta	4980
	tgggccagtt	aaagaattag	aaacataacc	aagcatgtaa	atacgttag	acgtaatgcc	5040
	gtcaatcgtc	atttttgatc	cgcgggagtc	agtgaacagg	taccatttgc	cgttcatttt	5100
	aaagacgttc	gcgcgttcaa	tttcatctgt	tactgtgtta	gatgcaatca	gcggtttcat	5160
	cacttttttc	agtgtgtaat	catcgtttag	ctcaatcata	cagagagcgc	cgtttgctaa	5220
20	ctcagccgtg	cgttttttat	cgctttgcag	aagtttttga	ctttcttgac	ggaagaatga	5280
	tgtgcttttg	ccatagtatg	ctttgtttaa	taaagattct	tcgccttggt	agccatcttc	5340
	agttccagtg	tttgcttcaa	atactaagta	tttgtggcct	ttatcttcta	cgtagtgagg	5400
	atctctcagc	gtatggttgt	cgctgagct	gtagtgcct	tcacgatga	actgctgtac	5460
	attttgatac	gtttttccgt	caccgtcaaa	gattgattta	taatcctcta	caccgttgat	5520
25	gttcaaagag	ctgtctgatg	ctgatacggt	aacttgtgca	gttgtcagtg	tttgtttgcc	5580
	gtaatgttta	ccggagaaat	cagtgtagaa	taaacggatt	tttccgtcag	atgtaaagt	5640
	ggctgaacct	gaccattctt	gtgtttggtc	ttttaggata	gaatcatttg	catcgaattt	5700
	gtcgtgtct	ttaaagacgc	ggccagcggt	tttccagctg	tcaatagaag	tttcgccgac	5760
	tttttgatag	aacatgtaaa	tcgatgtgtc	atccgcattt	ttaggatctc	cggtaatgc	5820
30	aaagacgatg	tggtagccgt	gatagtttgc	gacagtgccg	tcagcgtttt	gtaatggcca	5880
	gctgtcccaa	acgtccaggc	cttttgcaga	agagatattt	ttaattgtgg	acgaatcaaa	5940
	ttcagaaact	tgatatTTTT	catttttttg	ctgttcaggg	atttgcagca	tatcatggcg	6000

	tgtaatatgg gaaatgccgt atgtttcctt atatggcttt tggttcgttt ctttcgcaaa	6060
	cgcttgagtt gcgcctcctg ccagcagtg gcgtagtaaag gttaatactg ttgcttggtt	6120
	tgcaaaacttt ttgatgttca tcgttcatgt ctcttttttt atgtactgtg ttagcgggtct	6180
	gcttcttcca gccctcctgt ttgaagatgg caagttagtt acgcacaata aaaaaagacc	6240
5	taaaatatgt aaggggtgac gccaaagtat acactttgcc ctttacacat tttaggtctt	6300
	gcctgcttta tcagtaacaa acccgcgaga ttacttttc gacctattc tattagactc	6360
	tcgtttggat tgcaactggt ctattttcct cttttgtttg atagaaaatc ataaaaggat	6420
	ttgcagacta cgggcctaaa gaactaaaaa atctatctgt ttcttttcat tctctgtatt	6480
	ttttatagtt tctgttgcag gggcataaag ttgccttttt aatcacaatt cagaaaatat	6540
10	cataatatct catttcacta aataatagtg aacggcaggt atatgtgatg ggtaaaaaag	6600
	gatcggcggc cgctcgattt aaatc	6625
	<210> 29	
	<211> 363	
	<212> DNA	
15	<213> artificial	
	<220>	
	<223> promotor P497_P3119 = PgroES_PEFTU	
	<400> 29	
	cggtctaaag ttgggtgcc atgtgaattt ttagcaccct caacagttga gtgctggcac	60
20	tctcgagggg agagtgccaa atagggtggt tgacacacag ttgttcaccc gcgacgacgg	120
	ctgtgctgga aaccacacac cggcacacac aaaatttttc tcatggccgt taccctgcga	180
	atgtccacag ggtagctggt agtttgaaaa tcaacgccgt tgcccttagg attcagtaac	240
	tggcacattt tgtaatgcgc tagatctgtg tgctcagtct tccaggctgc ttatcacagt	300
	gaaagcaaaa ccaattcgtg gctgcgaaag tcgtagccac cacgaagtcc aggaggacat	360
25	aca	363
	<210> 30	
	<211> 6350	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
30	<220>	
	<223> Plasmideo pH491	
	<400> 30	

	tcgagctcgg	cgagacggtt	gtcgtcgctt	ccctcaccaa	gttctacacc	ggcaacggct	60
	ccggactggg	ggcggtgctt	atcgacggcg	gaaagttcga	ttggactgtc	gaaaaggatg	120
	gaaagccagt	attccccctac	ttcgtcactc	cagatgctgc	ttaccacgga	ttgaagtacg	180
	cagaccttgg	tgcaccagcc	ttcggcctca	aggttcgctg	tggccttcta	cgcgacaccg	240
5	gctccaccct	ctccgcattc	aacgcatggg	ctgcagtcca	gggcatcgac	accctttccc	300
	tgcgcctgga	gcgccacaac	gaaaacgcca	tcaaggttgc	agaattcctc	aacaaccacg	360
	agaagggtga	aaagggttaac	ttcgcaggcc	tgaaggattc	cccttggtac	gcaaccaagg	420
	aaaagcttgg	cctgaagtac	accggctccg	ttctcacctt	cgagatcaag	ggcggcaagg	480
	atgaggcttg	ggcattttatc	gacgccctga	agctacaactc	caaccttgca	aacatcggcg	540
10	atgttcgctc	cctcgttggt	caccagcaa	ccaccacca	ttcacagtcc	gacgaagctg	600
	gcctggcacg	cgcgggcggt	accagtgcca	ccgtccgcct	gtccgttggc	atcgagacca	660
	ttgatgatat	catcgctgac	ctcgaaggcg	gctttgctgc	aatctagcac	tagttcggac	720
	ctagggatat	cgctgagagc	tgccaattat	tccgggcttg	tgacccgcta	cccgataaat	780
	aggtcggctg	aaaaatttcg	ttgcaatata	aacaaaaagg	cctatcattg	ggaggtgtcg	840
15	caccaagtac	ttttgcgaag	cgccatctga	cggattttca	aaagatgtat	atgctcgggtg	900
	cggaaccta	cgaaaggatt	ttttacccat	gccaccctc	gcgccttcag	gtcaacttga	960
	aatccaagcg	atcggatgat	tctccaccga	agccggagca	atcattacaa	acgctgaaat	1020
	cgctatcac	cgctgggggtg	aataccgcgt	agataaagaa	ggacgcagca	atgtcgttct	1080
	catcgaacac	gccctcactg	gagattccaa	cgagccgat	tgggtgggctg	acttgctcgg	1140
20	tcccggcaaa	gccatcaaca	ctgatattta	ctgcgtgatc	tgtaccaacg	tcacgggtgg	1200
	ttgcaacggg	tccaccggac	ctggctccat	gcacccagat	ggaaatttct	gggtaaatcg	1260
	cttccccgcc	acgtccattc	gtgatcagg	aaacgccgaa	aaacaattcc	tcgacgcact	1320
	cggcatcacc	acggtcgccg	cagtacttgg	tgggtccatg	ggtggtgccc	gcaccctaga	1380
	gtgggccgca	atgtaccag	aaactgttgg	cgcagctgct	gttcttgacg	tttctgcacg	1440
25	cgccagcgcc	tggcaaatcg	gcattcaatc	cgcccaaatt	aaggcgattg	aaaacgacca	1500
	ccactggcac	gaaggcaact	actacgaatc	cggctgcaac	ccagccaccg	gactcggcgc	1560
	cgcccgacgc	atcgcccacc	tcacctaccg	tggcgaacta	gaaatcgacg	aacgcttcgg	1620
	caccaaagcc	caaaagaacg	aaaaccact	cggctccctac	cgcaagcccg	accagcgctt	1680
	cgcggtggaa	tcctacttgg	actaccaagc	agacaagcta	gtacagcggt	tcgacgcggg	1740
30	ctcctacgtc	ttgctcaccg	acgccctcaa	ccgccacgac	attggctcgcg	accgcggagg	1800
	cctcaacaag	gcactcgaat	ccatcaaagt	tccagtcctt	gtcgcaggcg	tagataccga	1860
	tattttgtac	ccctaccacc	agcaagaaca	cctctccaga	aacctgggaa	atctactggc	1920

	aatggcaaaa atcgtatccc ctgtcggcca cgatgctttc ctcaccgaaa gccgccaat	1980
	ggatcgcatac gtgaggaact tcttcagcct catctcccca gacgaagaca acccttcgac	2040
	ctacatcgag ttctacatct aacatatgac tagttcggac ctagggatat cgtcgacatc	2100
	gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg atcctctaga cccgggattt aaatcgctag	2160
5	cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc	2220
	ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga caagggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc	2280
	aggtagcttg cagtgggctt acatggcgat agctagactg ggcggtttta tggacagcaa	2340
	gcgaaccgga attgccagct ggggcgcctt ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa	2400
	actggatggc tttcttgccg ccaaggatct gatggcgag gggatcaaga tctgatcaag	2460
10	agacaggatg aggatcgttt cgcatacttg aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg	2520
	ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg	2580
	atgccgccgt gtccggctg tcagcgcagg ggcgcccggt tctttttgtc aagaccgacc	2640
	tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga	2700
	cgggcggttc ttgcgcagct gtgctcgacg ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc	2760
15	tattgggcga agtgccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag	2820
	tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgct tgatccggct acctgccc	2880
	tcgaccacca agcgaaacat cgcatacgagc gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg	2940
	tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca	3000
	ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt gacccatggc gatgcctgct	3060
20	tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg	3120
	gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg	3180
	gcggcgaaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc tttacggtat cgcgcgtccc gattcgcagc	3240
	gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat	3300
	gaccgaccaa gcgacgcca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta	3360
25	tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg	3420
	ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtgaa	3480
	taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg ctcttccgct tctcgtctca	3540
	ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg	3600
	taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc	3660
30	agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggtccgcc	3720
	cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac	3780
	tataagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc	3840

	tgccgcttac	cggataacctg	tccgcctttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	ctttctcata	3900
	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	3960
	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	4020
	acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	4080
5	cgaggatgt	aggcgggtgt	acagagttct	tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	4140
	gaaggacagt	atttggtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	4200
	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	4260
	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggt	4320
	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacgtt	aagggatttt	ggcatgaga	ttatcaaaaa	4380
10	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaaggccg	gccgcggccg	ccatcggcac	tttcttttgc	4440
	gtttttat	gttaactgtt	aattgtcctt	gttcaaggat	gctgtctttg	acaacagatg	4500
	ttttcttgcc	tttgatgttc	agcaggaagc	tcggcgcaaa	cgttgattgt	ttgtctgcgt	4560
	agaatcctct	gtttgtcata	tagcttgtaa	tcacgacatt	gtttcctttc	gcttgaggtg	4620
	cagcgaagtg	tgagtaagta	aaggttacat	cgtaggagtc	aagatccatt	tttaacacaa	4680
15	ggccagtttt	gttcagcggc	ttgtatgggc	cagttaaaga	attagaaaca	taaccaagca	4740
	tgtaaatatc	gttagacgta	atgccgtcaa	tcgtcatttt	tgatccgcgg	gagtcagtga	4800
	acaggtacca	tttgccgttc	attttaaaga	cgttcgcgcg	ttcaatttca	tctgttactg	4860
	tgtagatg	aatcagcgg	ttcatcactt	ttttcagtg	gtaatcatcg	tttagctcaa	4920
	tcataccgag	agcgccgttt	gctaactcag	ccgtgcgttt	tttatcgctt	tcgagaagtt	4980
20	tttgactttc	ttgacggaag	aatgatgtgc	ttttgccata	gtatgctttg	ttaaataaag	5040
	attcttcgcc	ttggtagcca	tcttcagttc	cagtgtttgc	ttcaaatact	aagtatttgt	5100
	ggcctttatc	ttctacgtag	tgaggatctc	tcagcgtatg	gttgctgcct	gagctgtagt	5160
	tgccttcac	gatgaactgc	tgtacatttt	gatacgtttt	tccgtcaccg	tcaaagattg	5220
	atttataatc	ctctacaccg	ttgatgttca	aagagctgtc	tgatgctgat	acgttaactt	5280
25	gtgcagttgt	cagtgtttgt	ttgccgtaat	gtttaccgga	gaaatcagtg	tagaataaac	5340
	ggatttttcc	gtcagatgta	aatgtggctg	aacctgacca	ttcttggtgt	tggtctttta	5400
	ggatagaatc	atttgcacg	aatttgtcgc	tgtctttaaa	gacgcggcca	gcgtttttcc	5460
	agctgtcaat	agaagtttcg	ccgacttttt	gatagaacat	gtaaatcgat	gtgtcatccg	5520
	catttttagg	atctccggct	aatgcaaaga	cgatgtggta	gccgtgatag	tttgcgacag	5580
30	tgccgtcagc	gttttgtaat	ggccagctgt	cccaaacgtc	caggcctttt	gcagaagaga	5640
	tatttttaat	tgtggacgaa	tcaaattcag	aaacttgata	tttttcattt	ttttgctggt	5700
	cagggatttg	cagcatatca	tggcgtgtaa	tatgggaaat	gccgtatggt	tccttatatg	5760

	gcttttggtt	cgtttctttc	gcaaacgctt	gagttgcgcc	tcctgccagc	agtgcggtag	5820
	taaagggttaa	tactgttgct	tgttttgcaa	actttttgat	gttcatcggt	catgtctcct	5880
	tttttatgta	ctgtgttagc	ggtctgcttc	ttccagccct	cctgtttgaa	gatggcaagt	5940
	tagttacgca	caataaaaaa	agacctaaaa	tatgtaaggg	gtgacgccaa	agtatacact	6000
5	ttgcccttta	cacatttttag	gtcttgcttg	ctttatcagt	aacaaacccg	cgcgatttac	6060
	ttttcgacct	cattctatta	gactctcggt	tggattgcaa	ctggtctatt	ttcctctttt	6120
	gtttgataga	aaatcataaa	aggatttgca	gactacgggc	ctaaagaact	aaaaaatcta	6180
	tctgtttctt	ttcattctct	gtatttttta	tagtttctgt	tgcattgggc	taaagttgcc	6240
	tttttaatca	caattcagaa	aatatcataa	tatctcattt	cactaaataa	tagtgaacgg	6300
10	caggtatatg	tgatgggtta	aaaaggatcg	gcggccgctc	gattttaaatac		6350
	<210>	31					
	<211>	5477					
	<212>	DNA					
	<213>	artificial					
15	<220>						
	<223>	Plasmideo pH429					
	<400>	31					
	tcgagctctc	caatctccac	tgaggtagctt	aatccttccg	gggaattcgg	gcgcttaaata	60
	cgagaaatta	ggccatcacc	ttttaataac	aatacaatga	ataattggaa	taggtcgaca	120
20	cctttggagc	ggagccggtt	aaaattggca	gcattcaccg	aaagaaaagg	agaaccacat	180
	gcttgcccta	ggttggatta	catggatcat	tattggtggt	ctagctgggt	ggattgcctc	240
	caagattaaa	ggcactgatg	ctcagcaagg	aattttgctg	aacatagtcg	tcggtattat	300
	cggtgggttg	ttaggcggct	ggctgcttgg	aatcttcgga	gtggatgttg	ccggtggcgg	360
	cttgatcttc	agcttcatca	catgtctgat	tgggtctgtc	attttgctga	cgatcgtgca	420
25	gttcttcaact	cggaagaagt	aatctgcttt	aaatccgtag	ggcctggtga	tatttcgata	480
	tcaacaggcc	ttttggatcat	tttgggggtg	aaaaagcgct	agacttgcct	gtggattaaa	540
	actatacgaa	ccggtttgtc	tatattgggtg	ttagacagtt	cgtcgtatct	tgaacagac	600
	caaccggaaa	ggacgtggcc	gaacgtggct	gctagctaat	ccttgatggt	ggacttgctg	660
	gatctcgatt	ggtccacaac	atcagtcctc	ttgagacggc	tcgcgatttg	gctcggcagt	720
30	tgttgtcggc	tccacctgcg	gactactcaa	tttagtttct	tcattttccg	aaggggtatc	780
	ttcgttgggg	gaggcgctga	taagcccctt	cttttttagct	ttaacctcag	cgcgacgctg	840
	ctttaagcgc	tgcatggcgg	cgcggttcat	ttcacgttgc	gtttcgcgcc	tcttgttcgc	900

	gattttctttg	cgggcctggt	ttgcttcggt	gatttcggca	gtacggggtt	tggtgagttc	960
	cacgttttgt	gcgtgaagcg	ttgaggcggt	ccatgggggtg	agaatcatca	gggcgcgggt	1020
	tttgcgctcg	gtccacagga	agatgcgctt	ttctttttgt	tttgcgcggt	agatgtcgcg	1080
	ctgctctagg	tggtgcactt	tgaaatcgtc	ggtaagtggg	tatttgcggt	ccaaaatgac	1140
5	catcatgatg	attgttttga	ggagcggtcca	cagggttggtg	ctgacgcgtc	atatgactag	1200
	ttcggaccta	gggatatcgt	cgacatcgat	gctcttctgc	gttaattaac	aattgggatc	1260
	ctctagaccc	gggatttaaa	tcgctagcgg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaaag	1320
	ccagtccgca	gaaacgggtg	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	1380
	gggaaaacgc	aagcgcaaag	agaaagcagg	tagcttgtag	tgggcttaca	tggcgatagc	1440
10	tagactgggc	ggttttatgg	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	1500
	gtaagggttg	gaagccctgc	aaagtaaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	1560
	ggcgagggg	atcaagatct	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	1620
	aagatggatt	gcacgcaggt	tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	1680
	gggcacaaca	gacaatcggc	tgctctgatg	cgcgcgtgtt	ccggctgtca	gcgcaggggc	1740
15	gcccggttct	ttttgtcaag	accgacctgt	cgggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	1800
	cagcgcggt	atcggtggctg	gccacgacgg	gcgttccttg	cgcagctgtg	ctcgacgttg	1860
	tcactgaagc	gggaaggagc	tggtgcttat	tgggcgaagt	gccggggcag	gatctcctgt	1920
	catctcacct	tgctcctgcc	gagaaagtat	ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggtgtc	1980
	atacgcttga	tccggctacc	tgcccattcg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	2040
20	cacgtactcg	gatggaagcc	ggtcttgctg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	2100
	ggctcgcgcc	agccgaactg	ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccgac	ggcgaggatc	2160
	tcgtcgtgac	ccatggcgat	gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaat	ggccgctttt	2220
	ctggattcat	cgactgtggc	cggctgggtg	tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	2280
	ctacccgtga	tattgctgaa	gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	2340
25	acggtatcgc	cgctcccgat	tcgcagcgca	tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	2400
	tctgagcggg	actctggggg	tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccaacc	tgccatcacg	2460
	agatttcgat	tccaccgccg	ccttctatga	aagggtgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	2520
	cgccggctgg	atgatcctcc	agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccacgctag	2580
	cggcgcgccg	gccggccccg	tgtgaaatac	cgcacagatg	cgtaaggaga	aaataccgca	2640
30	tcaggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgctgcg	ctcggtcggt	cggctgcggc	2700
	gagcggtatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacggttatc	cacagaatca	ggggataacg	2760
	caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	2820

	tgctggcggtt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	2880
	gtcagagggtg	gcgaaacccg	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	2940
	ccctcgtgcg	ctctcctggt	ccgaccctgc	cgcttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	3000
	cttcgggaag	cggtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	tcggtgtagg	3060
5	tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aaccccccg	tcagcccgac	cgctgcgcct	3120
	tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	3180
	cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	cggtgctaca	gagttcttga	3240
	agtggtagcc	taactacggc	tacactagaa	ggacagtatt	tggtagctgc	gctctgctga	3300
	agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaacia	accaccgctg	3360
10	gtagcggtgg	tttttttgtt	tgcaagcagc	agattacgcg	cagaaaaaaaa	ggatctcaag	3420
	aagatccttt	gatcttttct	acgggggtctg	acgctcagtg	gaacgaaaac	tcacgttaag	3480
	ggatttttgt	catgagatta	tcaaaaagga	tcttcaccta	gatcctttta	aaggccggcc	3540
	gcggccgcca	tcggcatttt	cttttgcggt	tttatttggt	aactgttaat	tgtccttggt	3600
	caaggatgct	gtctttgaca	acagatgttt	tcttgccctt	gatgttcagc	aggaagctcg	3660
15	gcgcaaacgt	tgattgtttg	tctgcgtaga	atcctctggt	tgtcatatag	cttghtaatca	3720
	cgacattggt	tccttttcgct	tgaggtagag	cgaagtgtga	gtaagtaaag	gttacatcgt	3780
	taggatcaag	atccattttt	aacacaaggc	cagttttgtt	cagcggcttg	tatgggccag	3840
	ttaaagaatt	agaaacataa	ccaagcatgt	aaatatcggt	agacgtaatg	ccgtcaatcg	3900
	tcatttttga	tccgcgggag	tcagtgaaca	ggtaccattt	gccgttcatt	ttaaagacgt	3960
20	tcgcgcgttc	aatttcatct	gttactgtgt	tagatgcaat	cagcggtttc	atcacttttt	4020
	tcagtgtgta	atcatcgttt	agctcaatca	taccgagagc	gccgtttgct	aactcagccg	4080
	tgcgtttttt	atcgctttgc	agaagttttt	gactttcttg	acggaagaat	gatgtgcttt	4140
	tgccatagta	tgctttgtta	aataaagatt	cttcgccttg	gtagccatct	tcagttccag	4200
	tgtttgcttc	aaatactaag	tatttggtgg	ctttatcttc	tacgtagtga	ggatctctca	4260
25	gcgtatgggt	gtcgcctgag	ctgtagttgc	cttcacgat	gaactgctgt	acattttgat	4320
	acgtttttcc	gtcaccgtca	aagattgatt	tataatcctc	tacaccgttg	atgttcaaag	4380
	agctgtctga	tgctgatacg	ttaacttggt	cagttgtcag	tgtttggttg	ccgtaatggt	4440
	taccggagaa	atcagtgtag	aataaacgga	tttttccgtc	agatgtaaat	gtggctgaac	4500
	ctgaccattc	ttgtgtttgg	tcttttagga	tagaatcatt	tgcatcgaat	ttgtcgctgt	4560
30	ctttaaagac	gcggccagcg	tttttccagc	tgtcaataga	agtttcgccg	actttttgat	4620
	agaacatgta	aatcgatgtg	tcacccgcat	ttttaggata	tccggctaata	gcaaagacga	4680
	tgtggtagcc	gtgatagttt	gcgacagtgc	cgtcagcggt	ttgtaatggc	cagctgtccc	4740

	aaacgtccag gccttttgca gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa	4800
	cttgatattt ttcatttttt tgctgttcag ggatttgcag catatcatgg cgtgtaatat	4860
	gggaaatgcc gtatgtttcc ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag	4920
	ttgcgccctc tgccagcagt gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact	4980
5	ttttgatgtt catcgttcat gtctcctttt ttatgtactg tgtagcggt ctgcttcttc	5040
	cagccctcct gtttgaagat ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaga cctaaaatat	5100
	gtaaggggtg acgccaaagt atacactttg ccctttacac atttttaggtc ttgcctgctt	5160
	tatcagtaac aaaccgcgc gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttgg	5220
	attgcaactg gtctattttc ctcttttggt tgatagaaaa tcataaaagg atttgagac	5280
10	tacgggccta aagaactaaa aaatctatct gtttcttttc attctctgta ttttttatag	5340
	tttctgttgc atgggcataa agttgccttt ttaatcacia ttcagaaaat atcataatat	5400
	ctcatttcac taaataatag tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg	5460
	gccgctcgat ttaaate	5477
	<210> 32	
15	<211> 5697	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Plasmideo pH449	
20	<400> 32	
	tcgaggcgtc ttccggtgtc atggttgaac cgaattccag cacaatattt tccggtttaa	60
	agcaatcgat cacatagtcg attttgtcca accactgaaa acctgcaagg accaccaat	120
	cccctgcagc atgttcagca accattggca gcggcgata gcgaacttcc cccttttctc	180
	ccgttgccat tttcgctca ctgatcaggt gactgagctt tttgtagcct tccggatttt	240
25	tacacaagac tgtcaacacg ctttcttgca gactcagctc cgcaccataa acggtatgca	300
	ttccagcttc cgcggcagct tccgcaaate tcaactgcacc ataaaaacca tccctatcca	360
	tgactgatag agcaacaagt cctaactttt tggcctgcac aaccacatca gacggatccg	420
	atgcgccagt gagaaagtta taactgctgg tggcatgcag ctcgcaaaa ggaaccgacg	480
	cttccccctg catggcagat gaaggcgct gcgcatccgg ctcatgcagc accggacgca	540
30	gagattcgac ctttttacct gagaggattc tttccaattt ggaccacgat aatggcctgc	600
	cgttaaagct tccccgccca ttccattcca taatgatagg atacattttt agaacaaatt	660
	ttccaataag ttttcacgc cagccggaga aggaaataga ccaagctgta cagatcgacg	720

	cgctcctggct	gagtacaacg	tcggctccgg	cgcagacctc	accccagttg	gctccagcga	780
	aatcgtgcca	ctggcactat	tctggaagga	ccacgactcc	atcgacggca	ttgacggcga	840
	gtccgttgcc	atccctaacg	atccttccaa	ccagggccgc	gccatcaacg	ttctcgttca	900
	ggcaggtctg	gtcaccctga	agaccccagg	tctggtcacc	ccagctccag	tcgatatcga	960
5	cgaggcagct	tccaaggttt	ccgtcatccc	agtcgacgca	gctcaggcac	caaccgctta	1020
	ccaggagggt	cgcccagcga	tcatacaaaa	ctccttcctt	gaccgcgcag	gcatacgatcc	1080
	aaacctcgcg	gtcttcgaag	atgatcctga	gtctgaagaa	gcagagccat	acatacaacgt	1140
	cttcgtcacc	aaggctgagg	acaaggacga	tgccaacatc	gcccgcctcg	ttgagctgtg	1200
	gcacgaccca	gaggttcttg	ctgcagtaga	ccgcgactct	gagggcacct	ccgtcccagt	1260
10	tgatcgtcca	ggagctgacc	ttcaggaaat	ccttgatcgc	cttgaggctg	atcaggaaaa	1320
	cgcataatct	cttttgagtt	ctttgcatac	ccatgtgcag	atttctttgc	acaatcacag	1380
	cctgaaaatc	agactgtgaa	cttcaaacgc	atatgactag	ttcggaccta	gggatatcgt	1440
	cgacatcgat	gctcttctgc	gttaattaac	aattgggatc	ctctagacct	gggatttaaa	1500
	tcgctagcgg	gctgctaaag	gaagcggaac	acgtagaaaag	ccagtccgca	gaaacggtgc	1560
15	tgaccccgga	tgaatgtcag	ctactgggct	atctggacaa	gggaaaacgc	aagcgcaaag	1620
	agaaagcagg	tagcttgtag	tgggcttaca	tggcgatagc	tagactgggc	ggttttatgg	1680
	acagcaagcg	aaccggaatt	gccagctggg	gcgccctctg	gtaagggttg	gaagccctgc	1740
	aaagtaaact	ggatggcttt	cttgccgcca	aggatctgat	ggcgagggg	atcaagatct	1800
	gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttctg	atgattgaac	aagatggatt	gcacgcaggt	1860
20	tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	gacaatcggc	1920
	tgctctgatg	ccgccgtggt	ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccggttct	ttttgtcaag	1980
	accgacctgt	ccggtgccct	gaatgaactg	caggacgagg	cagcgcggtc	atcgtggctg	2040
	gccacgacgg	gcgttccttg	cgcagctgtg	ctcgacgttg	tactgaagc	gggaagggac	2100
	tggtgctat	tgggcgaaat	gccggggcag	gatctcctgt	catctcacct	tgctcctgcc	2160
25	gagaaagtat	ccatcatggc	tgatgcaatg	cggcggtctg	atacgcttga	tccggctacc	2220
	tgcccatctg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	cacgtactcg	gatggaagcc	2280
	ggtcttctgc	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	agccgaactg	2340
	ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccgcg	ggcgaggatc	tcgtcgtgac	ccatggcgat	2400
	gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaaa	ggccgctttt	ctggattcat	cgactgtggc	2460
30	cggctgggtg	tgccggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	ctaccctgta	tattgctgaa	2520
	gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	acggtatcgc	cgctcccgat	2580
	tcgcagcgca	tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	tctgagcggg	actctggggg	2640

	tcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg agatttcgat tccaccgccg	2700
	ccttctatga aagggttgggc ttcggaatcg ttttccggga cgccggctgg atgatcctcc	2760
	agcgcgggga tctcatgctg gagttcttcg cccacgctag cggcgcgcgc gccggcccg	2820
	tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataaccgca tcaggcgctc ttccgcttcc	2880
5	tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcggtatc agctcactca	2940
	aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca	3000
	aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg	3060
	ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggt gcgaaacccg	3120
	acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgctgc ctctcctggt	3180
10	ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcggaag cgtggcgctt	3240
	tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc	3300
	tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt	3360
	gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt	3420
	agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga agtggtggcc taactacggc	3480
15	tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgtga agccagttac cttcgaaaa	3540
	agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttggt	3600
	tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct	3660
	acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaaac tcacgttaag ggatttttgt catgagatta	3720
	tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aaggccggcc gcggccgcca tcggcatttt	3780
20	cttttgcggt tttatttggt aactgttaat tgtccttggt caaggatgct gtctttgaca	3840
	acagatgttt tcttgcttt gatgttcagc aggaagctcg gcgcaaactg tgattgtttg	3900
	tctgcgtaga atcctctggt tgtcatatag cttgtaatca cgacattggt tcctttcgct	3960
	tgaggtagag cgaagtgtga gtaagtaaag gttacatcgt taggatcaag atccattttt	4020
	aacacaaggc cagtttttgt cagcggcttg tatgggccag ttaaagaatt agaaacataa	4080
25	ccaagcatgt aaatatcggt agacgtaatg ccgtcaatcg tcatttttga tccgcgggag	4140
	tcagtgaaca ggtaccattt gccgttcatt ttaaagacgt tcgcgcgttc aatttcactc	4200
	gttactgtgt tagatgcaat cagcggtttc atcacttttt tcagtgtgta atcatcggtt	4260
	agctcaatca taccgagagc gccgtttgct aactcagccg tgcgtttttt atcgctttgc	4320
	agaagttttt gactttcttg acggaagaat gatgtgcttt tgccatagta tgctttgtta	4380
30	aataaagatt cttgcgcttg gtagccatct tcagttccag tgtttgcttc aaataactaag	4440
	tatttggtggc ctttatcttc tacgtagtga ggatctctca gcgtatgggt gtcgcctgag	4500
	ctgtagttgc cttcatcgat gaactgctgt acattttgat acgtttttcc gtcaccgtca	4560

	aagattgatt tataatcctc tacaccgttg atgttcaaag agctgtctga tgctgatacg	4620
	ttaacttgty cagttgtcag tgtttgtttg ccgtaatggt taccggagaa atcagtgtag	4680
	aataaacgga tttttccgtc agatgtaaat gtggctgaac ctgaccattc ttgtgttttg	4740
	tcttttagga tagaatcatt tgcacgaat ttgtcgctgt ctttaaagac gcggccagcg	4800
5	ttttccagc tgtcaataga agtttcgccg actttttgat agaacatgta aatcgatgtg	4860
	tcacccgcat ttttaggac tccggctaata gcaaagacga tgtggtagcc gtgatagttt	4920
	gcgacagtgc cgtcagcgtt ttgtaatggc cagctgtccc aaacgtccag gccttttgca	4980
	gaagagatat ttttaattgt ggacgaatca aattcagaaa cttgatattt ttcatttttt	5040
	tgctgttcag ggatttgcag catatcatgg cgtgtaatat gggaaatgcc gtatgtttcc	5100
10	ttatatggct tttggttcgt ttctttcgca aacgcttgag ttgcgcctcc tgccagcagt	5160
	gcggtagtaa aggttaatac tgttgcttgt tttgcaaact ttttgatggt catcgttcat	5220
	gtctcctttt ttatgtactg tgttagcggc ctgcttcttc cagccctcct gtttgaagat	5280
	ggcaagttag ttacgcacaa taaaaaaga cctaaaatat gtaaggggtg acgccaaagt	5340
	atacactttg ccctttacac attttaggtc ttgcctgctt tatcagtaac aaaccgcgc	5400
15	gatttacttt tcgacctcat tctattagac tctcgtttgg attgcaactg gtctattttc	5460
	ctcttttggt tgatagaaaa tcataaaagg atttgcagac tacgggccta aagaactaaa	5520
	aaatctatct gtttcttttc attctctgta ttttttatag tttctgttgc atgggcataa	5580
	agttgccttt ttaatcacia ttcagaaaat atcataatat ctcatttcac taaataatag	5640
	tgaacggcag gtatatgtga tgggttaaaa aggatcggcg gccgctcgat ttaaatac	5697
20	<210> 33	
	<211> 7318	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<223> Plasmideo pOM427	
	<400> 33	
	ggccgctcga tttaaactc gagctctgga gtgcgacagg tttgatgata aaaaattagc	60
	gcaagaagac aaaaatcacc ttgcgctaata gctctgttac aggtcactaa taccatctaa	120
	gtagttgatt catagtgact gcatatgtaa gtatttcctt agataacaat tgattgaatg	180
30	tatgcaaata aatgcataca ccataggtgt ggtttaattt gatgcccttt ttcagggctg	240
	gaatgtgtaa gagcgggggtt atttatgctg ttgttttttt gttactcggg aagggcttta	300
	cctcttccgc ataaacgctt ccatcagcgt ttatagttaa aaaaatcttt cgggggggatg	360

	gggagtaagc ttgtgttatc cgctcgggcc caatccgcaa gctccaccga ctcgttggcg	420
	tgcgactcta gataaatatc aagcagctgg ccgccaataa cctcagtacg catgccacgc	480
	caagcatccc tcgtgcgggc caatgcctct gcactcaaac cggaatcctg cagcatgtct	540
	tctgccaca ccaatgccat atcgccagcc aaaatcgaga ctgaaacgcc aaagtgtctg	600
5	ggatcgcctt cgaaattatt ggcgcggtga tcagcttcca cagcccgggtg aactgtgggg	660
	gctccgcgcc gggatcaga agaatcgata atatcgtcac gaatcaaggc acaagcctgg	720
	atgaattcga gactcgctgc ggcgtcaagg acggactcaa gtttttcaga agaattctta	780
	tggccttgcg ccgccaggaa accagcccac gcataaagag gacggattcg ctttcctcca	840
	ttgagcacga aactgcgaag atgggccaca gcatctgtga caggagcgcc gatatcagca	900
10	attgttagct cttgagcatc gaggaactgc gtcaaacgat ctgcacgac ctccggaaat	960
	ttgtcgaggt caaggtcacg ggcacgaaa ctgctcaagg agacgtcctt caatcgaata	1020
	gggggatgcy ggctgaattt tgggtggaggt gaataaatgc cagaggcagt cccaacaaaa	1080
	cactctcatc acactaagat acccgtcgac tcatacgtta aatctatcac cgcaagggat	1140
	aaatatctaa caccgtgcgt gttgactatt ttacctctgg cgggtgataat ggttgcacgt	1200
15	actaaggagg attaatatt gtccctaacg aacatcccag cctcatctca atgggcaatt	1260
	agcgacgttt tgaagcgctc ttcacccggc cgagtacctt tttctgtcga gtttatgcc	1320
	ccccgcgacg atgcagctga agagcgtctt taccgcgcag cagaggctct ccatgacctc	1380
	ggtgcacgtt ttgtctccgt gacttatggt gctggcggat caaccgctga gagaacctca	1440
	cgtattgctc gacgattagc gaaacaaccg ttgaccactc tgggtgcacct gaccctgggt	1500
20	aaccacactc gcgaagagat gaaggcaatt cttcggaat acctagagct gggattaaca	1560
	aacctgttgg cgcttcgagg agatccgctt ggagacccat taggcgattg ggtgagcacc	1620
	gatggaggac tgaactatgc ctctgagctc atcgatctta ttaagtccac tcctgagttc	1680
	cgggaattcg acctcggtat cgctccttc cccgaagggc atttccgggc gaaaactcta	1740
	gaagaagaca ccaatacac tctggcgaag ctgcgtggag gggcagagta ctccatcacg	1800
25	cagatgttct ttgatgtgga agactacctg cgacttcgtg atcgccggat cctgttttgg	1860
	cggatgagag aagattttca gcctgataca gattaaatca gaacgcagaa gcggtctgat	1920
	aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc ggtggtccca cctgaccca tgccgaactc	1980
	agaagtgaac cgccgtagcg ccgatggtag tgtggggtct ccccatgcga gagtagggaa	2040
	ctgccaggca tcaataaaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct	2100
30	gttgtttgtc ggtgaacgct ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg gatattgaacg	2160
	ttgcgaagca acggcccga ggggggggg caggacgccc gccataaact gccaggcatc	2220
	aaattaagca gaaggccatc ctgacggatg gcctttttgc gtttctacaa actcttggtg	2280

	cggtgatttaa atgatccgct agcgggctgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt	2340
	ccgcagaaaac ggtgctgacc ccggatgaat gtcagctact gggctatctg gacaagggaa	2400
	aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac	2460
	tgggcggttt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctggtaag	2520
5	gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc	2580
	aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat	2640
	ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagaggc tattcggtca tgactgggca	2700
	caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgccc	2760
	gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg	2820
10	cggtatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgtcact	2880
	gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct	2940
	caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg	3000
	cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcga gcgagcacgt	3060
	actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc	3120
15	gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc	3180
	gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga	3240
	ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggctacc	3300
	cgatgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggt	3360
	atcgccgctc ccgattcgca gcgcacgcgc ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga	3420
20	gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt	3480
	tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg aatcgttttc cgggacgccg	3540
	gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt cttcgccac gctagcggcg	3600
	cgccacgggt gcgcatgatc gtgctcctgt cgttgaggac ccggctaggc tggcgggggt	3660
	gccttactgg ttagcagaat gaatcaccga tacgcgagcg aacgtgaagc gactgctgct	3720
25	gcaaaacgtc tgcgacctga gcaacaacat gaatggtctt cggtttccgt gtttcgtaaa	3780
	gtctggaaac gcggaagtca gcgccctgca ccattatggt ccgcatctgc atcgaggat	3840
	gctgctggct accctgtgga acacctacat ctgtattaac gaagcgctgg cattgacct	3900
	gagtgatattt tctctgttcc cgccgcatcc ataccgccag ttgtttaccc tcacaacggt	3960
	ccagtaaccg ggcattgtca tcatcagtaa cccgtatcgt gagcatcctc tctcgtttca	4020
30	tcggtatcat taccctcatg aacagaaatc ccccttacac ggaggcatca gtgaccaaac	4080
	aggaaaaaac cgcccttaac atggcccgtt ttatcagaag ccagacatta acgcttctgg	4140
	agaaactcaa cgagctggac gcggatgaac aggagacat ctgtgaatcg cttcacgacc	4200

	acgctgatga gctttaccgc agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggg gaaaacctct	4260
	gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac	4320
	aagcccgtca gggcgcgtca gcggtgttg gcggtgtcg gggcgcagcc atgacctcagt	4380
	cacgtagcga tagcggagtg tatactggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact	4440
5	gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat	4500
	caggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg	4560
	agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc	4620
	aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt	4680
	gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag	4740
10	tcagaggtgg cgaaaccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc	4800
	cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg ctttctccc	4860
	ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt	4920
	cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt	4980
	atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc	5040
15	agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa	5100
	gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa	5160
	gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg	5220
	tagcggtggt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga	5280
	agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg	5340
20	gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa aggccggccg	5400
	cggccgccat cggcattttc ttttgcgttt ttatttggtta actgttaatt gtccttgttc	5460
	aaggatgctg tctttgacaa cagatgtttt cttgcctttg atgttcagca ggaagctcgg	5520
	cgcaaacggt gattgtttgt ctgcgtagaa tcctctgttt gtcatatagc ttgtaatcac	5580
	gacattgttt ctttcgctt gaggtacagc gaagtgtgag taagtaaagg ttacatcggt	5640
25	aggatcaaga tccattttta acacaaggcc agttttgttc agcggcttgt atgggccagt	5700
	taaagaatta gaaacataac caagcatgta aatatcgta gacgtaatgc cgtcaatcgt	5760
	catttttgat ccgcgggagt cagtgaacag gtaccatttg ccgttcattt taaagacggt	5820
	cgcgcgttca atttcactctg ttactgtgtt agatgcaatc agcggtttca tcaacttttt	5880
	cagtgtgtaa tcatcgttta gctcaatcat accgagagcg ccgtttgcta actcagccgt	5940
30	gcgtttttta tcgctttgca gaagtttttg actttcttga cggaagaatg atgtgctttt	6000
	gccatagtat gctttgttaa ataaagattc ttcgccttgg tagccatctt cagttccagt	6060
	gtttgcttca aataactaagt atttgtggcc tttatcttct acgtagtgag gatctctcag	6120

	cgatatggttg tcgcctgagc tgtagttgcc ttcacgatg aactgctgta cattttgata	6180
	cgtttttccg tcaccgtcaa agattgattt ataatcctct acaccgttga tgttcaaaga	6240
	gctgtctgat gctgatacgt taacttgtgc agttgtcagt gtttgtttgc cgtaatgttt	6300
	accggagaaaa tcagtgtaga ataaacggat ttttccgtca gatgtaaattg tggctgaacc	6360
5	tgaccattct tgtgttttgt ctttttaggat agaattcattt gcatcgaatt tgtcgtgtgc	6420
	tttaaagacg cggccagcgt ttttccagct gtcaatagaa gtttcgccga ctttttgata	6480
	gaacatgtaa atcgatgtgt catccgcatt tttaggatct cgggctaattg caaagacgat	6540
	gtggtagccg tgatagtttg cgacagtgcc gtcagcgttt tgtaattggc agctgtccca	6600
	aacgtccagg ctttttgtag aagagatatt tttaattgtg gacgaatcaa attcagaaac	6660
10	ttgatatttt tcattttttt gctgttcagg gatttgcagc atatcatggc gtgtaatatg	6720
	ggaaatgccg tatgtttcct tatatggctt ttggttcggt tctttcgcaa acgcttgagt	6780
	tgcgccctct gccagcagtg cggtagtaaa ggtaataact gttgcttggt ttgcaaactt	6840
	tttgatgttc atcgttcatg tctccttttt tatgtactgt gttagcggtc tgcttcttcc	6900
	agccctcctg tttgaagatg gcaagttagt tacgcacaat aaaaaaagac ctaaaatatg	6960
15	taaggggtga cgccaaagta tacactttgc cctttacaca ttttaggtct tgcctgcttt	7020
	atcagtaaca aaccgcgcg atttactttt cgacctcatt ctattagact ctcgtttgga	7080
	ttgcaactgg tctattttcc tcttttggtt gatagaaaat cataaaagga tttgcagact	7140
	acgggcctaa agaactaaaa aatctatctg tttcttttca ttctctgtat tttttatagt	7200
	ttctgttgca tgggcataaa gttgcctttt taatcacaat tcagaaaata tcataatatc	7260
20	tcattttcact aaataatagt gaacggcagg tatatgtgat ggggttaaaaa ggatcggc	7318
	<210> 34	
	<211> 5715	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> Plasmideo pCLIK5APsodTKT	
	<400> 34	
	cgcgtcggca aattagtcga atgaagttaa ttaaaagttc ccgaatcaat ctttttaattg	60
	ttttcaaacc atttgaaggt gtgctgacct aggtggacgc caacctttaa aaagcttcag	120
30	acttttattt ccacttcata aaaactgcct gtgacgattc cgttaaagat tgtgccaaat	180
	cactgcgcaa aactcgcgcg gaaccagacc ttgccatgct atcgccattt cacactattt	240
	gagtaatcgg aaatagatgg gtgtagacgc ttgattggcg gacggttcac agcggacgat	300

	ttcaggccct	cgtagctcga	gagtttgaag	gggtccgatt	cgttccgttc	gtgacgcttt	360
	gtgagggttt	ttgacgttgc	accgtattgc	ttgccgaaca	tttttctttt	cctttcgggt	420
	tttcgagaat	tttcacctac	aaaagcccac	gtcacagctc	ccagacttaa	gattgatcac	480
	acctttgaca	catttgaacc	acagttgggt	ataaaatggg	ttcaacatca	ctatgggttag	540
5	aggtgttgac	gggtcagatt	aagcaaagac	tactttcggg	gtagatcacc	tttgccaaat	600
	ttgaaccaat	taacctaat	cgtagatctg	atcatcggat	ctaacgaaaa	cgaacccaaa	660
	ccttggtccc	ggtttaaccc	aggaaggata	gctgccaat	attccgggct	tgtgacccgc	720
	tacccgataa	ataggtcggc	tgaaaaat	cgttgcaata	tcaacaaaaa	ggcctatcat	780
	tgggaggtgt	cgcaccaagt	acttttgcca	agcgccatct	gacggatttt	caaaagatgt	840
10	atatgctcgg	tgcggaaacc	tacgaaagga	ttttttaccc	ttgaccacct	tgacgctgtc	900
	acctgaactt	caggcgctca	ctgtacgcaa	ttaccctct	gattgggtccg	atgtggacac	960
	caaggctgta	gacactgttc	gtgtcctcgc	tgacagcgt	gtagaaaact	gtggctccgg	1020
	ccaccaggc	accgcaatga	gcctggctcc	ccttgcatat	accttgatcc	agcgggttat	1080
	gaacgtagat	ccacaggaca	ccaactgggc	aggccgtgac	cgcttcgttc	tttcttgttg	1140
15	ccactcctct	ttgaccaggt	acatccagct	ttacttgggt	ggattcggcc	ttgagatgga	1200
	tgacctgaag	gctctgcgca	cctgggattc	cttgaccca	ggacaccctg	agtaccgcca	1260
	caccaagggc	gttgagatca	ccactggccc	tcttgccag	ggtcttgcat	ctgcagttgg	1320
	tatggccatg	gctgctcgtc	gtgagcgtgg	cctattcgac	ccaaccgctg	ctgagggcga	1380
	atccccattc	gaccaccaca	tctacgtcat	tgcttctgat	gggtcgacat	cgatgctctt	1440
20	ctgcgttaat	taacaattgg	gatcctctag	accggggatt	taaatgatcc	gtagcggggc	1500
	tgctaaagga	agcggaaacac	gtagaaagcc	agtccgcaga	aacgggtgctg	accccggtatg	1560
	aatgtcagct	actgggctat	ctggacaagg	gaaaacgcaa	gcgcaaagag	aaagcaggta	1620
	gcttgacgtg	ggcttacatg	gcgatagcta	gactgggcgg	ttttatggac	agcaagcgaa	1680
	ccggaattgc	cagctggggc	gccctctggt	aagggtggga	agccctgcaa	agtaaaactgg	1740
25	atggctttct	tgccgccaaag	gatctgatgg	cgcaggggat	caagatctga	tcaagagaca	1800
	ggatgaggat	cgtttcgcat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcagggtc	tccggccgct	1860
	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	ctctgatgcc	1920
	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	cgggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	1980
	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	2040
30	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgct	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	2100
	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	gaaagtatcc	2160
	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggctacctg	ccattcgcac	2220

	caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgatcgat	2280
	caggatgatac tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcccag ccgaactgtt cgccaggctc	2340
	aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg	2400
	aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg	2460
5	gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc	2520
	gaatgggctg accgcttctt cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcatc	2580
	gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac tctgggggttc gaaatgaccg	2640
	accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc caccgccgcc ttctatgaaa	2700
	ggttgggctt cggaatcggt ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggatc	2760
10	tcatgctgga gttcttcgcc cacgctagcg gcgcgccggc cgccccggtg tgaaataccg	2820
	cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatac aggcgctctt ccgcttcttc gctcactgac	2880
	tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga gcggtatcag ctactcaaa ggcggtata	2940
	cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa	3000
	aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct	3060
15	gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa	3120
	agataccagg cgtttccccc tggaaactcc ctgcgtgcgt ctctgttcc gaccctgccg	3180
	cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcatagctca	3240
	cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca agctgggctg tgtgcacgaa	3300
	cccccgctc agcccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg	3360
20	gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg	3420
	tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtggcta actacggcta cactagaagg	3480
	acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttgtagc	3540
	tcttgatccg gcaaacaaac caccgctggg agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag	3600
	attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac	3660
25	gctcagtggg acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc	3720
	ttcacctaga tcctttttaa ggccggccgc ggccgccatc ggcattttct tttgcgtttt	3780
	tatttgtaa ctgttaattg tccttgttca aggatgctgt ctttgacaac agatgttttc	3840
	ttgcctttga tgttcagcag gaagctcggc gcaaacgttg attgtttgtc tgcgtagaat	3900
	cctctgtttg tcatatagct tgtaatcacg acattgtttc ctttcgcttg aggtacagcg	3960
30	aagtgtgagt aagtaaaggc tacatcgtaa ggatcaagat ccatttttaa cacaaggcca	4020
	gttttgttca gcggcttgta tgggccagtt aaagaattag aaacataacc aagcatgtaa	4080
	atatcgttag acgtaatgcc gtcaatcgtc atttttgatc cgcgggagtc agtgaacagg	4140

	taccatttgc	cgttcatttt	aaagacgttc	gcgcgttcaa	tttcatctgt	tactgtgtta	4200
	gatgcaatca	gcggtttcat	cacttttttc	agtgtgtaat	catcgtttag	ctcaatcata	4260
	ccgagagcgc	cgtttgctaa	ctcagccgtg	cgttttttat	cgctttgcag	aagtttttga	4320
	ctttcttgac	ggaagaatga	tgtgcttttg	ccatagtatg	ctttgttaaa	taaagattct	4380
5	tcgccttggg	agccatcttc	agttccagt	tttgcttcaa	atactaagta	tttgtggcct	4440
	ttatcttcta	cgtagtgagg	atctctcagc	gtatggttgt	cgctgagct	gtagttgcct	4500
	tcacgatga	actgctgtac	attttgatac	gtttttccgt	caccgtcaaa	gattgattta	4560
	taatcctcta	caccgttgat	gttcaaagag	ctgtctgatg	ctgatacggt	aacttgtgca	4620
	gttgtcagt	tttgtttgcc	gtaatgttta	ccggagaaat	cagtgtagaa	taaacggatt	4680
10	tttccgtcag	atgtaaagt	ggctgaacct	gaccattctt	gtgtttgggt	ttttaggata	4740
	gaatcatttg	catcgaattt	gtcgtgtgt	ttaaagacgc	ggccagcggt	tttccagctg	4800
	tcaatagaag	tttcgccgac	tttttgatag	aacatgtaaa	tcgatgtgtc	atccgcattt	4860
	ttaggatctc	cggctaattg	aaagacgatg	tggtagccgt	gatagtttgc	gacagtgccg	4920
	tcagcgtttt	gtaatggcca	gctgtcccaa	acgtccaggc	cttttgcaga	agagatat	4980
15	ttaattgtgg	acgaatcaaa	ttcagaaact	tgatatTTTT	catttttttg	ctgttcaggg	5040
	atltgcagca	tatcatggcg	tgtaatatgg	gaaatgccgt	atgtttcctt	atatggcttt	5100
	tggttcgttt	ctttcgcaaa	cgcttgagtt	gcgcctcctg	ccagcagtg	gtagtaaaag	5160
	gttaatactg	ttgcttgttt	tgcaaaactt	ttgatgttca	tcgttcattg	ctcctttttt	5220
	atgtactgtg	ttagcgggtc	gcttcttcca	gcctcctgt	ttgaagatgg	caagttagtt	5280
20	acgcacaata	aaaaaagacc	taaaatatgt	aaggggtgac	gccaaagtat	acactttgcc	5340
	ctttacacat	tttaggtctt	gcctgcttta	tcagtaacaa	acccgcgcga	tttacttttc	5400
	gacctcattc	tattagactc	tcgtttggat	tgcaactggg	ctattttcct	cttttgtttg	5460
	atagaaaatc	ataaaaggat	ttgcagacta	cgggcctaaa	gaactaaaaa	atctatctgt	5520
	ttcttttcat	tctctgtatt	ttttatagtt	tctgttgcat	gggcataaag	ttgccttttt	5580
25	aatcacaatt	cagaaaatat	cataatatct	catttcacta	aataatagtg	aacggcaggt	5640
	atatgtgatg	ggttaaaaag	gatcggcggc	cgctcgattt	aaatctcgag	aggcctgacg	5700
	tcgggcccgg	tacca					5715
	<210>	35					
	<211>	7506					
30	<212>	DNA					
	<213>	artificial					
	<220>						

<223> Plasmideo pCLIK5A PSODH661 PSOD 6PGDH

<400> 35

	cgcgtcgccc aaaccgatga cagcgcggcc atcggcgccc agtgcgcggt gaatgttggc	60
	tagtgcaggt tcgcgaccat cctcagcgag aaagcccatg acgttgccgg cggagacaat	120
5	gagatcaaaa tcagtctctg agatctgata aacagagaga tctcccacca cccagcgaac	180
	ttctggaaaag tcttgcttgg cgtaatcaat caggatggga tcaaggtctg tgcctagaac	240
	atcgtggcct tgcttggaca ggtagccacc gatgcgtccc tggccgcagc cagcatccaa	300
	gattttcgcct cccctgggtg ccatggcatc aatgaggcgg gcttcgccgt aaatatcatt	360
	gcctgctgcg gcgaggtttc gccagcgcgt gcgctagttt tctgagtgcg ctgggttgtt	420
10	atctgtgagc tctttccatg tagtcatggt gcccgagtat agggctactt gttcagcacc	480
	atggtgcgca gtgtgggttcg tgcgacgact tctccgcggt ggggtgcattc gatctgccac	540
	agatgggtgc ggccacctag ctgaatcggc gttgcttcgg ccacgatgac accggagctc	600
	acagcagaaa tgaagtcggt gttgttggtg atgccgacga ccatttttcc aggggcggaa	660
	atcatgctgg cgactgatcc agtggattcg gcgatggcgg cgtagacacc accgttgacc	720
15	aagcccacca cttgcaggtg cttggatgcc acgtgaagtt cgctgaccac ccggccgggc	780
	tcgatgggtg tgtagcgcag cccagattg cggctcaggc cataattggc gttgttgagt	840
	gcttcaagtt cgtctgtggt taaagctctg gtggcggcaa gttctgcaag cgaaagcaga	900
	tcttggggtt gatcatcgcg ggaagtcata attaattact ctagtcggcc taaaatgggt	960
	ggattttcac ctctgtgac ctggtaaaat cgccactacc cccaaatggt cacacctttt	1020
20	aggccgattt tgctgacacc gggcttagct gcccaattatt ccgggcttgt gaccgcctac	1080
	ccgataaata ggtcgggtga aaaatttcgt tgcaatatca acaaaaaggc ctatcattgg	1140
	gaggtgtcgc accaagtact tttgcgaagc gccatctgac ggattttcaa aagatgtata	1200
	tgctcgggtc ggaaacctac gaaaggattt tttacccatg ccgtcaagta cgatcaataa	1260
	catgactaat ggagataatc tcgcacagat cggcgttgta ggccatgacg taatgggctc	1320
25	aaacctcgcc cgcaacttcg cccgcaacgg caacactgtc gctgtctaca accgcagcac	1380
	tgacaaaacc gacaagctca tcgcgatca cggctccgaa ggcaacttca tcccttctgc	1440
	aaccgtcgaa gagttcgtag catccctgga aaagccacgc cgcgccatca tcatggttca	1500
	ggctggtaac gccaccgacg cagtcacaa ccagctggca gatgccatgg acgaaggcga	1560
	catcatcatc gacggcgga acgccctcta caccgacacc attcgtcgcg agaaggaaat	1620
30	ctccgcacgc ggtctccact tcgtcgggtc tggtatctcc ggccggcgaag aaggcgcaact	1680
	caacggccca tccatcatgc ctggtggctc agcaaagtcc tacgagtccc tcggaccact	1740
	gcttgagtcc atcgtgcca acgttgacgg caccatgtgt gtcaccaca tcggcccaga	1800

	cggcgccggc cacttcgtca agatgggtcca caacggcatc gagtacgccg acatgcaggt	1860
	catcggcgag gcataccacc ttctccgcta cgcagcaggc atgcagccag ctgaaatcgc	1920
	tgaggttttc aaggaatgga acgcaggcga cctggattcc tacctcatcg aaatcaccgc	1980
	agaggttctc tcccagggtg atgctgaaac cggcaagcca ctaatcgacg tcatcgttga	2040
5	cgctgcaggt cagaagggca ccggacgttg gaccgtcaag gctgctcttg atctgggtat	2100
	tgctaccacc ggcatcggcg aagctgtttt cgcacgtgca ctctccggcg caaccagcca	2160
	gcgcgctgca gcacagggca acctacctgc aggtgtcctc accgatctgg aagcacttgg	2220
	cgtggacaag gcacagttcg tcgaagacgt tcgccgtgca ctgtacgcat ccaagcttgt	2280
	tgcttacgca cagggcttcg acgagatcaa ggctggcttc gacgagaaca actgggacgt	2340
10	tgaccctcgc gacctcgcta ccatctggcg cggcggctgc atcattcgcg ctaagttcct	2400
	caaccgcatc gtcgaagcat acgatgcaaa cgctgaactt gagtcctcgc tgctcgatcc	2460
	ttacttcaag agcgagctcg gcgacctcat cgattcatgg cgtcgcgtga ttgtcaccgc	2520
	caccagctt ggcttgccaa ttccagtgtt cgcttcctcc ctgtcctact acgacagcct	2580
	gcgtgcagag cgtctgccag cagccctgat ccaaggacag cgcgacttct tcggtgcgca	2640
15	cacctacaag cgcacgaca aggatggctc cttccacacc gagtgggtccg gcgaccgctc	2700
	cgaggttgaa gcttaaaggc tctcctttta acacaacgcc aaaaccctc acagtcacct	2760
	tagattgtga ggggtttttc gcgtgctgcc agggattcgc cggaggtggg cgtcgataag	2820
	caaaaatctt ttaattgctt ttacctatgg ctctgccctt gttccaataa ccttgccgct	2880
	tcatgtgcgt cttgggcatg ccggcggtgg tctgcagatg cttcttggcc gcacgggttt	2940
20	cggaggattc cgcgccgatc caggtataaa aatcggtgta atccgtgtca gcgatgtgat	3000
	caatgaagga ttgttcgttg gaaatccact gcgcggtgat gtgctcgccc tggggaaaat	3060
	cgaaggtgta atcaagtgga tcgtgggcga taagatacgc ggtcgcaggg atttcaccgt	3120
	ccaaggtctc cagaatcgag cagatcgctg ggtaagaggt gagatcgctt aagaaaagga	3180
	agccacgcgg cgctggatct gggatggcga acggaatgtc gacatcgatg ctcttctgcg	3240
25	ttaattaaca attgggatcc tctagacctg ggatttaaata cgctagcggg ctgctaaagg	3300
	aagcggaaca cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gaccccgat gaatgtcagc	3360
	tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcagt	3420
	gggcttacat ggcatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg	3480
	ccagctgggg cgccctctgg taagggtggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc	3540
30	ttgccgccaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga	3600
	tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccgc ttgggtggag	3660
	aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cgccgtgttc	3720

	cggtgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cgggtgccctg	3780
	aatgaactgc aggacgaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc	3840
	gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg	3900
	ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc catcatggct	3960
5	gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat cgggctacct gccattcga ccaccaagcg	4020
	aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat	4080
	ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcc a gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc	4140
	atgcccgcgc gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg	4200
	gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc	4260
10	tatcaggaca tagcgttggc taccctgtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct	4320
	gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcac cgccttctat	4380
	cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctgggggt cgaatgacc gaccaagcga	4440
	cgcccaacct gccatcacga gatttcgatt ccaccgccgc cttctatgaa aggttgggct	4500
	tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatcctcca gcgcggggat ctcatgctgg	4560
15	agttcttcgc ccacgctagc ggcgcgcgg cgggcccggt gtgaaatacc gcacagatgc	4620
	gtaaggagaa aataccgcac caggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc	4680
	tcggtcgttc ggctgcggcg agcggatatca gctcactcaa aggcggtaac acggttatcc	4740
	acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg	4800
	aaccgtaaaa aggcgcgctt gctggcgctt tccatagggc tccgcccccc tgacgagcat	4860
20	cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata aagataccag	4920
	gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga	4980
	tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg	5040
	tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt	5100
	cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac	5160
25	gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc	5220
	ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct acactagaag gacagtatct	5280
	ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc	5340
	ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc	5400
	agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctctga cgctcagtgg	5460
30	aacgaaaact cacgttaagg gattttggct atgagattat caaaaaggat cttcacctag	5520
	atccttttaa aggccggccg cggccgccat cggcattttc ttttgcgttt ttatttggtta	5580
	actgttaatt gtccttgctt aaggatgctg tctttgacaa cagatgtttt cttgcctttg	5640

	atgttcagca ggaagctcgg cgcaaacggt gattgtttgt ctgcgtagaa tcctctgttt	5700
	gtcatatagc ttgtaatcac gacattgttt cctttcgctt gaggtacagc gaagtgtgag	5760
	taagtaaagg ttacatcggt aggatcaaga tccattttta acacaaggcc agttttgttc	5820
	agcggcctgt atgggccagt taaagaatta gaaacataac caagcatgta aatatcgta	5880
5	gacgtaatgc cgtcaatcgt ctttttgat ccgcgggagt cagtgaacag gtaccatttg	5940
	ccgttcattt taaagacggt cgcgcggtca atttcacctg ttactgtgtt agatgcaatc	6000
	agcggtttca tcactttttt cagtgtgtaa tcatcgttta gctcaatcat accgagagcg	6060
	ccgtttgcta actcagccgt gcgtttttta tcgctttgca gaagtttttg actttcttga	6120
	cggaagaatg atgtgctttt gccatagtat gctttgttaa ataaagattc ttcgccttgg	6180
10	tagccatctt cagttccagt gtttgcttca aatactaagt atttgtggcc tttatcttct	6240
	acgtagtgag gatctctcag cgtatgggtg tcgcctgagc tgtagttgcc ttcacgatg	6300
	aactgctgta ctttttgata cgtttttccg tcaccgtcaa agattgattt ataactctct	6360
	acaccgttga tgttcaaaga gctgtctgat gctgatacgt taacttgtgc agttgtcagt	6420
	gtttgtttgc cgtaatgttt accggagaaa tcagtgtaga ataaacggat tttccgtca	6480
15	gatgtaaatg tggctgaacc tgaccattct tgtgttttgt cttttaggat agaactattt	6540
	gcatcgaatt tgtcgctgtc tttaaagacg cgccagcgt tttccagct gtcaatagaa	6600
	gtttcgccga ctttttgata gaacatgtaa atcgatgtgt catccgcatt tttaggatct	6660
	ccggctaatz caaagacgat gtggtagccg tgatagtttg cgacagtgcc gtcagcgttt	6720
	tgtaatggcc agctgtcca aacgtccagg ccttttgagc aagagatatt ttttaattgtg	6780
20	gacgaatcaa attcagaaac ttgatatttt tcattttttt gctgttcagg gatttgcagc	6840
	atatcatggc gtgtaatatg ggaaatgccg tatgtttcct tatatggctt ttggttcgtt	6900
	tctttcgcaa acgcttgagt tgcgcctcct gccagcagtg cggtagtaaa ggtaataact	6960
	gttgccttgt ttgcaaactt tttgatgttc atcgttcatg tctccttttt tatgtactgt	7020
	gttagcggtc tgcttcttcc agccctcctg tttgaagatg gcaagttagt tacgcacaat	7080
25	aaaaaaagac ctaaaatatg taaggggtga cgccaaagta tacactttgc cttttacaca	7140
	ttttaggctt tgcctgcttt atcagtaaca aaccgcgcg atttactttt cgacctcatt	7200
	ctattagact ctcgtttgga ttgcaactgg tctattttcc tcttttgttt gatagaaaat	7260
	cataaaagga tttgcagact acgggcctaa agaactaaaa aatctatctg tttcttttca	7320
	ttctctgtat tttttatagt ttctgttgca tgggcataaa gttgcctttt taatcacaat	7380
30	tcagaaaata tcataatatc tcatttcact aaataatagt gaacggcagg tatatgtgat	7440
	gggttaaaaa ggatcggcgg ccgctcgatt taaatctcga gaggcctgac gtcgggcccg	7500
	gtacca	7506

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produzir metionina em bactérias corineformes, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de,

5 cultivar pelo menos uma bactéria corineforme que seja derivada através de modificação genética de um organismo de partida de modo que a dita bactéria corineforme apresente uma quantidade e/ou atividade aumentada(s) de pelo menos uma enzima da via das pentoses-fosfato comparado ao organismo de partida.

10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de pelo menos transcetolase, transaldolase, glicose-6-fosfato-desidrogenase ou 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado ao organismo de partida.

15 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de pelo menos transcetolase e glicose-6-fosfato-desidrogenase, transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase ou glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado ao organismo de partida.

20 4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de pelo menos transcetolase, glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado ao organismo de partida.

25 5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a quantidade e/ou atividade da(s) dita(s) enzima(s) é/são aumentada(s) aumentando o número de cópias das sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas, aumentando a transcrição e/ou translação das sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas, introduzindo mutações nas sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas ou uma combinação dos mesmos.

30 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o número de cópias de gene é aumentado usando vetores de replicação autônomos compreendendo as sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas e/ou por integração cromossômica de cópias adi-

cionais das sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas no genoma do organismo de partida.

7. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a transcrição é aumentada usando promotores fortes.

5 8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o promotor forte é selecionado do grupo que compreende P_{EFTu} , P_{groES} , P_{SOD} e $P_{\lambda R}$.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o promotor P_{SOD} é usado.

10 10. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida substituindo seus respectivos promotores endógenos com um promotor forte que é preferivelmente P_{SOD} .

15 11. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que transcetolase carrega pelo menos uma mutação em uma posição que corresponde à posição 293 ou 327 da SEQ ID N° 12 e em que 6-fosfo-gliconato-desidrogenase carrega pelo menos uma mutação em uma posição que corresponde à posição 150, 209, 269, 288, 329, 330 ou 353 da
20 SEQ ID N° 6.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 e 11, caracterizado pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida substituindo seus respectivos promotores endóge-
25 nos com um promotor forte que é preferivelmente P_{SOD} , em que transcetolase carrega pelo menos uma mutação em uma posição que corresponde à posição 293 ou 327 da SEQ ID No. 12 e em que 6-fosfo-gliconato-desidrogenase carrega pelo menos uma mutação em uma posição que corresponde à posição 150, 209, 269, 288, 329, 330 ou 353 da SEQ ID No. 6.

30 13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizado pelo fato de que a bactéria corineforme é selecionada do grupo que compreende as espécies *Corynebacterium glutamicum*, *Cory-*

nebacterium acetoglutamicum, *Corynebacterium jeikeum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* e *Corynebacterium efficiens*.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que uma cepa de *C. glutamicum* é usada.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizado pelo fato de que pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, preferivelmente pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50% e mais preferivelmente pelo menos cerca de fator 2, pelo menos cerca de fator 5 e pelo menos cerca de fator 10 mais metionina são produzidos comparado ao organismo de partida.

16. Bactéria corineforme, caracterizada pelo fato de que é derivada através de modificação genética de um organismo de partida de modo que a dita bactéria corineforme apresenta uma quantidade aumentada e/ou atividade de pelo menos duas enzimas da via das pentoses-fosfato comparada ao organismo de partida.

17. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de pelo menos transcetolase e glicose-6-fosfato-desidrogenase, transcetolase e 6-fosfogliconato-desidrogenase, ou glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado ao organismo de partida.

18. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de pelo menos transcetolase, glicose-6-fosfato-desidrogenase e 6-fosfogliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado ao organismo de partida.

19. Bactéria corineforme de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 18, caracterizada pelo fato de que a quantidade e/ou atividade da(s) dita(s) enzima(s) é/são aumentada(s) aumentando o número de cópias das sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas, aumentando a transcrição e/ou a translação dos genes que codificam as di-

tas enzimas, introduzindo mutações nas sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas ou uma combinação dos mesmos.

20. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o número de cópias de gene é aumentado usando vetores de replicação autônomos compreendendo a sequência de ácido nucleico que codifica as ditas enzimas e/ou por integração cromossômica de cópias adicionais das sequências de ácido nucleico que codificam as ditas enzimas no genoma do organismo de partida.

21. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a transcrição é aumentada usando promotor forte.

22. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que o promotor forte é selecionado do grupo que compreende P_{EFTu} , P_{groES} , P_{SOD} e $P_{\lambda R}$.

23. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que o promotor P_{SOD} é usado.

24. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida substituindo seus respectivos promotores endógenos com um promotor forte que é preferivelmente P_{SOD} .

25. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que transcetolase carrega pelo menos uma mutação em uma posição que corresponde à posição 293 ou 327 da SEQ ID No. 12 e em que 6-fosfo-gliconato-desidrogenase carrega pelo menos uma mutação em uma posição que corresponde à posição 150, 209, 269, 288, 329, 330 ou 353 da SEQ ID No. 6.

26. Bactéria corineforme de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 e 25, caracterizada pelo fato de que a quantidade e/ou atividade de transcetolase e 6-fosfo-gliconato-desidrogenase é/são aumentada(s) comparado a um organismo de partida substituindo seus respectivos promotores endógenos com um promotor forte que é preferivelmente P_{SOD} ,

em que a transcetolase carrega pelo menos uma mutação em uma posição que corresponde à posição 293 ou 327 da SEQ ID Nº 12 e em que 6-fosfogliconato-desidrogenase carrega pelo menos uma mutação em uma posição que corresponde à posição 150, 209, 269, 288, 329, 330 ou 353 da SEQ ID Nº 6.

27. Bactéria corineforme de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 26, caracterizada pelo fato de que a bactéria corineforme é selecionada do grupo que compreende as espécies *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium jeikeum*,
10 *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* e *Corynebacterium efficiens*.

28. Bactéria corineforme de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que uma cepa de *C. glutamicum* é usada.

29. Bactéria corineforme de acordo com qualquer uma das reivindicações de 16 a 28, caracterizada pelo fato de que pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, preferivelmente pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50% e mais preferivelmente pelo menos cerca de fator 2, pelo menos cerca de fator 5 e pelo menos cerca de fator 10 mais metionina são produzidos comparado ao organismo de partida.

30. Uso de uma bactéria corineforme, como definida em qualquer uma das reivindicações de 16 a 29, caracterizado pelo fato de ser para produzir metionina.

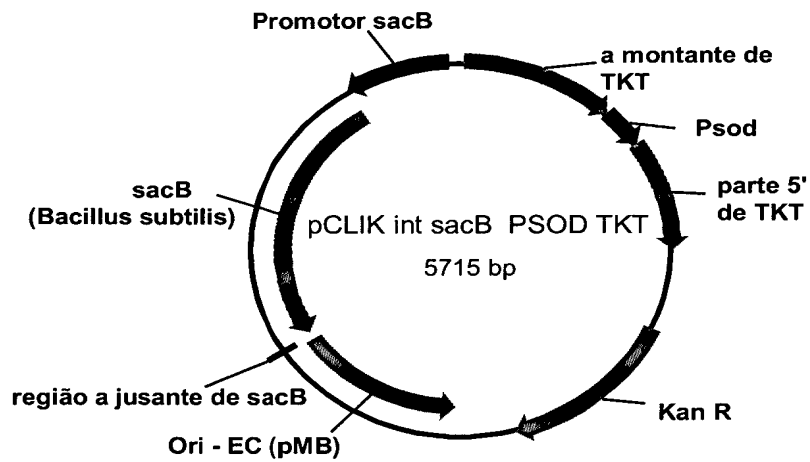


Fig.1a - Mapa de plasmídeo de pCLIK int sacB PSOD TKT

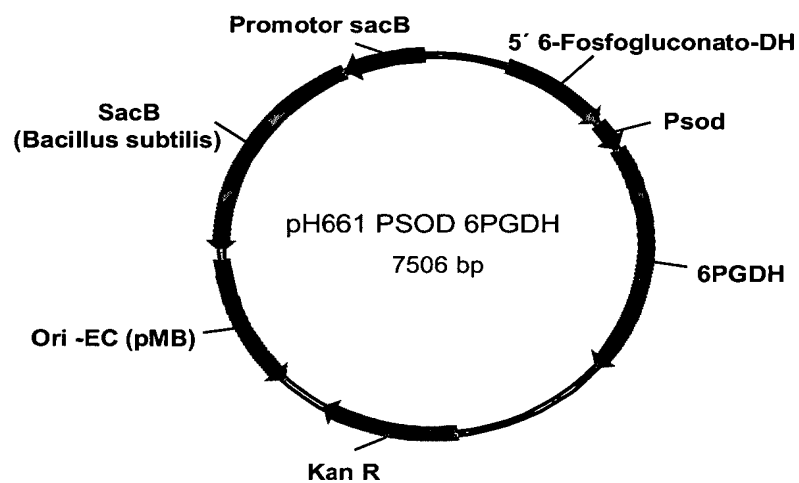


Fig.1b - Mapa de plasmídeo de pCLIK int sacB PSOD 6PGDH

RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO DE PRODUZIR METIONINA EM CORINEBACTÉRIAS ATRAVÉS DE SUPRAEXPRESSÃO DAS ENZIMAS DA VIA DAS PENTOSSES-FOSFATO".

- 5 A presente invenção refere-se a um método de produzir metionina em bactérias corineformes em que enzimas da via das pentoses-fosfato são supraexpressadas. A presente invenção também refere-se a bactérias corineformes para produzir metionina em que pelo menos duas enzimas da via das pentoses-fosfato são supraexpressadas.