



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 335 828**

51 Int. Cl.:  
**C12P 13/14** (2006.01)  
**C12N 1/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99944770 .9**  
96 Fecha de presentación : **22.09.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1033407**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2000**

54 Título: **Bacterias corineformes para producir L-GLU.**

30 Prioridad: **25.09.1998 JP 10-271786**  
**25.09.1998 JP 10-271787**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.04.2010**

73 Titular/es: **Ajinomoto Co., Inc.**  
**15-1 Kyobashi 1-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es: **Asakura, Yoko;**  
**Nakamura, Jun;**  
**Kanno, Sohei;**  
**Suga, Mikiko;**  
**Kimura, Eiichiro;**  
**Ito, Hisao;**  
**Matsui, Kazuhiko;**  
**Ohsumi, Tsuyoshi;**  
**Nakamatsu, Tsuyoshi y**  
**Kurahashi, Osamu**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 335 828 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Bacterias corineformes para producir L-GLU.

**5 Fundamento de la invención**

La presente invención se refiere a un método de construcción de una cepa mutante capaz de producir ácido L-glutámico con alto rendimiento, y a un método de producción de ácido L-glutámico por fermentación con el mutante.

10 Los métodos de construcción de cepas mutantes que pueden emplearse para producir aminoácidos por fermentación, pueden clasificarse ampliamente en dos métodos. Uno de ellos comprende introducir en un DNA mutaciones aleatorias con un mutágeno químico, y la otra comprende la recombinación genética. En este último método, puede desarrollarse una cepa que tiene capacidad mejorada de producción de la sustancia deseada, mediante intensificación  
15 de un gen sobre un camino metabólico relacionado con la biosíntesis de la sustancia pretendida, o por debilitación de un gen de una enzima relacionada con la destrucción. A este respecto, para intensificar un gen pretendido, ha sido utilizado, principalmente, un plásmido capaz de replicarse de modo autónomo, independientemente del cromosoma de una célula.

20 Sin embargo, el método de intensificación con un plásmido del gen pretendido presenta problemas. En particular, el grado de enriquecimiento del gen pretendido es variable, dependiendo del número de copias del propio plásmido. Por consiguiente, para algunos tipos de genes pretendidos, las copias son con frecuencia demasiadas y, como resultado de ello, la expresión se hace excesiva, el crecimiento resulta seriamente inhibido o la capacidad de producción de la sustancia pretendida disminuye. En tales casos, aun cuando el grado de intensificación del gen pretendido puede  
25 hacerse disminuir usando un plásmido de un número de copias pequeño, la variedad del plásmido está limitada en muchos casos, y es imposible la regulación que se pretende obtener del nivel de expresión del gen.

Otro problema es que, dado que la replicación del plásmido es con frecuencia inestable, el plásmido resulta eliminado.

30 Por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa Publicada, sin examinar, (a la que se hace referencia en esta memoria más adelante como "J.P. KOKAI") No. 61-268185, describe un DNA recombinante que comprende un fragmento de DNA que contiene un gen que produce glutamato deshidrogenasa (GDH) (gen de glutamato deshidrogenasa) que deriva de una bacteria corineforme que produce glutamato, y un fragmento de DNA (plásmido) que contiene un gen necesario para la replicación autónoma en la célula. Asimismo está descrito en ella que por introducción del DNA recombinante en una célula, puede cultivarse una cepa enriquecida en GDH para mejorar la producción de sustancias  
35 (tales como aminoácidos y proteínas) con microorganismos.

40 Por otra parte, en la Patente Japonesa No. 2.520.895, el DNA recombinante antes descrito es introducido en una bacteria corineforme obteniendo una cepa que posee actividad enzimática mejorada, y se produce ácido L-glutámico por fermentación con la cepa. No obstante, la producción y el rendimiento de ácido L-glutámico eran insatisfactorios todavía. Por tanto, se ha pedido mejorar adicionalmente la productividad de ácido L-glutámico. Se ha indicado que la petición ha sido alcanzada mediante la introducción en una bacteria corineforme, de un DNA recombinante que comprende dos tipos de genes., a saber, un gen que produce glutamato deshidrogenasa derivado desde una bacteria corineforme que produce glutamato, y un gen de isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

45 Además, la J.P KOKAI No. 6-502548 describe un sistema de expresión y un sistema de secreción de Corynebacterium que comprende una cepa de una bacteria corineforme y una casete secretora que comprende la primera secuencia de DNA funcional para la expresión en la cepa, codificando la segunda secuencia de DNA aminoácidos polipéptidos y/o proteínas, estando insertada la tercera secuencia de DNA entre la primera secuencia de DNA y la segunda secuencia de DNA, en el que la tercera secuencia de DNA codifica el elemento proteínico seleccionado entre PS1 y PS2, lo que garantiza la secreción de los aminoácidos, polipéptidos y/o proteínas. Específicamente, la secreción de polipéptidos está descrita en ella y, en particular, se llevó a cabo mutagénesis de NTG con una bacteria corineforme y un mutante resistente al 4-fluoroglutamato (4FG) que es un análogo al glutamato, que es seleccionado y sometido a  
55 la transformación con PCGL141. Se describe en ella que puede obtenerse una cepa que posee una expresión intensificada de GDH de la bacterias resistentes al análogo. También se describe en ella que se observó una mutación en la secuencia de los nucleótidos No. 251 a No. 266 del promotor de GDH.

60 Patek *et al.*, 1996, describen la clonación y mapeo de los promotores de cinco genes de *C-glutamicum* aislados previamente. Un análisis comparativo reveló secuencias conservadas aproximadamente 35 bp y 10 bp aguas arriba del sitio de comienzo de la transcripción.

**Descripción de la invención**

65 El objeto de la presente invención es proporcionar un método de construcción de un mutante capaz de intensificar o regular adecuadamente la expresión de un gen deseado sin usar un plásmido, y capaz, asimismo, de producir ácido L-glutámico con alto rendimiento, por recombinación o mutación génica.

## ES 2 335 828 T3

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un promotor para la GDH capaz de comunicar capacidad de producción de ácido glutámico con alto rendimiento a una cepa de una bacteria corineforme sin aumentar grandemente la cantidad de ácido aspártico y de alanina que se obtienen como subproductos.

5 Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un gen de GDH que tiene la secuencia del promotor para GDH anteriormente descrito.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una cepa de una bacteria corineforme que posee el gen antes descrito y que es capaz de producir ácido L-glutámico.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de aminoácidos por fermentación en el que se usa el microorganismo que produce aminoácidos construido de ese modo.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de fermentación para producir ácido L-glutámico a bajo costo, aumentando el rendimiento de ácido L-glutámico mediante el uso de una bacteria corineforme que produce ácido L-glutámico.

La presente invención ha sido completada sobre la base del descubrimiento de que los problemas anteriormente descritos pueden ser resueltos eficazmente modificando de diversos modos el promotor de genes de realización de la biosíntesis del ácido L-glutámico, situados en un cromosoma, para regular la cantidad de la expresión de los genes deseados. En particular, la invención ha sido completada sobre la base del descubrimiento de que el problema descrito puede ser resuelto eficazmente mediante la introducción de una mutación específica en la región -35 o en la región -10, que son regiones específicas del promotor.

25 Específicamente, la presente invención se refiere a:

1. Un método de producción de ácido L-glutámico, que comprende la etapa de cultivar una bacteria corineforme que expresa una enzima codificada por un gen que biosintetiza ácido L-glutámico, seleccionada entre el grupo que consiste en glutamato deshidrogenasa (GDH), citrato sintasa (CS), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), piruvato deshidrogenasa (PDH) y aconitasa (ACO), y en el que la secuencia del promotor de dicho gen que biosintetiza ácido L-glutámico, situada en un cromosoma de la bacteria, contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en
  - 30 i) la secuencia TTGTCA, TTGACA o TTGCCA en la región -35 de la secuencia del promotor;
  - 35 ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y
  - iii) una combinación de (i) y (ii).
- 40 2. El método del párrafo 1, en el que el promotor del gen de GDH contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:
  - 45 i) la secuencia TTGTCA, TTGACA o TTGCCA en la región -35 de la secuencia del promotor;
  - ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y
  - iii) una combinación de (i) y (ii).
- 50 3. El método del párrafo 1, en el que el promotor del gen de CS contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:
  - 55 i) la secuencia TTGACA en la región -35 de la secuencia del promotor;
  - ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y
  - iii) una combinación de (i) y (ii).
- 60 4. El método del párrafo 1, en el que el promotor del gen de ICDH contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:
  - 65 i) la secuencia TTGACA en la región -35 de la secuencia del promotor,
  - ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y

iii) una combinación de (i) y (ii).

5. El método del párrafo 1, en el que el promotor del gen de PDH contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en

i) la secuencia TTGCCA en la región -35 de la secuencia del promotor;

ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y

iii) una combinación de (i) y (ii).

6. Un método de producción de ácido L-glutámico, que comprende la etapa de cultivar una bacteria corineforme que expresa una enzima codificada por el gen de la citrato sintasa (CS), en el que una secuencia de promotor del gen de CS situada sobre un cromosoma de la bacteria, contiene la secuencia ATGGCT en la región -35 de la secuencia del promotor, y la secuencia TATAAC en la región -10 de la secuencia del promotor.

La memoria descriptiva especifica un método de producción de bacterias corineformes que tienen una capacidad mejorada de producir aminoácidos o ácidos nucleicos, que comprende las etapas de introducir una mutación en una secuencia del promotor de genes que realizan la biosíntesis de aminoácidos o de ácidos nucleicos, situados en el cromosoma de una bacteria corineforme, para hacerla cercana a la secuencia de consenso, o introducir mediante recombinación génica un cambio en la secuencia del promotor de genes que realizan la biosíntesis de aminoácidos o de ácidos nucleicos, situados en el cromosoma de una bacteria corineforme, para hacer a dicha secuencia próxima a la secuencia de consenso, obteniendo mutantes del microorganismo corineforme que produce aminoácidos o ácidos nucleicos, cultivar los mutantes y seleccionar un mutante capaz de producir en gran cantidad el aminoácido o el ácido nucleico deseados.

La memoria descriptiva especifica también un promotor para el gen que produce la glutamato deshidrogenasa (GDH), que posee la secuencia de (i) al menos una secuencia de DNA seleccionada entre el grupo que consiste en CGGTCA, TTGTCA, TTGACA y TTGCCA en la región -35, (ii) la secuencia TATAAT o la misma secuencia TATAAT pero en la que la base de ATAAT ha sido reemplazada por otra base en la región -10, o (iii) una combinación de (i) y (ii), en el que la secuencia no inhibe la función del promotor.

La memoria descriptiva especifica también un gen que produce glutamato deshidrogenasa que posee el promotor descrito.

La memoria descriptiva especifica también un microorganismo corineforme que produce L-glutamato, que posee el gen antes descrito.

### Descripción breve de los dibujos

La Fig. 1 muestra el curso de construcción de un gen de GDH que tiene un promotor mutante.

La Fig. 2 muestra el curso de construcción de un gen de CS que tiene un promotor mutante.

La Fig. 3 muestra el curso de construcción de un vector transportador que lleva el gen lacZ como gen informador.

### Modo mejor para llevar a cabo la invención

La expresión "microorganismo corineforme que produce ácido glutámico" tal como se emplea en esta memoria, incluye también bacterias que fueron clasificadas anteriormente como pertenecientes al género *Brevibacterium*, pero que en la actualidad están integradas en el género *Corynebacterium* [Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981)], así como bacterias del género *Brevibacterium* que están muy próximas a las del género *Corynebacterium*. Por tanto, los mutantes utilizados en la presente invención pueden ser derivados de las bacterias corineformes que producen ácido glutámico, del género *Brevibacterium* o *Corynebacterium* que se indican seguidamente. A las bacterias del género *Corynebacterium* y a las del género *Brevibacterium* se hará referencia, colectivamente, como "bacterias corinefomes" en tanto en cuanto estas bacterias no afecten a la productividad de ácido glutámico.

*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870

*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806

*Corynebacterium callunae* ATCC15991

## ES 2 335 828 T3

	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC13032
	<i>Brevibacterium divaricatum</i>	ATCC14020
5	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	ATCC13869
	<i>Corynebacterium lilium</i>	ATCC15990
10	<i>Brevibacterium flavum</i>	ATCC14067
	<i>Corynebacterium melassecola</i>	ATCC17965
	<i>Brevibacterium saccharolyticum</i>	ATCC14066
15	<i>Brevibacterium immariophilum</i>	ATCC14068
	<i>Brevibacterium roseum</i>	ATCC13825
20	<i>Brevibacterium thiogenitalis</i>	ATCC19240
	<i>Microbacterium ammoniaphilum</i>	ATCC15354
	<i>Corynebacterium thermoaminogenes</i>	AJ12310 (FERM 9246)

25 Son ejemplos de enzimas efectivas que intervienen en la biosíntesis GDH, citrato sintasa (CS), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), piruvato deshidrogenasa (PDH) y aconitasa (ACO), para la fermentación del ácido glutámico.

30 En la presente invención, se obtiene un mutante de una bacteria corineforme que produce aminoácidos, introduciendo una mutación en la secuencia de un promotor de genes que realizan biosíntesis, situados en el cromosoma de una bacteria corineforme que produce ácido L-glutámico, tal como la secuencia del promotor anteriormente descrita para GDH, para preparar ácido L-glutámico, para hacer dicha secuencia próxima a una secuencia de consenso, con un compuesto químico o introduciendo la mutación mediante recombinación genética, para obtener un mutante del microorganismo corineforme que produce ácido L-glutámico.

35 La expresión "secuencia de consenso" es una secuencia que aparece con la máxima frecuencia en diversas secuencia de promotores. Tales secuencias de consenso incluyen, por ejemplo, las de *E. coli* y las del *Bacillus subtilis*. La secuencia de consenso de *E. coli* ha sido descrita por Diane K. Hawley y William R. McClure en Nuc. Acid. Res. 11:2237-2255 (1983), y la del *B. subtilis* ha sido descrita por Charles *et al.*, en Mol. Gen. Genet. 186:339-346 (1982).

40 La mutación puede ser causada o bien en solo una secuencia del promotor tal como la secuencia para GDH, o en dos o más secuencias del promotor tales como las secuencias para GDH, citrato sintasa (enzima que sintetiza citrato) (CS) e isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

45 En la presente invención, el mutante obtenido de este modo es cultivado para obtener el mutante capaz de producir una gran cantidad de ácido L-glutámico.

50 Ya ha sido explicado que en la fermentación de ácido glutámico, la GDH que deriva de un microorganismo corineforme que produce glutamato posee su propia secuencia de promotor en su región aguas arriba (Sahm *et al.*, Molecular Microbiology (1992), 6, 317-326).

55 Por ejemplo, el promotor para la GDH de la presente invención, el gen de GDH que posee la secuencia de promotor para GDH y la cepa de bacteria corineforme que produce L-glutamato, que tiene este gen, pueden obtenerse, por ejemplo, mediante los métodos que siguen.

60 A saber, la cepa es sometida a un tratamiento de mutagénesis tal como irradiación con UV, rayos X o radiación, o tratamiento con un mutágeno, para obtener una cepa resistente al ácido 4-fluoroglutámico sobre un medio de cultivo con agar, en placa, que contiene ácido 4-fluoroglutámico. Es decir, las células mutagenizadas son sembradas en un medio de cultivo con agar, en placas, que contiene ácido 4-fluoroglutámico en una concentración tal que inhibe el crecimiento de las células parentales, y se separa el mutante que ha crecido de este modo.

65 Además, la secuencia del promotor de genes de GDH puede ser reemplazada por secuencias modificadas de diversos modos mediante mutagénesis dirigida al sitio, y se examina la relación existente entre las secuencias respectivas y la actividad de GDH para seleccionar de este modo aquellas que tienen alta productividad de L-glutamato.

## ES 2 335 828 T3

La secuencia de DNA de la región -35 del promotor del gen que produce la GDH es, al menos, una secuencia de DNA seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias TTGTCA, TTGACA y TTGCCA, y/o la secuencia de DNA de la región -10 del promotor es la secuencia TATAAT.

5 La secuencia del promotor del gen de GDH está descrita, por ejemplo, en la publicación antes descrita de Sahn *et al.*, *Molecular Microbiology* (1992), 6, 317-326. Está descrita en ella como Seq ID No. 1. La propia secuencia del gen de GDH ha sido descrita también por Sahn *et al.*, en *Molecular Microbiology* (1992), 6, 317-326, como Seq ID No.1.

10 De modo semejante, la mutación puede ser introducida en el promotor para la enzima que sintetiza citrato (CS) o la enzima que sintetiza isocitrato (ICDH).

15 Por tanto, los promotores para la GDH son aquellos que tienen al menos una secuencia de DNA seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias TTGTCA, TTGACA y TTGCCA en la región -35 y/o la secuencia TATAAT en la región -10. También se proporcionan genes para producir la glutamato deshidrogenasa, que tienen el promotor anteriormente descrito.

20 Los promotores para CS son aquellos que tienen la secuencia TTGACA en la región -35 y/o la secuencia TATAAT en la región -10, que no inhiben la función del promotor. También se proporcionan genes de CS que poseen el promotor antes descrito.

25 Los promotores para ICDH son aquellos que poseen la secuencia TTGCCA o TTGACA en el primero o el segundo promotor en la región -35 y/o la secuencia TATAAT en el primero o el segundo promotor en la región -10, que no inhiben la función del promotor. También se proporcionan los genes *icd* que poseen el promotor antes descrito.

Los promotores para PDH son aquellos que tienen la secuencia TTGCCA en la región -35 y/o la secuencia TATAAT en la región -10, que no inhiben la función del promotor, También se proporcionan genes de PDH que tienen el promotor antes descrito.

30 Los promotores para la argininosuccinato sintasa son aquellos que tienen al menos una secuencia de DNA seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias TTGCCA, TTGCTA y TTGTCA en la región -35 y/o la secuencia TATAAT en la región -10, o la base de ATAAT de la secuencia TATTAT ha sido reemplazada por otra base, que no inhiben la función del promotor. También se proporcionan genes de la argininosuccinato sintasa que tienen el promotor antes descrito.

35 Puede obtenerse ácido L-glutámico cultivando una bacteria corineforme de la presente invención, lo que produce ácido L-glutámico en un medio de cultivo líquido formando y acumulando con ello ácido L-glutámico, y recogiendo el aminoácido desde el medio de cultivo.

40 El medio de cultivo líquido que se usa para cultivar la cepa de la bacteria de la presente invención, antes descrita, es un medio de nutrición ordinario que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, factores de crecimiento, etc.

45 Las fuentes de carbono incluyen hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melazas e hidrolizados de almidón; alcoholes tales como etanol y glicerina; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Las fuentes de nitrógeno incluyen sulfato amónico, nitrato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, acetato amónico, amoníaco, peptona, extracto de carne, extracto de levadura y líquido de macerado de maíz. Cuando se utiliza un mutante auxótrofo, las sustancias requeridas se añaden al medio como los reactivos o sustancias naturales que los contienen.

50 Las bacterias corineformes producen, habitualmente, ácido L-glutámico en condiciones de biotina reducidas. Por tanto, la cantidad de biotina del medio está restringida o se añade una sustancia que inhibe el efecto de la biotina tal como un tensioactivo o penicilina.

55 La fermentación se lleva a cabo, preferiblemente, con agitación del cultivo o agitando el cultivo con aireación, al tiempo que se mantiene el pH del cultivo en el intervalo de 5 a 9 durante 2 a 7 días. El pH se regula, preferiblemente, con urea, carbonato cálcico, amoníaco gaseoso, agua amoniacal o semejante. La temperatura del cultivo es, preferiblemente, de 24 a 37°C.

60 El ácido L-glutámico producido y acumulado de este modo en el líquido de cultivo, se recoge mediante un método normal tal como un método que utiliza una resina de intercambio iónico o un método de cristalización. Específicamente, el ácido L-glutámico se separa por adsorción sobre una resina de intercambio aniónico o mediante cristalización con neutralización.

65 Según la presente invención puede obtenerse ácido L-glutámico con alto rendimiento introduciendo una mutación en la región del promotor de genes de biosíntesis del ácido L-glutámico, de una bacteria corineforme que produce ácido L-glutámico, para regular la expresión de los genes deseados. Además, dado que en las bacterias según la presente no tiene lugar eliminación alguna del gen deseado, al contrario de los casos en que se usa un plásmido, el

ácido L-glutámico puede ser obtenido de modo estable con un rendimiento elevado. Así pues, la ventaja industrial de la invención es grande.

5 Las presente invención describe diversos promotores, en particular, promotores para GDH, capaces de comunicar el poder de producir ácido L-glutámico con alto rendimiento a cepas de bacterias corineformes sin aumentar la cantidad de ácido aspártico y de alanina que se obtienen como subproductos.

10 En la presente invención, se somete a mutagénesis una bacteria corineforme que produce L-glutamato, se recoge una cepa en la que la mutación introducida en una región del promotor del gen de GDH y que es resistente al ácido 4-fluoroglutámico, y se cultiva la cepa obteniendo ácido glutámico con alto rendimiento. Así pues, la presente invención es muy ventajosa desde el punto de vista industrial.

Los Ejemplos que siguen ilustran adicionalmente la presente invención.

15

#### Ejemplo 1

##### *Producción de promotor mutante de GDH*

20 Se preparó un promotor mutante de GDH mediante el método de mutagénesis dirigida al sitio, del modo siguiente:

##### *(1) Preparación de genes de GDH que poseen varios promotores mutantes*

25 La secuencia de tipo salvaje de la región -35 y de la región -10 de un promotor del gen de GDH de una bacteria corineforme, se muestra en la secuencia 1. La secuencia del promotor de tipo salvaje ya ha sido indicada [Molecular Microbiology (1992), 6, 317-326].

El método de preparación de un plásmido que es portador del gen de GDH, que tiene un promotor mutante, es el siguiente.

30

Como muestra la Fig. 1, un gen cromosómico de una cepa de tipo salvaje de una bacteria corineforme ATCC13869 preparada con el "Kit de Purificación de DNA Genómico Bacteriano" (Advanced Genetic Technologies Corp.) se usó como molde para una PCR. La amplificación génica se llevó a cabo por PCR usando secuencia aguas arriba y aguas abajo del gen de GDH. Ambos extremos fueron transformados en extremos romos. El producto obtenido de este modo fue insertado en el sitio SmaI del plásmido pHSG399 (un producto de Takara Shuzo Co., Ltd.). Después, un origen de replicación tomado desde el plásmido pSAK4 que tiene el origen de replicación capaz de replicación en una bacteria corineforme, fue introducido en el sitio Sall del plásmido obteniendo el plásmido pGDH. Por este método pueden obtenerse genes de GDH que tienen cada una de las secuencia de promotor anteriormente descritas, usando un cebador que posee cada una de las secuencias de Seq ID No. 1 a Seq ID No. 6 indicadas en el Listado de Secuencias, como el cebador aguas arriba para genes de GDH, respectivamente. Se confirmó secuenciando el fragmento amplificado por PCR que no había ocurrido en el fragmento amplificado una mutación distinta de la mutación introducida en la secuencia del promotor. El pSAK4 se construyó del modo siguiente: el plásmido pHK4 obtenido previamente (J. P. KOKAI No. 5-7491) que posee un origen autónomo de replicación derivado del plásmido pHM1519 [Agric. Biol. Chem. 48, 2901-2903 (1984)], que es capaz de replicarse autónomamente en microorganismos del género Corynebacterium, se somete a digestión con las enzimas de restricción BamHI y KpnI obteniendo un fragmento de DNA que lleva el origen de replicación. Luego el fragmento obtenido de este modo es hecho de extremos romos con el DNA-Blunting Kit (Blunting Kit de Takara Shuzo Co., Ltd.) Después de ligación con el engarce Sall, el producto así obtenido fue insertado en el sitio Sall del plásmido pHSG299 (un producto de Takara Shuzo Co., Ltd.) obteniendo el plásmido pSAK4.

50

##### *(2) Comparación de los grados de expresión de GDH que tiene cada una de las secuencias del promotor*

55 Cada uno de los plásmidos preparados según se ha descrito anteriormente, fue introducido en cepas de tipo salvaje de la bacteria corineforme ATCC13869 mediante el método de electroporación (se hace referencia de J. P. KOKAI No. 2-207791). Para comparar los grados de expresión de GDH para estas cepas, se determino la actividad específica de GDH mediante el método de Sahn *et al.*, anteriormente descrito, Los resultados se muestran en la Tabla 1.

60

65

# ES 2 335 828 T3

TABLA I

Cepa	Secuencia del promotor		Actividad específica de GDH	Valor relativo
	-35	-10		
ATCC13869	TGGTCA	CATAAT	7,7	0,1
/pGDH	TGGTCA	CATAAT	82,7	1,0
/p6-2	CGGTCA	CATAAT	33,1	0,4
/p6-4	TGGTCA	TATAAT	225,9	2,7
/p6-3	TTGACA	TATAAT	327,2	4,0
/p6-7	TTGCCA	TATAAT	407,0	4,9
/p6-8	TTGTCA	TATAAT	401,3	4,9

Las cepas ATCC 13869/p6-2 a ATCC 13869p6-8 correspondían a las secuencias de Seq ID No. 2 a Seq ID No. 6, respectivamente. Estas secuencias eran las mismas que la secuencia No. 1 (tipo salvaje) excepto que las partes subrayadas habían sido cambiadas, como sigue:

Secuencia		
No. 1	5'-TTAATTCTTTGTGGTCATATCTGCGACACTGC	<u>CATAATTTGAACGT</u> -3'
2.	CGGTCA	CATAAT
3.	TGGTCA	TATAAT
4.	TTGACA	TATAAT
5.	TTGCCA	TATAAT
6.	TTGTCA	TATATT

Estas eran las de DNA de doble cadena, lineal, sintético.

## Ejemplo 2

### Preparación de cepas mutantes

#### (1) Preparación de cepas mutantes resistentes al ácido 4-fluoroglutámico

La cepa AJ13029 es una cepa mutante que produce ácido glutámico y que está descrita en el documento WO96/06180. Aun cuando esta cepa no produce ácido glutámico a la temperatura de cultivo de 31,5°C, produce ácido glutámico incluso en ausencia de un inhibidor de biotina cuando la temperatura de cultivo se cambia a 37°C. En este Ejemplo, se usó la cepa *Brevibacterium lactofermentum* AJ13029 como la cepa parental para preparar las cepas mutantes. No es preciso indicar que puede usarse como cepa parental cualquiera de las cepas productoras de ácido glutámico diferente de la AJ13029, para prepara cepas mutantes resistentes al ácido 4-fluoroglutámico.

La cepa AJ13029 fue cultivada en el medio de agar CM2B (Tabla 2) a 31,5°C durante 24 horas, obteniendo las células bacterianas. Las células fueron tratadas con una solución acuosa conteniendo 250 µg/ml de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, a 30°C, durante 30 minutos. Después, una suspensión de las células que tenían un grado de supervivencia de 1%, fue sembrada en placas del medio de cultivo con agar (Tabla 3) que contenía ácido 4-fluoroglutámico (4FG). Se formaron colonias después de incubar las placas a 31,5°C durante 20 a 30 horas. En este experimento, se preparó primeramente un medio inclinado que contenía 1 mg/ml de 4FG y después una capa del mismo medio sin 4FG se formó horizontalmente sobre él. Así se obtuvo un gradiente de concentración de 4FG sobre la superficie del medio con agar. Cuando la placa se inoculó con las células mutantes obtenidas según se ha descrito, se formó una línea divisoria en el borde del límite de crecimiento de la cepa. Las cepas bacterianas que formaron colonias en una

## ES 2 335 828 T3

zona que contenía 4FG de una concentración mayor que la de la línea divisoria, fueron tomadas. De este modo se obtuvieron alrededor de 50 cepas resistentes a 4FG partiendo de aproximadamente 10.000 células mutagenizadas.

TABLA 2

*Medio de agar CM2B*

5

Ingrediente	Concentración
Polipeptona (Nippon Seiyaku Co.)	1,0%
Extracto de levadura (Difco Co.)	1,0%
NaCl	0.5%
d-Biotina	10 µg/l
Agar	1,5%
<u>(pH 7,2; ajustado con KOH)</u>	

10

15

20

TABLA 3

*Medio de agar*

25

Componente	Cantidad en un litro de agua
Glucosa	10 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01 g
MnSO <sub>4</sub> .4-6H <sub>2</sub> O	0,01 g
Clorhidrato de tiamina	0,2 mg
d-Biotina	0,05 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O	7,1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,36 g
<u>Agar</u>	<u>15 g</u>

30

35

40

45

50

(2) *Confirmación de la capacidad de producción de ácido L-glutámico de cepas mutantes resistentes a 4FG*

La capacidad de producción de ácido glutámico de aproximadamente 50 cepas mutantes obtenidas en (1) anterior y de la cepa parental AJ13029, fueron confirmadas según se describe a continuación.

55

60

65

La cepa AJ13029 y las cepas mutantes fueron cultivadas, cada una, en medio de agar CM2B a 31,5°C durante 20 a 30 horas. Un medio líquido que tenía la composición indicada como "medio A" en la Tabla 4, fue inoculado con las células así obtenidas, y se comenzó el cultivo en agitación a 31,5°C. Aproximadamente 22 horas después, se añadió medio de nueva aportación de modo que la concentración final fuera la del medio B indicado en la Tabla 4. La temperatura se cambió a 37°C y luego se continuó el cultivo durante 24 horas aproximadamente. Una vez completado el cultivo, se examinó el cultivo con un Biotic Analyzer (un producto de Asahi Chemical Industry Co., Ltd.) para determinar si se había producido o no ácido L-glutámico. Se encontró así que cuando se hubieron cultivado las 50 cepas, se separaron dos cepas que tenían un rendimiento de ácido glutámico superior al obtenido con las cepas parentales y una alta actividad de GDH (cepa A y cepa B). La actividad de GDH de cada una de ellas se determinó encontrando que la actividad de GDH específica de ambas de ellas había aumentado (Tabla 5). La actividad de GDH se determinó mediante el método de E. R. Bormann *et al.*, [Molecular Microbiol., 6, 317-326 (1996)]. Mediante secuenciación de los genes de GDH, se identificó que los puntos de mutación se encontraban solamente en la región del promotor de GDH (Tabla 6).

ES 2 335 828 T3

TABLA 4

Ingrediente	Medio A	Medio B
Glucosa	3 g/dl	5 g/dl
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,14 g/dl	0,14 g/dl
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,04 g/dl	0,04 g/dl
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 g/dl	0,001 g/dl
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,001 g/dl	0,001 g/dl
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 g/dl	2,5 g/dl
Solución de hidrolizado de proteína de soja	1,5 ml/dl	0,38 ml/dl
Clorhidrato de tiamina	0,2 mg/ml	0,2 mg/ml
Biotina	0,3 mg/l	0,3 mg/l
Agente antiespumante	0,05 ml/l	0,05 ml/l
CaCO <sub>3</sub>	5 g/dl	5 g/dl
pH	7,0 (ajustado con KOH)	

TABLA 5

*Formación de ácido glutámico y actividad de GDH de cepas mutantes*

Cepa	Glu (g/dl)	Actividad específica de GDH	Valor relativo
AJ13029	2,6	7,7	1,0
FGR1	2,9	23,1	3,0
FGR2	3,0	25,9	3,4

TABLA 6

*Secuencias de DNA en la región del promotor de GDH de cepas mutantes*

Cepa	Secuencia del promotor de GDH		
	-35		-10
AJ13029	TGGTCA	TTCTGTGCGACACTGC	CATAAT
FGR1	TGGTCA	TTCTGTGCGACACTGC	TATAAT
FGR2	TTGTCA	T-CTGTGCGACACTGC	TATAAT

## Ejemplo 3

*Introducción de una mutación en la región del promotor del gen de CS de una bacteria corineforme que produce glutamato*

5 En este Ejemplo, se obtuvo una cepa que tenía un promotor intensificado para los genes que codifican la glutamato deshidrogenasa (GDH) y la enzima que sintetiza citrato (CS).

10 (1) *Clonación del gen gltA*

La secuencia del gen *gltA* de una bacteria corineforme que codifica la enzima que sintetiza citrato, ya ha sido explicada [Microbiol. 140, 1817-1828 (1994)]. Sobre la base de esta secuencia, fueron sintetizados los cebadores que se indican en Seq ID No. 7 y Seq ID No. 8. Por otra parte, se preparó DNA cromosómico desde *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 usando el Kit de Purificación de DNA Genómico Bacteriano (Advanced Genetic Technologies Corp.). Se añadió agua esterilizada a una mezcla de 0,5  $\mu\text{g}$  del DNA cromosómico, 10 pmol de cada uno de los oligonucleótidos, 8  $\mu\text{l}$  de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno), 5  $\mu\text{l}$  de tampón 10xLa Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) y 2 U de La Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.) obteniendo 50  $\mu\text{l}$  de "cocktail" de reacción de PCR. El "cocktail" de reacción se sometió a PCR. Las condiciones de la PCR fueron: 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación de extremos complementarios a 55°C durante 15 segundos y extensión a 72°C durante 3 segundos, usando el Thermal Cycler TP240 (Takara Shuzo Co., Ltd.), amplificando aproximadamente 3 Kbp de fragmentos de DNA que contenían el gen *gltA* y su promotor. Los fragmentos amplificados obtenidos de este modo fueron purificados con SUPRECO2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) y después hechos de extremos romos. La operación de realización de extremos romos se llevó a cabo con el Blunting Kit de Takara Shuzo Co., Ltd. El fragmentos con los extremos romos se mezcló con el pHSG399 (Takara Shuzo Co., Ltd.), y se sometió a digestión completa con *Sma*I para realizar la ligación. La reacción de ligación se llevó a cabo con el Kit de Ligación de DNA ver. 2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) Una vez completada la ligación se realizó la transformación con células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Las células fueron sembradas en placas de medio L (que comprendía 10 g/l de bacto-tryptona, 5 g/l de extracto de bacto-levadura, 5 g/l de NaCl y 15 g/l de agar; pH 7,2) que contenían 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido), 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido) y 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de cloranfenicol. Después de cultivarlas durante la noche, se tomaron colonias blancas para obtener las cepas transformadas después de aislamiento de colonias individuales.

Partiendo de las cepas transformadas se prepararon plásmidos mediante el método alcalino (*Seibutsu Kogaku Jikken-sho* compilado por Nippon Seibutsu Kogaku-kai y publicado por Baifukan, p. 105, 1992). Se prepararon mapas de enzimas de restricción y el plásmido que tiene el mismo mapa de restricción que el mapa mostrado en la Fig. 2 fue denominado "pHSG399CS".

40 (2) *Introducción de mutaciones en el promotor de gltA*

Se usó el Mutan-Super Express Km (Takara Shuzo Co., Ltd.) para la introducción de mutaciones en la región del de promotor de *gltA*. El método se describe específicamente a continuación. Se sometió a digestión completamente el plásmido pHSG399CS con *Eco*RI y *Sal*I obteniendo genes *gltA* que contienen el fragmento *Eco*RI-*Sal*I, que fueron ligados al fragmento obtenido por digestión completa de pKF19kM (Takara Shuzo Co., Ltd.) con *Eco*RI y *Sal*I. Una vez completada la ligación, se llevó a cabo la transformación con células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Col. Ltd.). Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenían 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de IPTG, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de X-Gal y 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de kanamicina. Después de incubar durante la noche se tomaron las colonias blancas y se obtuvieron transformantes mediante el aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se prepararon plásmidos y el plásmido que contenía el gen *gltA* se denominó pKF19CS.

Se llevó a cabo una PCR usando como molde el plásmido pKF19CS y el DNA sintético fosforilado en 5' indicado en la secuencia de Seq ID No. 9, Seq ID No. 10 y Seq ID No. 11, junto con el cebador de selección procedente del Mutan-Super Express Km. La transformación se llevó a cabo con células competentes de *E. coli* MV1184 (Takara Shuzo Co., Ltd.) usando el producto de la PCR. Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de kanamicina. Después de incubar durante la noche se tomaron las colonias y se obtuvieron transformantes después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se preparó DNA plasmídico. La secuencia de la región del promotor de *gltA* se determinó mediante el método de Sanger [J. Mol. Biol. 143, 161 (1980)] usando DNA sintético que poseía la secuencia de Seq ID No.12. Específicamente, la secuencia se determinó con un Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems) y se analizó mediante el Genetic Analyzer AB1310 (Applied Biosystems). Los plásmidos en los que la región del promotor de *gltA* había sido reemplazada por la secuencia indicada en la Tabla 7 fueron denominados, respectivamente, pKF19CS1, pKF19CS2 y pKF19CS4.

65

## ES 2 335 828 T3

TABLA 7

	región -35	región -10
5	pKF19CS	ATGGCT
	pKF19CS1	ATGGCT
	pKF19CS2	ATGGCT
10	pKF19CS4	TGACA

(3) *Construcción de un plásmido de gltA mutante*

Los plásmidos pKF19CS, pKF19CS1, pKF19CS2 y pKF19CS4 construidos en la etapa (2) fueron sometidos a digestión completa con Sall y EcoRI (Takara Shuzo Co., Ltd.) Por otra parte, el plásmido pSFK6 (Solicitud de Patente Japonesa No. 11-69896, publicada como JP2000-26228) que tenía un origen de replicación derivado del plásmido pAM330 que puede replicarse autónomamente en una bacteria corineforme (Publicación de Patente Japonesa con el Fin de Oposición) ((a las que alude en lo sucesivo como "J.P. KOKAI") No. 58-67699) se sometió a digestión completa con EcoRI y Sall. El fragmento obtenido se ligó con aproximadamente el fragmento de 2,5 kb que contenía el gltA. Una vez completada la ligación, se llevó a cabo la transformación con células competentes de *E. coli* JM109. Las células fueron sembradas en placas del medio L que contenía 10 µg/ml de IPTG, 40 µg/ml de X-Gal y 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche se tomaron las colonias y se obtuvieron los transformantes después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se prepararon plásmidos. Los plásmidos que contenían el gen gltA fueron denominados, respectivamente, pSFKC, pSFKC1, pSFKC2 y pSFKC4.

(4) *Determinación de la expresión de CS partiendo del plásmido de gltA mutante en bacterias corineformes*

El plásmido construido en la etapa (3) anterior fue introducido en la cepa de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. Específicamente, este tratamiento fue realizado mediante el método de impulso eléctrico (J.P. KOKAI No. 2-07791). Los transformantes fueron seleccionados a 31°C con placas de medio CM2B (que comprendía 10 g/l de bactotripton, 10 g/l de extracto de bactolevadura, 5 g/l de NaCl, 10 µl de biotina y 15 g/l de agar; pH 7,0) que contenían 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante dos días, se tomaron las colonias y los transformantes que contenían pSFKC, pSFKC1, pSFKC2 y pSFKC4 fueron denominados, respectivamente, BLCS, BLCS1, BLCS2 y BLCS4, respectivamente, después de aislamiento de colonias individuales. Un medio que tenía la composición indicada en la Tabla 8 fue inoculado con el transformante. El cultivo se continuó a 31°C y se terminó antes de que la glucosa se hubiera consumido completamente. El líquido del cultivo se centrifugó para separar las células. Las células se lavaron con solución de tampón Tris 50 mM (pH 7,5) que contenía 200 mM de glutamato sódico y después se suspendieron en la misma solución tampón. Después de tratamiento con ultrasonidos con UD-201 (TOMY) seguido de centrifugación (10.000 g) las células que permanecían sin romperse fueron separadas obteniendo una solución de la enzima cruda. La actividad de citrato sintasa puede determinarse según Methods Enzymol. 13, 3-11 (1969). Específicamente, la solución de enzima cruda se añadió a una mezcla de reacción que contenía 100 mM de Tris.HCl (pH 8), 0,1 mM de DTNB, 200 mM de glutamato sódico y 0,3 mM de acetil CoA, y se determinó el ruido de fondo como el aumento de absorbancia en 412 nm a 30°C, determinada mediante un espectrofotómetro U-3210 de Hitachi. Después, se añadió ácido oxalacético en una cantidad tal que su concentración final pudiera ser 0,5 mM. Se determinó el aumento de absorbancia en 412 nm, de lo cual se dedujo el valor del ruido de fondo para determinar la actividad de la citrato sintasa. La concentración de proteína de la solución de enzima cruda se determinó mediante el Ensayo de Proteínas (BIO-RAD). Se usó albúmina de suero bovino como la proteína patrón. Los resultados se exponen en la Tabla 9. Se confirmó que la actividad de citrato sintasa de los promotores de gltA mutantes había aumentado en comparación con la del promotor de gltA de tipo salvaje.

TABLA 8

	Ingrediente	Concentración
55	Glucosa	50 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
	MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 mg/l
60	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mg/l
	Hidrolizados de proteína de soja	20 ml/l
	Biotina	0,5 mg/l
65	Clorhidrato de tiamina	2 mg/l

TABLA 9

Cepa	dABS/min/mg	Actividad relativa	Actividad relativa
Tipo salvaje4	6,8	1,0	
BLCS00	38,8	5,7	1,0
BLCS01	57,1	8,4	1,21
BLCS02	92,5	13,6	1,9
BLCS04	239,5	35,2	4,8

(5) *Introducción del gen gltA mutante en un plásmido sensible a la temperatura*

Para integrar en un cromosoma secuencias mutantes del promotor de *gltA* se conoce un método en el que se utiliza un plásmido cuya replicación en una bacteria corineforme es sensible a la temperatura (J.P. KOKAI No. 5-7491). Se usó como vector plasmídico el pSFKT2 (Solicitud de Patente Japonesa No. 11-81693 publicada como JP 2000-270872), cuya replicación en una bacteria corineforme es sensible a la temperatura. Se usaron como las secuencias mutantes del promotor de *gltA* los plásmidos pKFCS1, pKFCS2, y pKFCS3 sometidos a digestión completa con Sall y BstPI y hechos de extremos romos. Estos fueron ligados al pSFKT2, sometido a digestión completa con SmaI. Una vez completada la ligación, se llevó a cabo la transformación con células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía 10 µg/ml de IPTG, 40 µg/ml de X-Gal y 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche se tomaron las colonias blancas y los transformantes fueron obtenidos después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se prepararon plásmidos. Los vectores transportadores sensibles a la temperatura que contenían el gen *gltA* fueron denominados, respectivamente, pSFKTC1, pSFKTC2 y pSFKTC4.

(6) *Introducción del promotor de gltA mutante en un cromosoma*

pSFKTC1, pSFKTC2 y pSFKTC4 fueron introducidos, cada uno, en la cepa de *Brevibacterium lactofermentum* FGR2 mediante el método de impulso eléctrico. Los transformantes fueron seleccionados en placas de medio CM2B que contenía 25 µg/ml de kanamicina, a 25°C. Después de introducir cada uno de los plásmidos, cada una de las cepas obtenida fue cultivada en medio líquido CM2B, sembrada en placas de CM2B que contenía 25 µg/ml de kanamicina, después de dilución hasta una concentración de 10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup> cfu por placa y se cultivó a 34°C. La cepa que tenía el plásmido sensible a la temperatura se hizo sensible a la kanamicina debido a que la replicación del plásmido estaba inhibida a esta temperatura y, por tanto, no podían formarse colonias. Por otra parte, la cepa que tenía DNA plasmídico integrado en el cromosoma pudo ser seleccionada debido a que formaba colonias. Las colonias obtenidas de este modo fueron tomadas y separadas en las respectivas colonias. Desde la cepa se extrajo el DNA cromosómico. Se llevó a cabo una PCR usando el DNA cromosómico como molde y los cebadores de secuencia indicados como Seq ID No. 8 y Seq ID No. 13. Aproximadamente 3 kb de fragmentos amplificados fueron confirmados. De este modo se probó que en esta cepa el gen *gltA* mutante derivado del plásmido sensible a la temperatura, había sido integrado cerca del gen *gltA* en el cromosoma hospedante mediante recombinación homóloga. Las cepas derivadas de los plásmidos pSFKTC1, 2 y 4 fueron denominadas, respectivamente, BLCS11, BLCS12 y BLCS14.

(7) *Preparación de promotores de gltA sustituidos*

Primeramente se obtuvieron cepas sensible a la kanamicina a partir de las cepas BLCS11, BLCS12 y BLCS14 que tenían integrado en ellas obtenido por recombinación homóloga, el gen *gltA* mutante. Las cepas que tenían integrado en ellas el plásmido fueron diluidas y sembradas en placas de medio CMM2B y cultivadas luego a 34°C. Después de la formación de colonias, se obtuvieron réplicas de las placas usando placas de CM2B que contenían 25 µg/ml de kanamicina, y se cultivó a 34°C. De este modo se obtuvieron cepas sensibilizadas a la kanamicina.

Se extrajo el cromosoma de la cepa sensible a la kanamicina y se llevo a cabo una PCR con cebadores que poseían la secuencia indicada en Seq ID No. 7 y Seq ID No. 8, para preparar fragmentos del gen *gltA*. Los fragmentos amplificados obtenidos de este modo fueron purificados con SUPRECO2 (Takara Shuzo Co. Ltd.) y sometidos después a la reacción de secuenciación usando un cebador de Seq ID No. 13 para determinar la secuencia de su región del promotor. Como resultado de ello, la cepa que tenía la misma secuencia del promotor que la del plásmido pKF19CS1 de la Tabla 7, fue denominada GB01, la cepa que tenía la misma secuencia del promotor que la del pKF19CS2 fue denominada GB02 y la cepa que tenía la misma secuencia del promotor que la del pKF19CS4 fue denominada GB03. Se ha indicado que en estas cepas, el gen *gltA* de tipo salvaje, localizado originariamente en el cromosoma, había sido escindido con el plásmido vector, mientras que el gen *gltA* mutante introducido por el plásmido había permanecido en el cromosoma cuando el plásmido y el gen *gltA* duplicado habían sido escindidos desde el cromosoma.

## ES 2 335 828 T3

### (8) Determinación de la actividad de citrato sintasa de cepas del promotor de *gltA* mutante

Las actividades de la citrato sintasa fueron determinadas tratando ñas cepas FGR2, GB01, GB02, GB03 y FGR2/pSFKC obtenidas en la etapa (7) del mismo modo que el de la etapa (4). Los resultados están indicados en la Tabla 10. Se confirmó que la actividad de citrato sintasa de la cepa del promotor de *gltA* sustituido, era mayor que la de sus cepas parentales.

TABLA 10

Cepa	dABS/min/mg	Actividad relativa
FGR2	7,9	1,0
GB01	9,5	1,2
GB02	15,0	1,9
GB03	31,6	4,0
FGR2/pSEKC	61,6	7,8

### (9) Resultados del cultivo de cepas del promotor de *gltA* sustituidas

Cada una de las cepas obtenidas en la etapa (7) anterior, fue inoculada en un medio de cultivo de siembra que tenía la composición indicada en la Tabla 11, y el cultivo se agitó a 31,5°C durante 24 horas. 300 ml de un medio de cultivo principal que tenía la composición que se indica en la Tabla 11, fueron colocados en frascos de vidrio fermentadores, de 500 ml, y después se esterilizó por calentamiento y se inoculó con 40 ml del cultivo de siembra según se ha descrito anteriormente. El cultivo se inició en una temperatura de 31,5°C al tiempo que la velocidad de agitación y el grado de aireación se regulaban a 800 a 1300 rpm y ½ a 1/1 vvm, respectivamente. El pH del líquido de cultivo se mantuvo en 7,5 con amoniaco gaseoso. La temperatura se cambió a 37°C 8 horas después de la iniciación del cultivo. El cultivo se termino cuando la glucosa se había consumido totalmente, en 20 a 40 horas, y se determinó la cantidad de ácido L-glutámico formado y acumulado en el líquido de cultivo.

Como resultado de ello, la mejora más importante en lo referente al rendimiento de ácido L-glutámico se confirmó al usar las cepas GB02 y GB03 en vez de las GB01 y FGR2/pSFKC, como muestra la Tabla 12. De estos hechos se desprende que se habían obtenido buenos resultados introduciendo la mutación en el promotor de *gltA* aumentándose la actividad de CS de 2 a 4 veces para la mejora del rendimiento de ácido glutámico producido mediante estas cepas.

TABLA 11

Ingrediente	Concentración	
	Cultivo de siembra	Cultivo principal
Glucosa	50 g/l	150 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l	2 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g/l	1,5 g/l
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mg/l	15 mg/l
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 mg/l	15 mg/l
Hidrolizado de proteína de soja	20 ml/l	50 ml/l
Biotina	0,5 mg/l	2 mg/l
Clorhidrato de tiamina	2 mg/l	3 mg/l

TABLA 12

Cepa	Ácido glutámico (g/l)
FGR2	8,9
GB01	9,1
GB02	9,4
GB03	9,4
FGR2/pSFKC	9,1

## Ejemplo 4

*Introducción de una mutación en la región del promotor del gen de ICDH de una bacteria corineforme que produce glutamato*

En este Ejemplo fueron producidas cepas que tenían promotores intensificados para genes que codifican glutamato deshidrogenasa, citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa.

(1) *Clonación del gen icd*

La secuencia de DNA del gen *icd* de una bacteria corineforme, que codifica la isocitrato deshidrogenasa, ha sido ya esclarecida [J. Bacteriol. 177, 774-782 (1995)]. Sobre la base de esta secuencia fueron sintetizados los cebadores indicados en Seq ID No. 14 y Seq ID No. 15. Se llevó a cabo una PCR usando DNA cromosómico de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 como molde, amplificando aproximadamente 3 kbp de un fragmento de DNA que contenía el gen *icd* y su promotor. El fragmento amplificado obtenido de este modo fue sometido a digestión completa con EcoRI y mezclado con el obtenido por digestión completa del plásmido pHSG399 (Takara Shuzo Co., Ltd.) con EcoRI realizando la ligación. Una vez completada la ligación, se llevó a cabo la transformación usando células competentes de *E. coli* JM109. Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía 10 µg/ml de IPTG, 40 µg/ml de X-Gal y 40 µg/ml de cloranfenicol. Después de incubar durante la noche, se tomaron las colonias blancas y los transformantes fueron obtenidos después de aislamiento de colonias individuales.

El plásmido que es portador del gen *icd* fue denominado pHSG399*icd*.

(2) *Introducción de mutaciones en el promotor de icd*

La posición exacta del promotor del gen *icd* no ha sido determinada todavía. La posibilidad de aumentar el nivel de transcripción de mRNA del gen *icd*, fue investigada modificando artificialmente la secuencia aguas arriba del gen que codifica ICDH en una secuencia semejante a la del promotor. Específicamente, fueron introducidas mutaciones en la región parecida a -10 existente en la secuencia de DNA aproximadamente 190 bp aguas arriba (el primer promotor) y aproximadamente 70 bp (el segundo promotor) aguas arriba del primer ATG de la proteína de ICDH.

Se usó el Mutan-Super Express Km (Takara Shuzo Co.m Ltd.) para la introducción de mutación en una región aguas arriba del gen *icd*. El método se describe específicamente a continuación. Se sometió a digestión completa el plásmido pHSG399*icd* con PstI obteniendo el promotor del gen *icd* que contenía el fragmento PstI. Los fragmentos fueron ligados con el fragmento obtenido por digestión completa de pKF18kM (Takara Shuzo Co., Ltd.) con PstI. Una vez completada la ligación, se llevó a cabo la transformación con células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Las células fueron sembradas en el medio L que contenía 10 µg/ml de IPTG, 40m µg/ml de X-Gal y 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche se tomaron las colonias blancas y se obtuvieron transformantes después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se prepararon plásmidos y el plásmido que contenía el promotor del gen *icd* fue denominado pKF18*icd*.

Se realizó una PCR usando el plásmido pKF18*icd* como molde y DNA sintético fosforilado en 5' que se muestra en Seq ID No. 16, Seq ID No. 17, Seq ID No. 18, Seq ID No. 19, Seq ID No. 20 y Seq ID No. 21, y el cebador de selección. Estos productos de la PCR fueron usados para transformar células competentes de *E. coli* JM109. Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche, las colonias que se formaron fueron tomadas y los transformantes fueron obtenidos después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se preparó DNA plasmídico y se determinó la secuencia de la región del promotor de *icd* usando el DNA sintético que se indica en Seq ID No. 22, mediante el método de Sanger [J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)]. Específicamente, la secuencia de DNA se determinó con el Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems), y se analizó con el Genetic Analyzer ABI310 (Applied Biosystems). Los plásmidos obtenidos reemplazando la región del promotor de *icd* por la secuencia indicada en la Tabla 7, fueron denominados pKF18ICD1,

## ES 2 335 828 T3

pHF18ICD2, pKF18ICD3, pKF18ICD4, pKF18ICD5 y pKF18ICD6, respectivamente. Entre ellos, el pKF18ICD2 fue sometido a digestión completa con PstI obteniendo el fragmento PstI que contenía el promotor del gen *icd*. El fragmento fue ligado con el fragmento obtenido por digestión completa con PstI del plásmido pKF18kM (Takara Shuzo Co., Ltd.) Una vez completada la ligación se llevó a cabo la transformación con células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.) Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía 10 µg/ml de IPTG, 40 µg/ml de X-Gal y 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche se tomaron las colonias blancas y las cepas transformadas fueron obtenidas después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de las cepas transformadas se prepararon plásmidos y el plásmido que contenía el promotor del gen *icd* fue denominado pKF18ICDM2. Se llevó a cabo una PCR usando como molde el plásmido pKF18ICDM2 y el DNA sintético fosforilado en 5' que se indica en Seq ID No. 20 y Seq ID No. 21, y el cebador de selección. La transformación de células competentes de *E. coli* JM109 se llevó a cabo con el producto de la PCR. Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche las colonias formadas de este modo fueron tomadas y se obtuvieron transformantes después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se prepararon DNA plasmídicos y se determinó la secuencia de la región del promotor de *icd* usando el DNA sintético que se indica en Seq ID No. 22. Los obtenidos reemplazando la región del promotor de *icd* por la secuencia que se indica en la Tabla 13, fueron denominados, respectivamente, pKF18ICD25 y pKF18ICD26.

TABLA 13

Plásmido	Primer promotor	Segundo promotor	Tercer promotor	Cuarto promotor
pKF18ICD	GCGACT	GAAAGT	TTTCCA	CACCAT
pKF18ICD01	GCGACT	TATAAT	TTTCCA	CACCAT
pKF18ICD02	TTGACA	TATAAT	TTTCCA	CACCAT
pKF18ICD03	TTGACT	TAAAGT	TTTCCA	CAECAT
pKF18ICD04	GCGACT	GAAAGT	TTTCCA	TATAAT
pKF18ICD05	GCGACT	GAAAGT	TTGCCA	TATAAT
pKF18ICD06	GCGACT	GAAAGT	TTGACA	TATAAT
pKF18ICD25	TTGACA	TATAAT	TTGCCA	TATAAT
pKF18ICD26	TTGACA	TATAAT	TTGACA	TATAAT

### (3) Construcción de plásmidos para determinar la actividad de un promotor

Para determinar fácilmente la actividad de un promotor un método posible es la determinación indirecta de la actividad del promotor usando un gen informador. Las propiedades deseables que se requieren del gen informador son que la actividad pueda determinarse con facilidad, que incluso cuando se añada un aminoácido a un extremo N terminal la actividad no disminuya grandemente, que la reacción de fondo no tenga lugar y que haya un sitio de escisión con una enzima de restricción, adecuado para la manipulación génica. Debido a que la β-galactosidasa (LacZ) de *E. coli* se usa profusamente como gen informador y que las bacterias del género *Corynebacterium* no poseen capacidad de asimilación de la lactosa [J. Gen. Appl. Microbiol., 18, 399-416 (1972)], se determinó que el gen LacZ era el gen informador óptimo. Después se construyó el plásmido pNEOL que es portador de LacZ como el gen informador (véase la Fig. 3) El proceso de construcción se describe en detalle seguidamente. Se llevó a cabo una PCR usando como molde el DNA cromosómico obtenido de *E. coli* ME8459 (la cepa ME8459 fue depositada en el National Institute of Genetics (Japón)), con el DNA sintético indicado en Seq ID No. 23 y Seq ID No. 24 como el cebador. El producto de la PCR fue sometido a digestión completa con SmaI y BamHI, se ligó después con los fragmentos obtenidos por digestión de pKF3 (Takara Shuzo Co., Ltd.) con HindIII y se obtuvieron extremos romos. Una vez completada la ligación, se realizó la transformación con células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.), Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche las colonias formadas de este modo fueron tomadas y separadas en las respectivas colonias obteniendo la cepa transformada. El plásmido obtenido partiendo de la cepa transformada se denominó pKF3nptII. Después, este plásmido se sometió a digestión con Sall. Por otra parte, el plásmido pSAK4 descrito en el Ejemplo

## ES 2 335 828 T3

1 (1) fue sometido a digestión completa con SmaII y SalI y se hicieron extremos romos. Estos fragmentos fueron ligados juntos para construir el vector transportador pNEO que puede replicarse en una bacteria corineforme. Esta plásmido era capaz de comunicar resistencia al cloranfenicol y resistencia a la kanamicina a los hospedantes. Después el plásmido pNEO fue sometido a digestión completa con SmaI y Sse8387I. Los fragmentos resultantes fueron ligados con los obtenidos mediante digestión completa del pMC1871 (Farmacia Biotech.) con PstI y SmaI. De este modo se construyó el vector transportador pNEOL, que puede replicarse en una bacteria corineforme y que tiene el gen LacZ que carece de 8 aminoácidos en el extremo N-terminal, como gen informador (véase la Fig. 3).

#### (4) Determinación de la actividad del promotor de *icd* mutante

Los plásmidos que tenían el promotor de *icd* mutante construidos en la etapa (2) anteriormente descrita, es decir los plásmidos pKF18ICD1, pKF18ICD2, pKF18ICD3, pKF18ICD4, pKF18ICD5, pKF18ICD6, pKF18ICD25, pKF18ICD26 y pKFICD, fueron sometidos a digestión completa con SacII y PstI y luego hechos de extremos romos. Estos plásmidos fueron ligados con el fragmento obtenido por digestión de pNEOL con SmaI. Una vez completada la ligación, se realizó la transformación con células competentes de *E. coli* JM109. Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía IPTG, X-Gal y 40 µg/ml de cloranfenicol. Después de incubar durante la noche, se tomaron las colonias azules y se obtuvieron las cepas transformadas después de aislamiento de colonias individuales.

Partiendo de las cepas transformadas se prepararon plásmidos. Los plásmidos que tenían una estructura capaz de producir una proteína fusionada de ICDH y LacZ fueron denominados pNEOICD1, pNEOICD2, pNEOICD3, pNEOICD4, pNEOICD5, pNEOICD6, pNEOICD25, pNEOICD26 y pNEOLICD, respectivamente. Cada uno de estos plásmidos o pNEOL fue introducido en *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 mediante el método de impulso eléctrico. Los transformantes fueron seleccionados usando placas de medio CM2B (que comprendía 10 g/l de bactotripton, 10 g/l de extracto de bactolevadura, 5 g/l de NaCl, 10 µg/l de biotina y 15 g/l de agar y que tenía un pH 7,0) conteniendo 25 µg/ml de kanamicina y 40 µg/ml de X-Gal, a 31°C, durante dos días. Una vez completada la introducción, las colonias formadas de este modo fueron tomadas y aisladas como colonias individuales. Los transformantes que contenían pNEOICD1, pNEOICD2, pNEOICD3, pNEOICD4, pNEOICD5, pNEOICD6, pNEOICD25, pNEOICD26 y pNEOLICD fueron denominados BLAC1, BLAC2, BLAC3, BLAC4, BLAC5, BLAC6, BLAC25, BLAC26, BLAC y BNEOL, respectivamente. Todos los transformantes distintos de BNEOL formaron colonias azules. Se prepararon soluciones de enzimas crudas partiendo de los transformantes del mismo modo que el de la etapa (4) del Ejemplo 3, excepto que se usó tampón de lavado y de suspensión "Tampón Z" (que comprendía 10 mM de KCl, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 270 µg/100 mM de 2-ME y NaPi, y que tenía un pH 7,5). La actividad de LacZ se determinó del modo siguiente: se mezcló Tampón Z con la solución de enzima cruda, se añadió a la mezcla resultante ONPG en Tampón Z teniendo la concentración final de 0,8 mg/ml, y se determinó el aumento de la absorbancia a 420 nm, a 30°C con un espectrofotómetro Hitachi U-3210, como la actividad de LacZ. La concentración de proteína de la solución de enzima cruda se determinó mediante el Ensayo de Proteínas (BIO-RAD). Se usó albúmina de suero bovino como la proteína patrón. Los resultados se indican en la Tabla 14. Se confirmó que la actividad de LacZ de la cepa que tenía una mutación en el promotor de *icd* y que expresa la proteína fusionada ICDH-LacZ, era mayor que la que expresaba la proteína fusionada ICDH-LacZ de tipo salvaje.

TABLA 14

Cepa	dABS/min/mg	Actividad relativa
BNEOL	Sin detectar	0,0
BNEOLI	42	1,0
BNEOLI-1	84	2,0
BNEOLI-2	168	4,0
BNEOLI-3	80	1,9
BNEOLI-4	126	3,0
BNEOLI-5	139	3,3
BNEOLI-6	84	2,0
BNEOLI-25	168	4,0
BNEOLI-26	170	4,0

## ES 2 335 828 T3

### (5) Introducción del gen *icd* mutante en un plásmido sensible a la temperatura

Se usó el vector plasmídico pSFKT2 (Solicitud de Patente Japonesa No. 11-81693) cuya replicación en una bacteria corineforme era sensible a la temperatura. Los plásmidos pKF18ICD1, pKF18ICD2, pKF18ICD3, pKF18ICD4, pKF18ICD5, pKF18ICD6, pKFICD25 y pKFICD26 fueron sometidos a digestión completa con PstI y los fragmentos obtenidos se usaron como las secuencias del promotor de *icd* mutante. Los fragmentos obtenidos de este modo fueron ligados con pSFKT2 digerido completamente con PstI. Una vez completada la ligación, se llevó a cabo la transformación con células competentes de *E. coli* JM109 (Takara Shuzo Co., Ltd.). Las células fueron sembradas en placas de medio L que contenía 10 µg/ml de IPTG, 40 µg/ml de X-Gal y 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche, se tomaron las colonias blancas y se obtuvieron cepas transformadas después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de las cepas transformadas se prepararon plásmidos. Los vectores transportadores, sensibles a la temperatura, que contenían el promotor de *icd* fueron denominados pSFKTI1, pSFKTI2, pSFKTI3, pSFKTI4, pSFKTI5, pSFKTI6, pSFKTI25 y pSFKTI26, respectivamente.

### (6) Integración en un cromosoma del promotor de *icd* mutante

Los plásmidos construidos en la etapa (5) anterior fueron introducidos, cada uno, en la cepa de *Brevibacterium lactofermentum* GB02 mediante el método de impulso eléctrico. Los transformantes fueron seleccionados con placas de medio CM2B (que comprendía 10 g/l de bactotripton, 10 g/l de extracto de bacto-levadura, 5 g/l de NaCl, 10 µg/l de biotina y 15 g/l de agar y que tenía pH 7,0), que contenían 25 µg/ml de kanamicina, a 25°C. Una vez completada la introducción, las cepas obtenidas fueron cultivadas en medio líquido CM2B, sembradas en placas de CM2B que contenían 25 µg/ml de kanamicina después de diluir hasta una concentración de 10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup> cfu por placa, y se realizó el cultivo a 34°C. La cepa que tenía el plásmido sensible a la temperatura se hizo sensible a la kanamicina debido a que la replicación del plásmido estaba inhibida a esta temperatura y, por consiguiente, no podía formar colonias. Por otra parte, la cepa que tenía el DNA plasmídico integrado en el cromosoma, pudo ser seleccionada debido a que podía formar colonias. Las colonias obtenidas de este modo fueron tomadas y separadas en colonias aisladas. Se extrajo desde la cepa el DNA cromosómico y se llevó a cabo una PCR usando como molde el DNA cromosómico con los cebadores indicados en Seq ID No. 13 y Seq ID No. 15. Fueron confirmados aproximadamente 3 kb de fragmentos amplificados. Se probó así que en esta cepa el gen *icd* mutante derivado del plásmido sensible a la temperatura había sido integrado cerca del gen *icd* del cromosoma hospedante mediante recombinación homóloga.

### (7) Preparación de cepas que tienen el promotor de *icd* sustituido

En primer lugar, se obtuvieron cepas sensibles a la kanamicina partiendo de las cepas que tenían el gen *icd* mutante integrado en ellas mediante recombinación homóloga, según se ha descrito en la etapa (6). Las cepas que tenían el plásmido integrado en ellas fueron diluidas y sembradas en placas de CM2B y cultivadas luego a 34°C. Después de la formación de colonias se hicieron réplicas sobre placas de CM2B que contenían 25 µg/ml de kanamicina y se incubó a 34°C. De este modo se obtuvieron cepas sensibles a la kanamicina.

Se extrajo el cromosoma desde las cepas resistentes a la kanamicina y se llevó a cabo una PCR usando los cebadores indicados en Seq ID No. 14 y Seq ID No. 15 para preparar fragmentos del gen *icd*. Los fragmentos amplificados obtenidos de este modo fueron purificados con SUPRECO2 (Takara Shuzo Co., Ltd.) y sometidos después a la reacción de secuenciación usando el cebador indicado en Seq ID No. 22, para determinar la secuencia de su región del promotor. Como resultado de ello, las cepas que tenían secuencia del promotor de *icd* derivadas desde pSFKTI1, pSFKTI2, pSFKTI4, pSFKTI5, pSFKTI6, pSFKTI25 y pSFKTI26 fueron denominadas GC01, GC02, GC03, GC04, GC05, GC06, GC25 y GC26, respectivamente. En estas cepas, cuando el plásmido y el gen *icd* duplicado fueron escindidos desde el cromosoma, el gen *icd* de tipo salvaje, originalmente localizado sobre el cromosoma, fue escindido junto con el plásmido vector, mientras que el gen *icd* mutante introducido mediante el plásmido permaneció sobre el cromosoma.

### (8) Determinación de la actividad de la isocitrato deshidrogenasa de las cepas mutantes que tenían el promotor de *icd* mutante

Se preparó una solución de enzima cruda de ICDH usando cada una de las 8 cepas obtenidas en la etapa (7) anterior y la cepa GB02, del mismo modo que el de la etapa (7) del Ejemplo 3. Se determinaron las actividades de ICDH del modo siguiente: La solución de la enzima cruda se añadió a una solución de reacción que contenía 35 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1,5 mM de MnSO<sub>4</sub>, 0,1 mM de NADP y 1,3 mM de ácido isocítrico, y se determinó el aumento de la absorbancia en 340 nm, a 30°C, con un espectrofotómetro U-3210 de Hitachi, como la actividad de ICDH. La concentración de proteína de la solución de enzima cruda se determinó mediante el Ensayo de Proteínas (BIO-RAD). Se usó como proteína patrón albúmina de suero bovino. Los resultados se indican en la Tabla 15. Se confirmó que la actividad de isocitrato deshidrogenasa de cepas de promotor de *icd* sustituido era mayor que la de la cepa parental.

## ES 2 335 828 T3

TABLA 15

Cepa	dABS/min/mg	Actividad relativa
5 GB02	3,9	1,0
GC01	8,2	2,1
10 GC02	19,1	4,9
GC03	7,0	1,8
GC04	12,5	3,2
15 GC05	19,1	4,9
GC06	10,5	2,7
20 GC25	30,4	7,8
GC26	24,2	6,2

(9) Resultados del cultivo de las cepas que contienen el promotor de *icd* sustituido

Cada una de las 8 cepas obtenidas en la etapa (7) anterior fue cultivada del mismo modo que en la etapa (9) del Ejemplo 3. Como resultado, se confirmó la mejora de rendimiento de ácido L-glutámico al usar una cualquiera de las cepas GC02, GC04, GC05. GC25 y GC26, como muestra la Tabla 16. Se encontró se habían obtenido buenos resultados introduciendo la mutación en el promotor de *icd*, aumentándose la actividad de ICDH hasta 3 veces por lo menos.

TABLA 16

Cepa	Ácido L-glutámico (g/dl)
35 GB02	9,2
GC01	9,0
40 GC02	9,5
GC03	9,1
45 GC04	9,4
GC05	9,6
GC06	9,2
50 GC25	9,9
GC26	9,8

Ejemplo 5

*Introducción de una mutación en la región del promotor del gen de PDH de una bacteria corineforme que produce glutamato*

(1) Clonación del gen *pdhA* procedente de bacterias corineformes

Los cebadores indicados en Seq ID No. 25 y Seq ID No. 26, fueron sintetizados seleccionando regiones que tenían una homología elevada entre las subunidades EI de la piruvato deshidrogenasa (PDH) de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*. Se llevó a cabo una PCR usando como molde el cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, preparado con el Kit de Purificación de DNA Genómico, Bacteriano (Advanced Genetic Technologies Corp.), en las condiciones estándar de reacción que se describen en la página 8 de PCR Technology (compilada por H. Erlich y publicada por Stockton Press, 1989). La solución de reacción se

sometió a electroforesis en gel de agarosa encontrándose que se habían amplificado aproximadamente 1,3 kilobases de fragmento de DNA. La secuencia de ambos extremos del DNA obtenido fue determinada con el DNA sintético que se indica en Seq ID No. 25 y Seq ID No. 26, La secuencia se determinó mediante el método de Sanger [J. Mol. Biol., 143, 161 (1980)] con el Kit de Secuenciación de DNA (Applied Biosystems Co.). Una vez determinada la secuencia se dedujo la de los aminoácidos y se comparó con la de las subunidades E1 de piruvato deshidrogenasa derivada de cada una de las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*, encontrando una alta homología entre ellas. Por consiguiente, se determinó que el fragmento de DNA amplificado por PCR era parte del gen *pdhA* que codifica la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. Se llevó a cabo la clonación de la región aguas arriba y aguas abajo del gen. El método de clonación fue el siguiente: Un cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 fue sometido a digestión con las enzimas de restricción EcoRI, BamHI, HindIII, PstI, Sall y XbaI ((Takara Shuzo Co., Ltd.) obteniendo fragmentos de DNA. Se usó para la clonación el Kit de clonación *in vitro* LA PCR, (Takara Shuzo. Co. Ltd.), usando como cebadores las secuencias indicadas en Seq ID No. 27 y Seq ID No. 28 del Listado de Secuencias, para clonar la región aguas arriba, y las secuencias indicadas en Seq ID No. 29 y Seq ID No. 30 como cebadores para clonar la región aguas abajo. Después de llevar a cabo la PCR usando el kit, fragmentos de DNA de aproximadamente 0,5, 2,5, 3,0, 1,5 y 1,8 kilobases fueron amplificados para la región aguas arriba partiendo de los fragmentos obtenidos por digestión con EcoRI, Hind III, PstI, Sall y XbaI, respectivamente, y fragmentos de DNA de aproximadamente 1,5, 3,5 y 1,0 kilobases fueron amplificados para la región aguas abajo, partiendo de los fragmentos obtenidos por digestión con BamHI, HindIII y PstI, respectivamente. Las secuencias de estos fragmentos de DNA fueron determinadas del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Se encontró que los fragmentos de DNA amplificados contenían, además, un marco de lectura abierto de aproximadamente 920 aminoácidos así como que una región que se suponía era la región del promotor, se encontraba presente en la región aguas arriba. Debido a que la secuencia de aminoácidos deducida desde la secuencia de DNA del marco de lectura abierto es altamente homóloga con la subunidad E1 conocida de la piruvato deshidrogenasa, por ejemplo la de *E. coli*, resulta evidente que el marco de lectura abierto era el gen *pdhA* que codifica la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. La secuencia de DNA del marco de lectura abierto se muestra en Seq ID No. 31 del Listado de Secuencias. En Seq ID No. 31 del Listado de Secuencias, la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de DNA, se indica también, Puesto que el resto de metionina del extremo N-terminal de la proteína deriva de ATG que es un codón de iniciación, habitualmente no interviene en la función esencial de la proteína, y es bien sabido que el resto de metionina es separado por el efecto de peptidasa después de la traducción. Por consiguiente, en la proteína descrita, es posible que el resto de metionina del extremo N-terminal haya sido separado. No obstante, la secuencia GTC está presente en 6 bases aguas arriba del codón ATG, indicado en Seq ID No. 31 del Listado de Secuencias y también es posible que algún aminoácido haya sido traducido desde este punto. Piruvato deshidrogenasas de otros microorganismos tales como *E. coli* están compuestas de tres subunidades de E1, E2 y E3 y los genes que las codifican constituyen, en muchos casos, un operón. Sin embargo, ningún marco de lectura abierto fue considerado como que era la subunidad E2 y la subunidad E3 de las piruvato deshidrogenasas de aproximadamente 3 kilobases, aguas abajo del gen *pdhA*. En su lugar se mostró que una secuencia que se suponía que era un terminador, estaba presente en la región aguas abajo del marco de lectura abierto. Considerando estos hechos se supuso que las subunidades E2 y E3 de la piruvato deshidrogenasa de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 estaban presentes en otra región sobre el cromosoma.

## (2) Construcción de un plásmido para amplificar *pdhA*

Ya era evidente que la cepa obtenida mediante introducción de un gen que codifica tres subunidades constituyentes de la PDH de *E. coli*, en *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 proporciona un rendimiento aumentado de ácido glutámico (JP No. 10-360619, Solicitud de patente de prioridad para JP 11-356035, publicada como JP 2000-232.890). Sin embargo, en la PDH de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, solamente había sido clonado el gen *pdhA* que codifica la subunidad E1, y no se había llevado a cabo examen alguno para saber si la amplificación del gen sola es eficaz para mejorar el rendimiento de ácido glutámico. En estas circunstancias, se llevó a cabo un examen para saber si la amplificación del gen *pdhA* sola es eficaz para mejorar o no el rendimiento de ácido glutámico.

Los cebadores indicados en Seq ID No. 33 y Seq ID No. 34, fueron sintetizados sobre la base de las secuencias de DNA previamente clonadas. Se llevó a cabo una PCR usando el cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, preparado con el kit de Purificación de DNA Genómico, Bacteriano (Advanced Genetic Technologies Corp.), como molde, en las condiciones de reacción estándar que se describen en la página 8 de PCR Technology (compilada por H. Erlich y publicada por Stockton Press, 1989) para amplificar el gen *pdhA*. Entre los cebadores así sintetizados, la Seq ID No. 33 correspondía a la secuencia de bases No. 1397 a la No. 1416 del gen *pdhA* descrita en Seq ID No. 32 del Listado de Secuencias. La Seq ID No. 34 era la cadena complementaria de la secuencia de DNA correspondiente a la secuencia de las bases No. 5355 a No. 5374 de la Seq ID No. 32 del Listado de Secuencias, representada desde el lado 5'.

El producto de la PCR obtenido de este modo fue purificado por el método corriente y hecho reaccionar con las enzimas de restricción Sal I y EcoT22I. El fragmento fue ligado con pSFK (Solicitud de Patente No. 11-69896), escindido con las enzimas de restricción Sall y PstI, y ligado con un kit de ligación (Takara Shuzo Co. Ltd.) Después de la transformación con células competentes (Takara Shuzo Co. Ltd.) de *E. coli* JM 109, las células fueron sembradas en placas de medio L (que comprendía 10 g/l de bacto triptona, 5 g/l de extracto de bacto levadura, 5 g/l de NaCl y 15 g/l de agar, y que tenía un pH 7,2) que contenían 10 µg/ml de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido), 40 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido) y 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche se tomaron las colonias blancas y se obtuvieron las cepas transformadas después de aislamiento de colonias individuales.

## ES 2 335 828 T3

Partiendo de las cepas transformadas se prepararon plásmidos mediante el método alcalino (*Seibutsu Kogaku Jikken-sho* compilado por *Nippon Seibutsu Kogaku kai* y publicado por *Baifukan*, página 105, 1992). Se prepararon mapas de enzimas de restricción de fragmentos de DNA insertados en los vectores y se compararon con el mapa de enzimas de restricción del gen *pdhA* indicado en la secuencia No.32 del Listado de Secuencias. Un plásmido que contenía fragmentos de DNA insertados en él, que tenía el mismo mapa de enzimas de restricción que el del gen *pdhA*, fue denominado pSFKBPDHA.

### (3) Introducción del pASFKBPDHA en *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 y GC25, y evaluación de los experimentos de fermentación

Las cepas *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 y GC25 fueron transformadas con el plásmido pSFKBPDHA mediante el método de impulso eléctrico (J.P. KOKAI No. 2-207791) obteniendo las cepas transformadas. El cultivo para producir ácido L-glutámico se llevó a cabo del modo siguiente con las cepas transformadas ATCC 13869/pSFKBPDHA y GC25/pSFKBPDHA obtenidas introduciendo el plásmido pSFKBPDHA en *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 y GC25: Células de ATCC 13869/pSFKBPDHA y GC25/pSFKBPDHA obtenidas por cultivo en placas del medio CM2B que contenía 25 µg/ml de kanamicina, fueron inoculadas en un medio (que comprendía 1 litro de agua pura que contenía 80 g de glucosa, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 30 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g de MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 15 ml de hidrolizado de proteína de soja, 200 µg de clorhidrato de tiamina, 60 µg de biotina, 25 mg de kanamicina y 50 g de CaCO<sub>3</sub> y que tenía un pH ajustado a 8,0 con KOH). Luego el cultivo fue agitado a 31,5°C hasta que el azúcar del medio se había consumido. Los productos obtenidos fueron inoculados en el medio de la misma composición que el descrito anteriormente (para GC25/pSFK6 y GCC25/pSFKBDHA) o el medio con Biotina eliminada de la composición tal como el descrito anteriormente (para ATCC13869/pSFK6 y ATCC13869/pSFKBPDHA), en una cantidad de 5%, y el cultivo en agitación se llevó a cabo a 37°C hasta que el azúcar del medio se había consumido. Como testigo, cepas producidas por transformación de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 y GC25 con el plásmido pSFK6 previamente obtenido, capaz de replicarse autónomamente en bacterias corineformes, mediante el método de impulso eléctrico (J.P. KOKAI No. 2-207791), fueron cultivadas del mismo modo que se ha descrito anteriormente. Una vez completado el cultivo, se determinó la cantidad de ácido L-glutámico acumulada en el medio de cultivo con el Biotic Analyzer AS-210 (un producto de Asahi Chemical Industry Co., Ltd.). Los resultados se exponen en la Tabla 17.

TABLA 17

Cepa	Rendimiento de ácido L-glutámico (g/dl)
ATCC13869/pSFK6	3,6
ATCC13869/pSFKBPDHA	3,8
GC25/pSFK6	5,1
GC25/pSFKBPDHA	5,3

De estos resultados resulta evidente que incluso la amplificación del gen *pdhA* solo es lo suficientemente eficaz para mejorar el rendimiento de Glu en *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 y GC25.

### (4) Construcción de plásmidos para determinar la actividad del promotor de *pdhA* mutado

Para producir un mutante del promotor de la piruvato deshidrogenasa (PDH), se llevó a cabo la determinación de la región del promotor, previamente clonada, del gen *pdhA* de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, así como se realizó la determinación de la diferencia en la expresión ocasionada por la modificación de la región del promotor, determinando la actividad de β-galactosidasa.

La región del promotor del gen *pdhA* se supuso partiendo de la secuencia de DNA que ya había sido esclarecida por clonación. Como resultado se opinó que era posible que la base No. 2252 a la No. 2257 y la No. 2279 a la No. 2284 de Seq ID No. 32 del Listado de Secuencias fueran, respectivamente, la región -35 y la región -10. Por tanto, fueron sintetizados los cebadores indicados como Seq ID No. 35 y Seq ID No. 36 del Listado de Secuencias, y fragmentos de DNA que contenían la región del promotor del gen *pdhA* fueron amplificados por el método de PCR usando el DNA cromosómico de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 como molde. Entre los cebadores sintetizados, Seq ID No. 35 correspondía a la secuencia que se extiende desde la base No. 2194 hasta la base No. 2221 de la Seq ID No. 32; pero la base No. 2198 había sido reemplazada por C, y la base No. 2200 y la base No. 2202 habían sido reemplazadas por G, y había sido insertada la secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción SmaI. La Seq ID No. 36 correspondía a la secuencia que se extiende desde la base No. 2372 hasta la base No. 2398 de Seq ID No. 32, pero la base No. 2393 y la base No. 2394 habían sido reemplazadas por G, y la cadena complementaria de la secuencia de DNA que tenía insertada en ella la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción SmaI,

estaba representada desde el extremo 5'. Se llevó a cabo una PCR usando como molde el cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, preparado con el kit de Purificación de DNA Genómico Bacteriano (Advanced Genetic Technologies Corp.), en las condiciones estándar de reacción descritas en la página 8 de PCR Technology (compilada por H. Erlich y publicada por Stockton Press, 1989) para amplificar la región del promotor del gen pdhA. El producto de la PCR obtenido de este modo fue purificado mediante el método ordinario y hecho reaccionar con la enzima de restricción SmaI. Los fragmentos fueron ligados con el plásmido pNEOL que carece de la región del promotor del gen lacZ que podía replicarse en una bacteria corineforme y que había sido sometido a digestión con la enzima de restricción SmaI. (Ejemplo 4 (3) con un Kit de Ligación (Takara Shuzo Co., Ltd.). Después de la transformación con células competentes (Takara Shuzo Co., Ltd.) de *E. coli* JM109, las células fueron sembradas en placas de medio L (que comprendía 10 g/l de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de bacto-levadura, 5 g/l de NaCl y 15 g/l de agar y que tenía un pH de 7,2), que contenían 40 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa) y 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche, se tomaron las colonias azules y las cepas transformadas fueron obtenidas después del aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se prepararon plásmidos mediante el método alcalino (*Seibutsu Kogaku Jikken-sho* compilado por *Nippon Seibutsu Kogaku-kai* y publicado por *Baifukan*, página 105, 1982). Después de secuenciar fragmentos de DNA insertados en el vector por el método habitual, el plásmido que contenía el fragmento de DNA insertado en él fue denominado pNEOLBPDHAp<sub>rol</sub>.

Además, fueron sintetizados los cebadores indicados como Seq ID No. 37, Seq ID No. 38 y Seq ID No. 39 del Listado de Secuencias, para construir plásmidos en los que se suponía que una región que era el sitio del promotor había cambiado a la secuencia de consenso de promotores de bacterias corineformes. Usando cada uno de los cebadores y el cebador indicado en Seq ID No. 36, fragmentos de DNA en los que la región del promotor del gen pdhA había cambiado a la secuencia de consenso, fueron amplificados mediante el método de PCR usando como molde el DNA cromosómico de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13896. Entre los cebadores sintetizados el de Seq ID No. 37 correspondía a la secuencia que se extiende desde la base No. 2244 hasta la base No. 2273 de Seq ID No. 32; la base No. 2255 había sido reemplazada por C, y la base No. 2257 había sido reemplazada por A; por tanto solamente la región -35 había sido cambiada a la secuencia de consenso de las bacterias corineformes. La Seq ID No. 38 correspondía a la secuencia que se extiende desde la base No. 2249 hasta la base No. 2288 de la secuencia No.32; las bases No. 2279 y No. 2281 habían sido reemplazadas por T; por tanto, solamente la región -10 había sido cambiada a la secuencia de consenso de las bacterias corineformes. La secuencia No. 39 correspondía a la secuencia que se extiende desde la base No. 2249 hasta la base No. 2288 de Seq ID No. 32; la base No. 2255 había sido reemplazada por C, la base no. 2257 había sido reemplazada por A y las bases No. 2279 y No. 2281 habían sido reemplazadas por T; por tanto, ambas regiones, la región -35 y la región -10, habían sido cambiadas a la secuencia de consenso de las bacterias corineformes. Se llevó a cabo una PCR usando como molde cromosomas de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, preparados con el Kit de Purificación de DNA Genómico Bacteriano (Advanced Genetic Technologies Corp.), en las condiciones estándar de reacción descritas en la página 8 de PCR Technology (compilado por H. Erlich y publicado por Stockton Press, 1989), para amplificar la región del promotor del gen pdhA con estos cebadores de modo que la región de promotor había cambiado a la secuencia de consenso. Los productos de la PCR obtenidos de este modo fueron purificados por el método habitual y hechos reaccionar con la enzima de restricción SmaI. Los fragmentos fueron ligados con el plásmido pNEOL que carece de la región del promotor del gen lacZ, que podía replicarse en una bacteria corineforme y que había sido escindido con enzimas de restricción SmaI, con el Kit de Ligación (Takara Shuzo Co., Ltd.). Después de la transformación con células competentes (Takara Shuzo Co., Ltd.) de *E. coli* JM109, las células fueron sembradas en placas de medio-L (que comprendía 10 g/l de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de bacto-levadura, 5 g/l de NaCl y 15 g/l de agar y que tenía un pH de 7,2), que contenían 40 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa) y 25 µg/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche, se tomaron las colonias azules y las cepas transformadas fueron obtenidas después del aislamiento de colonias individuales. Partiendo de las cepas transformadas se prepararon plásmidos mediante el método alcalino (*Seibutsu Kogaku Jikken-sho* compilado por *Nippon Seibutsu Kogaku-kai* y publicado por *Baifukan*, página 105, 1982). Después de secuenciar fragmentos de DNA insertados en el vector por el método habitual, el plásmido que contenía insertado en él los fragmentos de DNA, en los que solamente la secuencia de la región -35 había sido cambiada a la secuencia de consenso, fue denominado pNEOLBPDHAp<sub>ro35</sub>; el plásmido que contenía insertado en él fragmentos de DNA en los que solamente la secuencia de la región -10 había sido cambiada a la secuencia de consenso, fue denominado pNEOLBPDHAp<sub>ro10</sub>; y el plásmido que contenía insertado en él fragmentos de DNA en los que las secuencias de ambas regiones, la región -35 y la región -10, habían sido cambiadas a la secuencia de consenso, fue denominado pNEOLBPDHAp<sub>ro3510</sub>.

(5) La evaluación de la actividad del promotor de *pdhA* mutado

*Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 fue transformada con los plásmidos denominados pNEOLBPDHApr1, pNEOLBPDHApr10 y pNEOLBPDHApr3510 mediante el método de impulso eléctrico (J.P. KOKAI No. 2-207791) obteniendo las cepas transformadas. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa de los transformantes obtenidos se determinó mediante el método descrito en el Ejemplo 4(4). Después de cambiar la secuencia de la región del promotor a la secuencia de consenso, las actividades de  $\beta$ -galactosidasa fueron las expuestas en la Tabla 18, en la que la actividad enzimática de la  $\beta$ -galactosidasa que tenía la región del promotor del gen *pdhA* se indica como 1.

TABLA 18

Cepa	Actividad de $\beta$ -galactosidasa (valor relativo)
ATCC13869/pNEOLBPDHApr1	1
ATCC13869/pNEOLBPDHApr10	6
ATCC13869/pNEOLBPDHApr3510	7,5

Estos resultados indican que la región del promotor supuesta era el promotor del gen *pdhA* y que la expresión de *pdhA* puede cambiarse (intensificarse) cambiando la secuencia de esta región a la secuencia de consenso. Este hecho indica que la expresión puede cambiarse, sin usar plásmidos, cambiando la región del promotor del gen *pdhA*.

## (6) Construcción de plásmidos para preparar cepas variadas de promotor

Dado que se había probado que la expresión de *pdhA* puede cambiarse introduciendo mutaciones en el promotor, se construyeron plásmidos para preparar cepas modificadas con el promotor de *pdhA*. Se realizaron tres construcciones de los plásmidos para las cepas modificadas con el promotor. Estos eran plásmidos en que la región -35, la región -10 y ambas de ellas habían sido cambiadas a la secuencia de consenso, respectivamente.

Los cebadores indicados en Seq ID No. 40 y Seq ID No. 41, fueron sintetizados de nuevo sobre la base de la secuencia de DNA que ya había sido clonada. Entre los cebadores sintetizados el Seq ID No. 40 era la cadena complementaria de la secuencia de DNA que correspondía a una secuencia que se extiende desde la base No. 2491 hasta la base No. 2521 de la Seq ID No. 32, que estaba representada desde el extremo 5' y a la que corresponde una secuencia que comprende tres A's seguidas de cuatro T's en el extremo 5' terminal. La Seq ID No. 33 era la cadena complementaria de la secuencia de DNA que correspondía a la secuencia que se extiende desde la base No. 5020 hasta la base No. 5039 del gen *pdhA* de la Seq ID No. 32, que estaba representada desde el extremo 5'. Se llevó a cabo una PCR usando como cebadores la Seq ID No. 33 y la Seq ID No. 40 y como molde el cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, preparado con el Kit de Purificación de DNA Genómico Bacteriano (Advanced Genetic Technologies Corp.), en las condiciones estándar de reacción que están descritas en la página 8 de PCR Technology (compilado por H. Erlich y publicado por Stockton Press, 1989). Después, se llevó a cabo una PCR usando la Seq ID No. 39 y la Seq ID No. 41 y el cromosoma de *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. como molde Los productos de la PCR obtenidos de este modo fueron purificados del modo habitual. La PCR se llevó a cabo usando como cebadores los productos de PCR obtenidos usando la Seq ID No. 33 y la Seq ID No. 40, los productos de PCR obtenidos usando la Seq ID No. 39 y la Seq ID NO. 41 y las Seq ID No. 33 y 41. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: La concentración de estos cuatro DNAs podía ser 10  $\mu$ M en el "cocktail" de reacción, y se usó La taq (Takara Shuzo Co., Ltd.), sin molde. Los productos de la PCR fueron purificados por el método habitual, y hechos reaccionar con las enzimas de restricción Sall y XhoI. Los fragmentos obtenidos de este modo fueron ligados con los fragmentos obtenidos por digestión con Sall del plásmido pSFKT2 sensible a la temperatura, que puede replicarse en una bacteria corineforme, usando el Kit de Ligación (Takara Shuzo Co., Ltd.). Después de la transformación con células competentes (Takara Shuzo Co. Ltd.) de *E. coli* JM109, las células fueron sembradas en placas de medio L (que comprendía 10 g/l de bactotripton, 5 g/l de extracto de bacto-levadura, 5 g/l de NaCl y 15 g/l de agar y que tenía un pH de 7,2) que contenían 10  $\mu$ g/ml de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido), 40  $\mu$ g/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosidasa) y 25  $\mu$ g/ml de kanamicina. Después de incubar durante la noche, se tomaron las colonias blancas y se obtuvieron transformantes después de aislamiento de colonias individuales. Partiendo de los transformantes se prepararon plásmidos mediante el método alcalino (*Seibutsu Kogaku Jikken-sho* compilado por *Nippon Seibutsu Kogaku-kai* y publicado por *Baifukan*, página 105, 1982). Después de secuenciar fragmentos de DNA insertados en el vector, la secuencia de bases se comparó con la del gen *pdhA* indicada en la secuencia No. 32. El plásmido que contenía insertado en él fragmentos de DNA, en los que solamente las secuencias de la región -35 y de la región -10 del promotor habían sido cambiadas a la secuencia de consenso de las bacterias corineformes, fue denominado pSFKTPDHApro3510.

Un plásmido en el que la región -35 del promotor del gen *pdhA* había sido cambiada a la secuencia de consenso de bacterias corineformes, y también un plásmido en el que la región -10 del promotor del gen *pdhA* había sido cambiada a la secuencia de consenso de bacterias corineformes, fueron construidos del mismo modo que se ha descrito

## ES 2 335 828 T3

anteriormente, excepto que la Seq ID No. 39 del Listado de Secuencias fue reemplazada por la Seq ID No. 37 y Seq ID No. 38, respectivamente. Estos plásmidos fueron denominados pSFKTPDHApro35 y pSFKTPDHApro10, respectivamente.

### 5 (7) Preparación de cepas modificadas con promotor

Se prepararon cepas que tenían el promotor del gen *pdhA* modificado mediante el método de recombinación homóloga usando el plásmido para preparar cepas variadas de promotor construidas en la etapa (6) anteriormente descrita.

10 En primer lugar, la cepa GC25 fue transformada con el plásmido pSFKTPDHApro3510 para preparar una cepa modificada con el promotor mediante el método de impulso eléctrico ( J.P. KOKAI No. 2-207791). Las células fueron sembradas en placas de medio CM2B (que comprendía 10 g/l de polipeptona, 5 g/l de extracto de bacto-levadura, 5 g/l de NaCl, 10  $\mu$ g/ml de biotina y 15 g/l de agar y que tenía un pH de 7,2) y se realizó el cultivo a 25°C obteniendo cepas transformadas. Estos transformantes fueron cultivados en medio líquido CM2B, en tubos de ensayo, durante la noche, y luego fueron sembrados en placas de medio CM2B que contenían 25  $\mu$ g/ml de kanamicina y se realizó el cultivo a 15 34°C, obteniendo una cepa causada por recombinación inmediata que contenía el plásmido pSFKTPDHApro3510 en su cromosoma insertado por el método de recombinación homóloga. Después de aislamiento de colonias individuales, esta cepa fue cultivada en medio líquido CM2B en tubos de ensayo, durante la noche. Después de dilución adecuada, se sembró en placas de medio CM2B y se realizó el cultivo a 31,5°C. Después de que las colonias empezaron a aparecer, las réplicas fueron hechas en placas de medio CM2B que contenían 25  $\mu$ g/ml de kanamicina, obteniendo cepas sensibles a la kanamicina. Puesto que pudieran haber sido producidas dos tipos de cepas, es decir, una cepa que tuviera la secuencia de la cepa de tipo salvaje para la región del promotor del gen *pdhA* y otra cepa que tuviera la mutación introducida en ella, esta región fue secuenciada. De este modo se obtuvo una cepa modificada en el promotor 20 en la que la mutación había sido introducida en la región del promotor del gen *pdhA*. En esta cepa, la región -35 y la región -10 del promotor del gen *pdhA* habían sido cambiadas a la secuencia de consenso de bacterias corineformes. Esta cepa fue denominada GD3510.

Del mismo modo descrito se obtuvieron cepas en las que la región -35 o la región -10 del promotor del gen *pdhA* habían sido cambiadas a la secuencia de consenso de bacterias corineformes, excepto que el plásmido pSFKTPDHApro3510 descrito para producir la cepa modificada en el promotor había sido reemplazado por los plásmidos pSFKTPDHApro35 y pSFKTPDHApro10 produciendo cepas modificadas en el promotor y estas cepas fueron denominadas GD35 y GD10, respectivamente.

### 35 (8) Evaluación de los resultados de cultivo en frasco, de cepas modificadas con el promotor del gen *pdhA*

El cultivo en frasco utilizado para producir ácido L-glutámico se llevó a cabo con tres tipos de cepas modificadas con el promotor del gen *pdhA*, obtenidas según se ha descrito antes. Cada una de las células de las cepas modificadas con promotor, GD3510, GD35, GD10 y GC25, obtenidas por cultivo en placas de medio CM2b, fue inoculada en un medio (que comprendía 1 litro de agua pura que contenía 30 g de glucosa, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15 ml de hidrolizado de soja, 200  $\mu$ g de clorhidrato de tiamina, 60  $\mu$ g de biotina y 50 g de  $\text{CaCO}_3$ , y que tenía un pH ajustado a 8,0 con KOH). Después el cultivo se agitó a 31,5°C hasta que el azúcar del medio se hubo consumido. Los productos obtenidos fueron inoculados en un medio de la misma composición que el descrito anteriormente, en una cantidad de 5% y se llevó a cabo el cultivo en 45 agitación a 37°C hasta que el azúcar del medio se hubo consumido. Una vez completado el cultivo, se determinó la cantidad de ácido L-glutámico que se había acumulado en el líquido de cultivo, con un Biotic Analyzer AS-210 (un producto de Asahi Chemical Industry Co., Ltd.). Los resultados se exponen en la Tabla 19.

50 TABLA 19

Cepa	Ácido glutámico (g/dl)
GC25	1,9
GD35	2,0
GD10	2,0
GD3510	2,1

Resulta evidente de los resultados expuestos que las cepas obtenidas modificadas con el promotor proporcionaban rendimientos mejorados de Glu.

65

## Ejemplo 6

*Introducción de una mutación en la región del promotor del gen GDH de una bacteria corineforme que produce glutamato*

5

(1) *Construcción de plásmidos de gdh mutantes*

Plásmidos que tenían la secuencia del promotor de GDH de la cepa FGR1 y de la cepa FGR2 descritas en el Ejemplo 2, fueron construidos mediante mutagénesis dirigida al sitio. Para obtener la secuencia del promotor de GDH de la cepa FGR1, se llevó a cabo una PCR usando el DNA sintético indicado en Seq ID No. 57 y el DNA sintético indicado en el No. 60, como los cebadores, y el DNA cromosómico de la cepa ATCC13869 como molde; y, por otra parte, se realizó una PCR usando el DNA sintético indicado en Seq ID No. 58 y el DNA sintético indicado en Seq ID No. 59 como cebadores, con el DNA cromosómico de la cepa ATCC 13869 como molde. También, se llevó a cabo una PCR usando los DNAs sintéticos indicados en Seq ID No. 57 y Seq ID No. 58 como cebadores, con una mezcla de estos productos de PCR como molde. El producto de PCR obtenido de este modo fue insertado en el sitio SmaI de pSFKT2 (Solicitud de Patente Japonesa No. 11-69896) construyendo el plásmido pSFKTG11. Para obtener la secuencia del promotor de GDH de la cepa FGR2, se llevó a cabo una PCR usando el DNA sintético indicado en Seq ID No. 57 y el DNA sintético indicado en Seq ID No. 62 como cebadores, y el DNA cromosómico de la cepa ATCC13869 como molde; y, por otra parte, se realizó una PCR usando el DNA sintético indicado en Seq ID No. 58 y el DNA sintético indicado en Seq ID No. 61 como cebadores y el DNA cromosómico de ATCC 13869 como molde. Además, se llevó a cabo una PCR usando el DNA sintético indicado en Seq ID No. 57 y Seq ID No. 58 como cebadores, y una mezcla de estos productos de PCR como molde. El producto de la PCR obtenido de este modo fue insertado en el sitio SmaI de pSFKT2 (Solicitud de Patente Japonesa No. 11-69896) construyendo el plásmido pSFKTG07. Se determinaron las secuencias de DNA de los fragmentos insertados en los sitios SmaI de pSFKTG11 y pSFKTG07 para confirmar que ninguna mutación se había introducido en otras regiones distintas de la región del promotor de GDH.

25

(2) *Construcción de cepas modificadas con el promotor de gdh*

Luego, los plásmidos pSFKTG11 y pSFKTG07 fueron introducidos en la cepa AJ13029 mediante el método de impulso eléctrico, y los transformantes que crecieron en placas de medio CM2B que contenían 25 µg/ml de kanamicina, a 25°C, fueron seleccionados. Los transformantes fueron cultivados a 34°C para seleccionar cepas que fueran resistentes a la kanamicina a 34°C. El hecho de que una cepa sea resistente a la kanamicina a 34°C, indica que el pSFKTG11 ó el pSFKTG07 estaba integrado en el cromosoma de la cepa AJ13029. Se obtuvieron cepas sensibles a la kanamicina desde las cepas en las que el plásmido estaba integrado en el cromosoma. Las secuencias del promotor de GDH de estas cepas fueron determinadas. Las cepas que tenían la misma secuencia del promotor de gdh que las de pSFKTG11 y el pSFKTG07, fueron denominadas GA01 y GA02, respectivamente.

35

(3) *Confirmación de la productividad de ácido L-glutámico de cepas modificadas con el promotor de gdh*

Las productividades de ácido glutámico de las cepas GA01 y GA02 y de la cepa parental AJ13029 fueron confirmadas del mismo modo que el del Ejemplo 2 (2) anteriormente indicado. Como resultado, se reconoció una mejora notable en la acumulación de ácido glutámico en las cepas GA01 y GA02, como muestra la tabla 23.

40

TABLA 23

45

Cepa	Glu(g/dl)	Actividad específica de GDH	Valor relativo
AJ13029	2,6	7,7	1,0
GA01	3,0	22,3	2,9
GA02	2,9	27	3,5

50

55

4) *Construcción de plásmido de gdh del tipo de auto-clonación*

En primer lugar se construyó el vector de auto-clonación pAJ220. El pAJ226 (J. P. KOKAI No. 61-152289) se trató con EcoRV y PstI preparando un fragmento que contenía una región que podía replicarse autónomamente en una bacteria corineforme. El fragmento fue ligado con aproximadamente 0,7 kb del fragmento de DNA obtenido tratando pAJ224 (J. P. KOKAI No. Sho 61-152289) con EcoRV y PstI obteniendo el plásmido pAJ220. Este plásmido podía replicarse autónomamente en una bacteria corineforme y podía proporcionar al huésped resistencia a trimetoprima.

60

Se llevó a cabo una reacción de PCR usando el DNA sintético indicado en Seq ID No. 63 y Seq ID No. 64 como cebadores, y el DNA cromosómico de la cepa ATCC13869 de bacteria corineforme de tipo salvaje, como molde. El fragmento del gen gdh obtenido de este modo se insertó en el sitio Ball de pAJ220 construyendo el pAJ220G. El promotor estaba presente cerca del sitio Ball del pAJ220, y la expresión del gen insertado resultó aumentada

65

## ES 2 335 828 T3

dependiendo de la dirección del gen insertado en el sitio Ball. El pAJ220G y el pGDH fueron introducidos en la cepa ATCC 13869 mediante el método de impulso eléctrico. Las actividades de GDH de las cepas construidas de este modo fueron determinadas por el método expuesto en la etapa (1) antes descrita. Como resultado de ello, la actividad de GDH de la cepa en la que había sido introducido el pAJ220G era, aproximadamente, 1,5 veces mayor que el de la cepa en la que había sido introducido el pGDH como muestra la tabla 24.

TABLA 24

Cepa	Actividad específica de GDH	Valor relativo
ATCC13869	7,7	1,0
ATCC13869/pGDH	82,7	10,7
ATCC13869/pAJ220G	120,1	15,6

(5) *Investigaciones sobre la influencia de la actividad de gdh sobre el rendimiento y el Asp obtenido como subproducto*

El pGDH y el pAJ220G fueron introducidos en la cepa AJ13029 mediante el método de impulso eléctrico. Cada una de estas cepas y las obtenidas en la etapa (2) anteriormente descrita, fue inoculada en un medio de cultivo de siembra (semilla) que tenía la composición indicada en la Tabla 22 y se llevó a cabo el cultivo en agitación a 31,5°C durante 24 horas, obteniendo el cultivo de siembra. 300 ml de medio para el cultivo principal, que tenía la composición indicada en la Tabla 22, fueron colocados en cada uno de frascos de vidrio de fermentación, de 500 ml, y después se esterilizó por calentamiento. 40 ml de los cultivos de siembra descritos fueron inoculados en el medio. El cultivo se inició a una temperatura de 31,5°C al tiempo que la velocidad de agitación y el grado de aireación se regulaban, respectivamente, en 800 a 1300 rpm y ½ a 1/1 vvm. El pH del líquido del cultivo se mantuvo en 7,5 con amoníaco gaseoso. La temperatura se cambió a 37°C 8 horas después de iniciar el cultivo. El cultivo se concluyó cuando la glucosa se había consumido completamente, en 20 a 40 horas, y se determinó la cantidad de ácido L-glutámico producido y acumulado en el líquido de cultivo (Tabla 23). La actividad de GDH para obtener el máximo rendimiento fue, aproximadamente, 3 veces tan alta. Cuando la actividad de GDH se elevó adicionalmente, el grado de mejoría del rendimiento se redujo. Cuando la actividad de GDH se elevó hasta 16 veces, aproximadamente, el rendimiento se redujo bastante. Los aminoácidos obtenidos como subproductos fueron analizados con el Analizador de Aminoácidos L-8500, de Hitachi, encontrándose que a medida que se elevaba la actividad de GDH, la cantidad de ácido aspártico y de alanina que se habían acumulado, aumentaba. Estos resultados prueban los hechos siguientes: Para aumentar el rendimiento de ácido glutámico es necesario aumentar de modo adecuado la actividad de GDH para no causar un aumento notable de la cantidad de ácido aspártico y de alanina que se producen. Uno de los métodos eficaces para ello comprende la introducción de mutaciones diversas en el promotor de gdh para regular la actividad de GDH a 3 veces, aproximadamente, tan alta como la de la cepa parental.

TABLA 25

Ingrediente	<u>Concentración</u>	
	Cultivo de siembra	Cultivo principal
Glucosa	50 g/l	150 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l	2 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,4 g/l	1,5 g/l
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 mg/l	15 mg/l
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 mg/l	15 mg/l
Hidrolizado de proteína de soja	20 ml/l	50 ml/l
Biotina	0,5 mg/l	2 mg/l
Clorhidrato de tiamina	2 mg/l	3 mg/l

# ES 2 335 828 T3

TABLA 26

5	Cepa	Glu (g/dl)	Asp (mg/dl)	Ala (mg/dl)	Actividad relativa de GDH	Valor relativo
10	AJ 13029	8,3	49	60	7,7	1,0
	GA01	9,0	145	152	22,3	2,9
	GA02	8,9	153	155	27,0	3,5
15	AJ13029/pGDH	8,8	201	190	82,7	10,7
	AJ13029/pAJ220G	7,5	290	590	120,12	15,6

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

5 1. Un método de producción de ácido L-glutámico, que comprende la etapa de cultivar una bacteria corineforme que expresa una enzima codificada por un gen que biosintetiza ácido L-glutámico, seleccionada entre el grupo que consiste en glutamato deshidrogenasa (GDH), citrato sintasa (CS), isocitrato deshidrogenasa (ICDH), piruvato deshidrogenasa (PDH) y aconitasa (ACO), y en el que una secuencia del promotor de dicho gen que biosintetiza ácido L-glutámico, situada sobre un cromosoma de la bacteria, contiene por lo menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en

- 10 i) una secuencia TTGTCA, TTGACA o TTGCCA en la región -35 de la secuencia del promotor;
- ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y
- 15 iii) una combinación de (i) y (ii).

20 2. El método según la reivindicación 1, en el que el promotor del gen de GDH contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

- i) una secuencia TTGTCA, TTGACA o TTGCCA en la región -35 de la secuencia del promotor;
- ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y
- 25 iii) una combinación de (i) y (ii).

30 3. El método según la reivindicación 1, en el que el promotor del gen de CS contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

- i) la secuencia TTGACA en la región -35 de la secuencia del promotor;
- ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y
- 35 iii) una combinación de (i) y (ii).

40 4. El método según la reivindicación 1, en el que el promotor del gen de ICDH contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

- i) la secuencia TTGACA en la región -35 de la secuencia del promotor;
- ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y
- 45 iii) una combinación de (i) y (ii).

50 5. El método según la reivindicación 1, en el que el promotor del gen de PDH contiene al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

- i) la secuencia TTGCCA en la región -35 de la secuencia del promotor;
- ii) la secuencia TATAAT en la región -10 de la secuencia del promotor; y
- 55 iii) una combinación de (i) y (ii).

60 6. Un método de producción de ácido L-glutámico, que comprende la etapa de cultivar una bacteria corineforme que expresa una enzima codificada por el gen de citrato sintasa (CS), en el que una secuencia del promotor del gen de CS colocada sobre un cromosoma de la bacteria, contiene la secuencia ATGGCT en la región -35 de la secuencia del promotor y la secuencia TATAAC en la región -10 de la secuencia del promotor.

65

FIG. 1

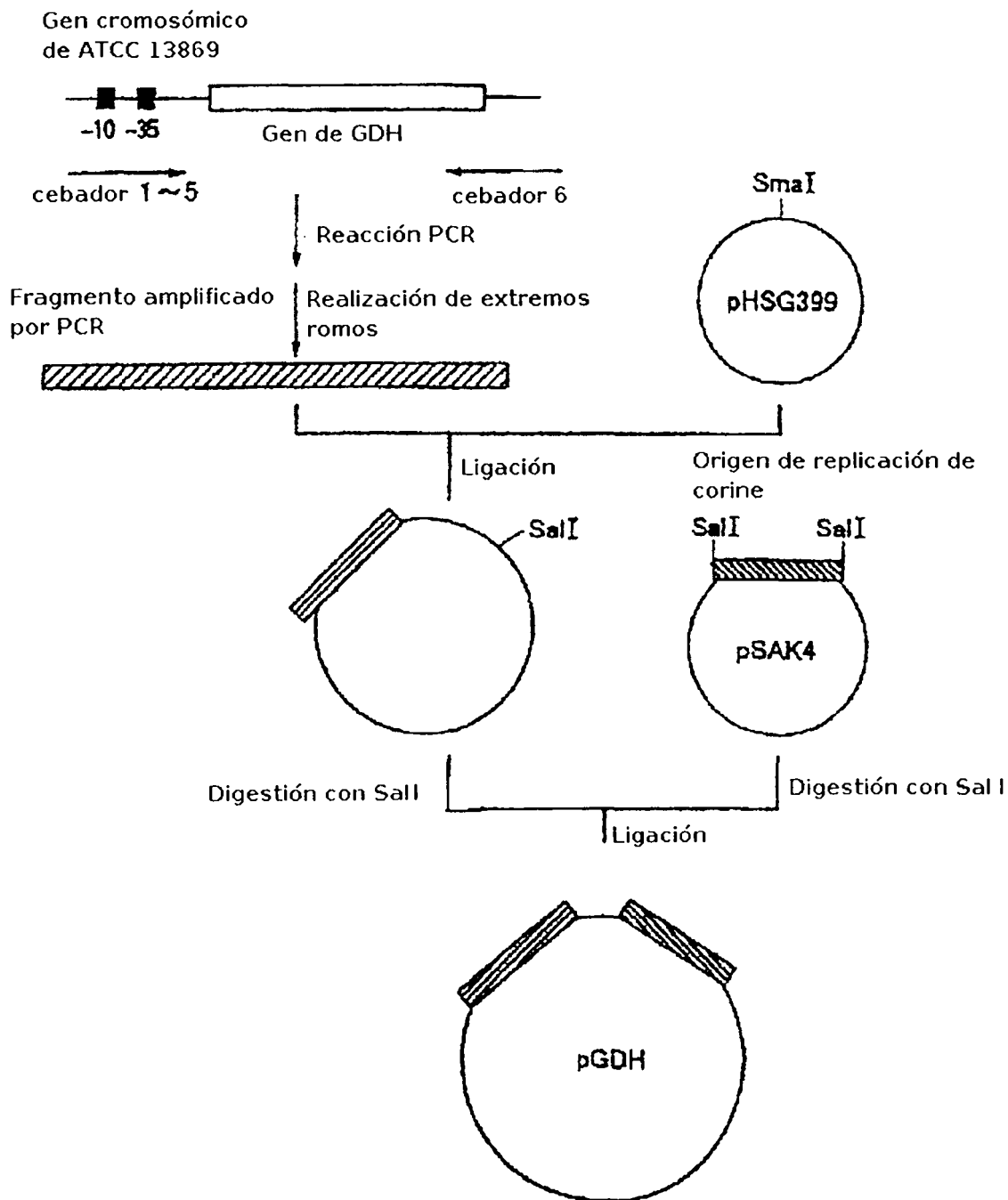


FIG. 2

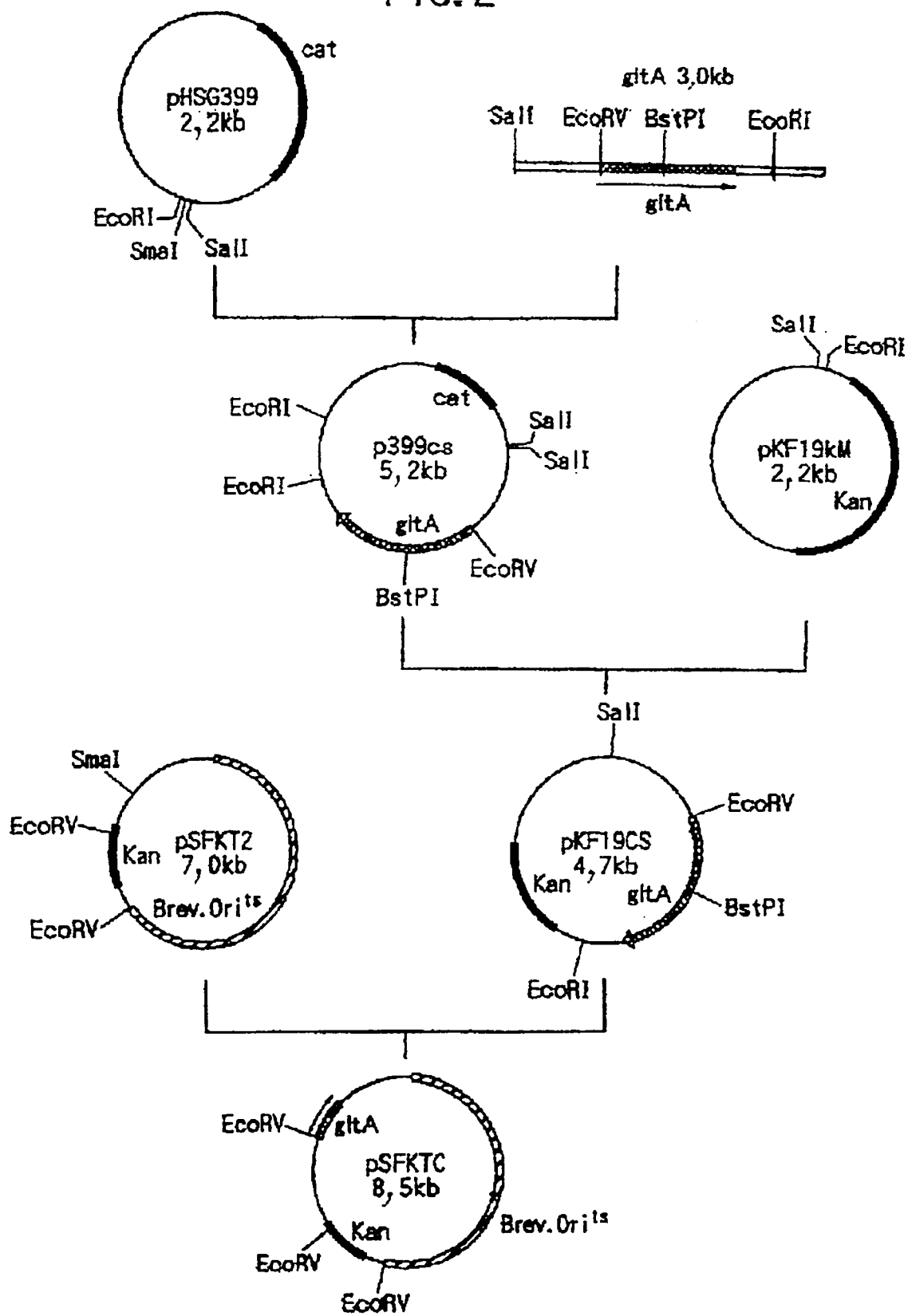
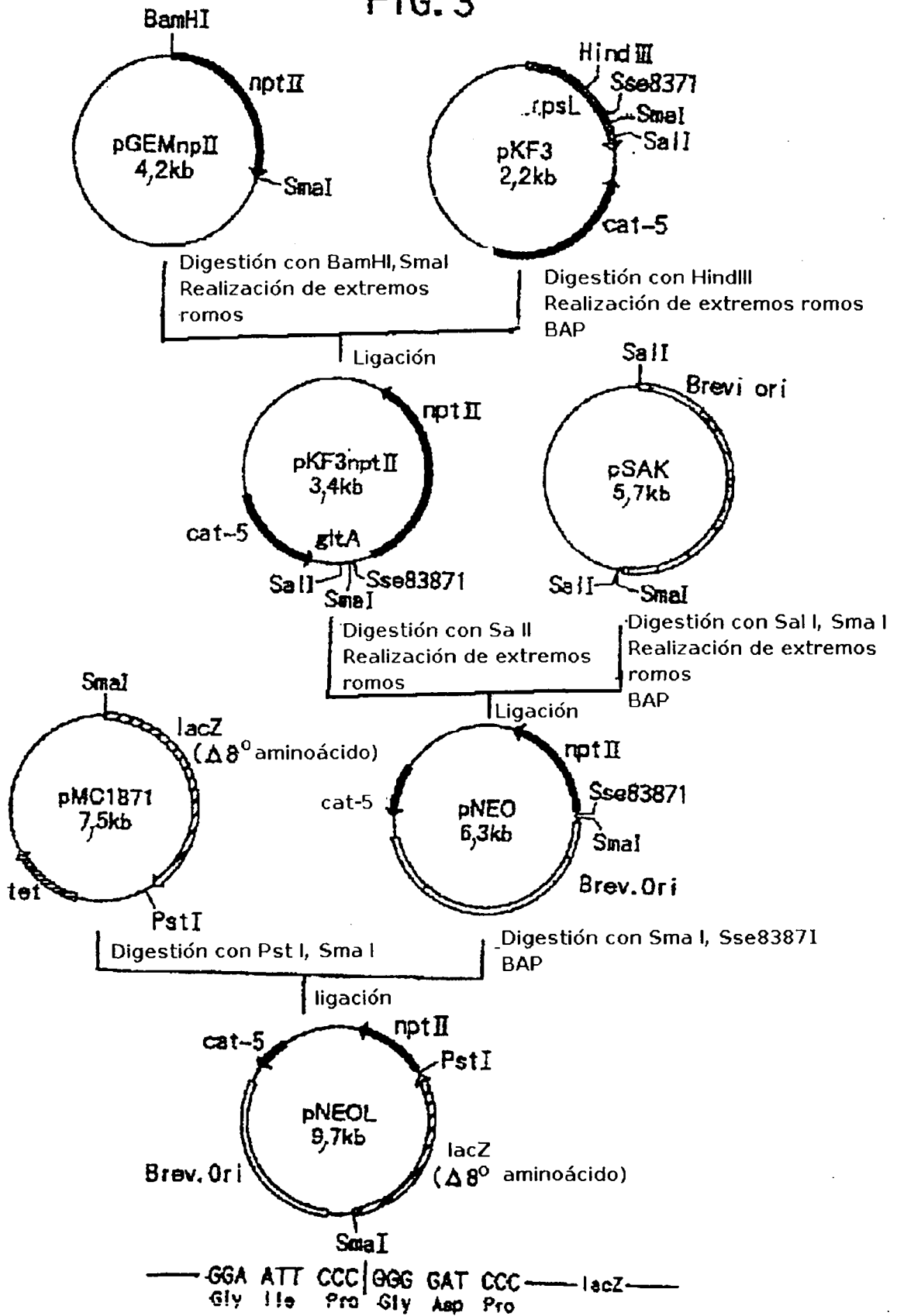


FIG. 3



# ES 2 335 828 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Ajinomoto Co. Inc.
- 5 <120> Método de construcción de una bacteria que produce aminoácidos y método de preparación de aminoácidos por fermentación con la bacteria construida que produce aminoácidos
- <130> Y1G-0426
- <160> 6
- 10 <210> 1
- <211> 46
- <212> ácido nucleico
- 15 <400> 1
- ttaattcttt gtggtcatat ctgcgacact gccataatt gaacgt
- 20 <210> 2
- <211> 46
- <212> ácido nucleico
- 25 <400> 2
- ttaattcttt gcggtcatat ctgcgacact gccataatt gaacgt
- 30 <210> 3
- <211> 46
- <212> ácido nucleico
- 35 <400> 3
- ttaattcttt gtggtcatat ctgcgacact gctataatt gaacgt
- 40 <210> 4
- <211> 46
- <212> ácido nucleico
- 45 <400> 4
- ttaattcttt gttgacatat ctgcgacact gctataatt gaacgt
- 50 <210> 5
- <211> 46
- <212> ácido nucleico
- 55 <400> 5
- ttaattcttt gttgccatat ctgcgacact gctataatt gaacgt
- 60 <210> 6
- <211> 46
- <212> ácido nucleico
- 65 <400> 6
- ttaattcttt gttgtcatat ctgogacact gctataatt gaacgt

## ES 2 335 828 T3

<210> 7

<211> 30

<212> ácido nucleico

5 <220> cebador A para la clonación de gltA procedente de *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 7

10 gtcgacaata gcctgaatct gttctggtcg

<210> 8

<211> 30

15 <212> ácido nucleico

<220> cebador B para la clonación de gltA procedente de *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 8

20 aagcttatcg acgtcccct ccccaccgtt

<210> 9

25 <211> 20

<212> ácido nucleico

<220> cebador 1 para introducir una mutación en el promotor de gltA

30 <400> 9

atcggataa cgtgtaacc

35 <210> 10

<211> 20

<212> ácido nucleico

40 <220> cebador 2 para introducir una mutación en el promotor de gltA

<400> 10

atcggataa tgtgtaacc

45

<210> 11

<211> 40

<212> ácido nucleico

50 <220> cebador 4 para introducir una mutación en el promotor de gltA

<400> 11

55 gatttgacaa aaccgcattt atcggataa tgtgtaacc

<210> 12

60 <211> 28

<212> ácido nucleico

<220> cebador de la secuencia del promotor de gltA

65 <400> 12

agggatccgt ccagtctcag acagcatc

## ES 2 335 828 T3

<210> 13  
<211> 17  
<212> ácido nucleico  
5 <220> cebador universal M13RV  
  
<400> 13  
  
10 caggaaacag ctatgac  
  
<210> 14  
<211> 20  
15 <212> ácido nucleico  
<220> cebador A para la clonación de ICDH  
  
<400> 14  
20 gaattcgctc ccggtgcagc  
  
<210> 15  
25 <211> 20  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador B para la clonación de ICDH  
  
<400> 15  
30 gatgcagaat tcctgtcgg  
  
<210> 16  
35 <211> 28  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador 1 para introducir una mutación en el promotor de ICD  
40  
<400> 16  
  
45 tggattgctg gctataatgg tgcgtga  
  
<210> 17  
<211> 53  
<212> ácido nucleico  
50 <220> cebador 2 para introducir una mutación en el promotor de ICD  
  
<400> 17  
  
55 caaccacgt tcagttgaca actactggat tgctggctat aatgggtcgc tga  
  
<210> 18  
60 <211> 53  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador 3 para introducir una mutación en el promotor de ICD  
  
<400> 18  
65 caaccacgt tcagttgact actactggat tgctggctaa agtgggtcgc tga

## ES 2 335 828 T3

<210> 19

<211> 28

<212> ácido nucleico

5 <220> cebador 4 para introducir una mutación en el promotor de ICD

<400> 19

10 ggctgaaact gctataatag gcgccagc

<210> 20

<211> 51

15 <212> ácido nucleico

<220> cebador 5 para introducir una mutación en el promotor de ICD

<400> 20

20 ggaaacacgg cgttgccatg cggggctgaa actgctataa taggcgccag c

<210> 21

25 <211> 51

<212> ácido nucleico

<220> cebador 6 para introducir una mutación en el promotor de ICD

30 <400> 21

ggaaacacgg cgttgacatg cggggctgaa actgctataa taggcgccag c

35 <210> 22

<211> 22

<212> ácido nucleico

40 <220> cebador de la secuencia del promotor de ICD

<400> 22

45 gtgcgggtcc agatgatctt ag

<210> 23

<211> 20

<212> ácido nucleico

50 <220> cebador A para la amplificación de nptII

<400> 23

55 gggatcccgg atgaatgtca

<210> 24

60 <211> 23

<212> ácido nucleico

<220> cebador B para la amplificación de nptII

65 <400> 24

gcccggggtg ggcgaagaac tcc

## ES 2 335 828 T3

<210> 25  
<211> 23  
<212> ácido nucleico  
5 <220> cebador para la amplificación del gen *LA* de *pdhA* en *Brevibacterium lactofermentum*  
<400> 25  
10 aci gti tci atg ggi cti ggi cc  
<210> 26  
<211> 23  
15 <212> ácido nucleico  
<220> cebador para la amplificación del gen *LA* de *pdhA* en *Brevibacterium lactofermentum*  
<400> 26  
20 cct tci ccg tti agi gti gti cg  
<210> 27  
25 <211> 30  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador para la clonación *in vitro* del gen *LA* de *pdhA* en *Brevibacterium lactofermentum*  
30 <400> 27  
ttg cag tta acc acg aag gtc agg ttg tcc  
<210> 28  
35 <211> 30  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador para la clonación *in vitro* del gen *LA* de *pdhA* en *Brevibacterium lactofermentum*  
40 <400> 28  
tgg atg aga cca cgt gat tct ggc tcg tcc  
45 <210> 29  
<211> 30  
<212> ácido nucleico  
50 <220> cebador para la clonación *in vitro* del gen *LA* de *pdhA* en *Brevibacterium lactofermentum*  
<400> 29  
55 aca gat cct gca cga agg cat caa cga ggc  
<210> 30  
60 <211> 30  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador para la clonación *in vitro* del gen *LA* de *pdhA* en *Brevibacterium lactofermentum*  
65 <400> 30  
tca tcg ctg cgg gta cct cct acg cca ccc

# ES 2 335 828 T3

<210> 31

<211> 2766

<212> ácido nucleico

5 <213> *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869

<220> gen LA de pdhA en *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869

<400> 31

```

10      atg gcc gat caa gca aaa ctt ggt ggt aag ccc tcg gat gac tct aac   48
      Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro Ser Asp Asp Ser Asn
          1           5           10           15

15

      ttc gcg atg atc cgc gat ggc gtg gca tct tat ttg aac gac tca gat   96
      Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Asp
          20           25           30

20

      ccg gag gag acc aac gag tgg atg gat tca ctc gac gga tta ctc cag  144
      Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu Asp Gly Leu Leu Gln
          35           40           45

25

      gag tct tct cca gaa cgt gct cgt tac ctc atg ctt cgt ttg ctt gag  192
      Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met Leu Arg Leu Leu Glu
          50           55           60

30

35      cgt gca tct gca aag cgc gta tct ctt ccc cca atg acg tca acc gac  240
      Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro Met Thr Ser Thr Asp
          65           70           75           80

40

      tac gtc aac acc att cca acc tct atg gaa cct gaa ttc cca ggc gat  288
      Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro Glu Phe Pro Gly Asp
          85           90           95

45

      gag gaa atg gag aag cgt tac cgt cgt tgg att cgc tgg aac gca gcc  336
      Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile Arg Trp Asn Ala Ala
          100           105           110

50

55      atc atg gtt cac cgc gct cag cga cca ggc atc ggc gtc ggc gga cac  384
      Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile Gly Val Gly Gly His
          115           120           125

60

      att tcc act tac gca ggc gca gcc cct ctg tac gaa gtt ggc ttc aac  432
      Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Val Gly Phe Asn
          130           135           140

65

      cac ttc ttc cgc ggc aag gat cac cca ggc ggc ggc gac cag atc ttc  480
      His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Gly Asp Gln Ile Phe
  
```

ES 2 335 828 T3

	145	150	155	160	
5	ttc cag ggc cac gca tca cca ggt atg tac gca cgt gca ttc atg gag				528
	Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu				
10		165	170	175	
15	ggc cgc ctt tct gaa gac gat ctc gat ggc ttc cgt cag gaa gtt tcc				576
	Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser				
20		180	185	190	
25	cgt gag cag ggt ggc att ccg tcc tac cct cac cca cac ggt atg aag				624
	Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys				
30		195	200	205	
35	gac ttc tgg gag ttc cca act gtg tcc atg ggt ctt ggc cca atg gat				672
	Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly Leu Gly Pro Met Asp				
40		210	215	220	
45	gcc att tac cag gca cgt ttc aac cgc tac ctc gaa aac cgt ggc atc				720
	Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Glu Asn Arg Gly Ile				
50		225	230	235	240
55	aag gac acc tct gac cag cac gtc tgg gcc ttc ctt ggc gac ggc gaa				768
	Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu				
60		245	250	255	
65	atg gac gag cca gaa tca cgt ggt ctc atc cag cag gct gca ctg aac				816
	Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln Gln Ala Ala Leu Asn				



ES 2 335 828 T3

5 cgt ggc ggc cac gat tac cgc aag gtt tac gca gcc tac aag cga gct 1200  
 Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala Ala Tyr Lys Arg Ala  
 385 390 395 400

10 ctt gag acc aag gat cgc cca acc gtc atc ctt gct cac acc att aag 1248  
 Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu Ala His Thr Ile Lys  
 405 410 415

15 ggc tac gga ctc ggc cac aac ttc gaa ggc cgt aac gca acc cac cag 1296  
 20 Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg Asn Ala Thr His Gln  
 420 425 430

25 atg aag aag ctg acg ctt gat gat ctg aag ttg ttc cgc gac aag cag 1344  
 Met Lys Lys Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu Phe Arg Asp Lys Gln  
 435 440 445

30 ggc atc cca atc acc gat gag cag ctg gag aag gat cct tac ctt cct 1392  
 35 Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Leu Pro  
 450 455 460

40 cct tac tac cac cca ggt gaa gac gct cct gaa atc aag tac atg aag 1440  
 Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu Ile Lys Tyr Met Lys  
 465 470 475 480

45 gaa cgt cgc gca gcg ctc ggt ggc tac ctg cca gag cgt cgt gag aac 1488  
 50 Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Glu Arg Arg Glu Asn  
 485 490 495

55

60

65

ES 2 335 828 T3

TAC GAT CCA ATT CAG GTT CCA CCA CTG GAT AAG CTT CGC TCT GTC CGT 1536  
 Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys Leu Arg Ser Val Arg  
 5 500 505 510

aag ggc tcc ggc aag cag cag atc gct acc act atg gcg act gtt cgt 1584  
 Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr Met Ala Thr Val Arg  
 10 515 520 525

acc ttc aag gaa ctg atg cgc gat aag ggc ttg gct gat cgc ctt gtc 1632  
 Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu Ala Asp Arg Leu Val  
 15 530 535 540

cca atc att cct gat gag gca cgt acc ttc ggt ctt gac tct tgg ttc 1680  
 Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly Leu Asp Ser Trp Phe  
 20 545 550 555 560

cca acc ttg aag atc tac aac ccg cac ggt cag aac tac gtg cct gtt 1728  
 Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln Asn Tyr Val Pro Val  
 25 565 570 575

gac cac gac ctg atg ctc tcc tac cgt gag gca cct gaa gga cag atc 1776  
 Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala Pro Glu Gly Gln Ile  
 30 580 585 590

ctg cac gaa ggc atc aac gag gct ggt tcc gtg gca tcg ttc atc gct 1824  
 Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Val Ala Ser Phe Ile Ala  
 35 595 600 605

55

60

65

ES 2 335 828 T3

5 gcg ggt acc tcc tac gcc acc cac ggc aag gcc atg att ccg ctg tac 1872  
 Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala Met Ile Pro Leu Tyr  
 610 615 620

10 atc ttc tac tcg atg ttc gga ttc cag cgc acc ggt gac tcc atc tgg 1920  
 Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr Gly Asp Ser Ile Trp  
 625 630 635 640

15 gca gca gcc gat cag atg gca cgt ggc ttc ctc ttg ggc gct acc gca 1968  
 Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu Leu Gly Ala Thr Ala  
 20 645 650 655

25 ggt cgc acc acc ctg acc ggt gaa ggc ctc cag cac atg gat gga cac 2016  
 Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln His Met Asp Gly His  
 30 660 665 670

35 tcc cct gtc ttg gct tcc acc aac gag ggt gtc gag acc tac gac cca 2064  
 Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val Glu Thr Tyr Asp Pro  
 675 680 685

40 tcc ttt gcg tac gag atc gca cac ctg gtt cac cgt ggc atc gac cgc 2112  
 Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His Arg Gly Ile Asp Arg  
 45 690 695 700

50 atg tac ggc cca gcc aag ggt gaa gat gtt atc tac tac atc acc atc 2160  
 Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile Tyr Tyr Ile Thr Ile  
 705 710 715 720



ES 2 335 828 T3

tct gac ttc tcc act gat ctg cca aac cag atc cgt gaa tgg gtc cca 2544  
 Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile Arg Glu Trp Val Pro  
 5                   835                   840                   845  
  
 ggc gac tac acc gtt ctc ggt gca gat ggc ttc ggt ttc tct gat acc 2592  
 Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe Gly Phe Ser Asp Thr  
 10                   850                   855                   860  
  
 cgc cca gct gct cgt cgc ttc ttc aac atc gac gct gag tcc att gtt 2640  
 Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp Ala Glu Ser Ile Val  
 20                   865                   870                   875                   880  
  
 gtt gca gtg ctg aac tcc ctg gca cgc gaa ggc aag atc gac gtc tcc 2688  
 Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly Lys Ile Asp Val Ser  
 25                                   885                   890                   895  
  
 gtt gct gct cag gct gct gag aag ttc aag ttg gat gat cct acg agt 2736  
 Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu Asp Asp Pro Thr Ser  
 30                   900                   905                   910  
  
 gtt tcc gta gat cca aac gct cct gag gaa                   2766  
 Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu

45 <210> 32  
 <211> 8556  
 <212> ácido nucleico  
 50 <213> *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869

55

60

65

ES 2 335 828 T3

<400> 32

	tcacgttacg gcgatcaaca ccgcaaccac tacgagaaga tctccaaacg agaccaagag	60
5	cgcttctaag ccgctctcat ttgcaacctg ccattctgtg aggatatggc aggtgctttt	120
	tcatgcact atcttggggt tctcggfatt agatctctg ataaaaocg gatagttttc	180
	ttgcctaga cactaattac ggcaccgctt aagcatggtc gtgacacgta aaacctgact	240
10	taggcattt tgatgtggtg tagatcatat tgacgtcaat gaatgaagtg actaactcog	300
	ccgaatcac atcgtctaaa aggcctgggc gaccacgtaa agacgggcac gacgagaaga	360
15	tcategacgc aactttacgg ctcatcgaca gcaatcgtec cgtcacggtc aatgcagttg	420
	tcaaaagaag cggagtggca cgtgcagcgg tttatcgacg ctggcccagg ctagtggatc	480
	tagtagcggg agcttttagat gcccggcgag ctccagttga aatagatacc ccaggggaca	540
20	tcaaaagagc cttgattgat gggctgttta caaatcaggc gaaaaccact ggagtctct	600
	atcctcgta cggatttcgc aaacggctcg agttggtgat gtcagatcaa gaattacgc	660
25	tcgcctaag gaattccat gtgaagagc gtcgagaagc aaatattcgc gcgctgcaag	720
	tcgcgcaaga aaaaggocaa atccggcgg atctagacat cggggcgtgc ctcgatgcaa	780
	tccttggggt gttttattac caatcggtcg cgcgtggagt aaatttccg gaccaaggtc	840
30	caacgcaacg atgcagagaa gcttggaggt tgatctggca tggaaatgaa ccttaaatc	900
	aggttctgac gagggtcgaa gcaagtgtc gcgcgcgca cctcagtatc cggatcaact	960
	taatttcgaa gtgctgggtt ttctgcgca taaccaatgc gtaocgatgt gccatgagc	1020
35	gaaaaccagc ccacgataag tttcttaaaa ctatcgtgg cctgcttcta tatttgtgcg	1080
	ccctgacggc ctgaaaccgc cgaacctgtg ggtgtaaac agctgctctt ccagctgagc	1140
40	taaaggcgcg cacgtgcttt tctagaacca ccttgggtgc ctgaaagca acgagtgaaa	1200
	tactaacaca caatctcac agacctaaa tcgctgctca ggcctggaa attagcgatt	1260
	gttaaggctt cttgtttoca cgtggaaga ggcagaacc ttgccaatta ccgagacgtt	1320
45	ccgcttgggt ctgacgaga cctgccagtt gtgctgattc agagataact ccaggagcca	1380
	gggtctctc tttaccaatg ccaggagtc acaaccagat acgaccatc tcagcgaggg	1440
	agcggatgga atccacaagt ccgtgcgca gatgcgcgc atcctcgcgc caccagagca	1500
50	gcacgacatc gcacagctcg tcggtttctt catcgagtag ttctcaccg attgcactt	1560
	cgatggactc gctgacagc gtgtcggaa cttcatccca tccaattct tgaacgat	1620
	gacccgattg aatgcaggt agttgagcat aatcctgggc acctgcttg actgcgocg	1680
55	gagcgtcggc cactttaata atcctcctcg tgtgggccc gatgtgttt tcgattacat	1740

60

65

ES 2 335 828 T3

	ggattcaaca tgaaacccgg gggctattga tatatccgaa ttgcacatta ccgtccaacc	1800
	ggtaacttga accacccttc cctggaattt ttcccttttc ctccccctt acgtcaaga	1860
5	atcaatgaat tcaatcactg gccagcgatt aacttttcca gttttcagtc ttggatttc	1920
	acaattctct tcaaaataat gytggtaga ttttccatca aacctcacc aaaaggacat	1980
10	cagacctgta gttttatgag attcgggtca aacgtgagag aaacatcaca tctcacggga	2040
	aactaccga taattctttg caaaactttg caaagggtaa tgaacatgca gctagtcttc	2100
	gtagaaatgt tctttaaaaa atocacaaca attgccagga agcacaccga ttgatggata	2160
15	cctgaatcc cagtgagcgc accactccc ttacgtcaca gtctgtaaaa caaatcttcg	2220
	gtgttgctga tctttgttaa taacttatgc gttgacctat tctgtcactt cgtgtgcca	2280
20	caattagcta cgaaccaaga tgggaccggg aaaccgggac gtataaacga aatanaacat	2340
	tccaacagga ggtgtggaa atg gcc gat caa gca aaa ctt ggt ggt aag ccc	2392
	Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro	
25	5 10	
	tcg gat gac tct aac ttc gcg atg atc cgc gat gcc gtg gca tct tat	2440
30	Ser Asp Asp Ser Asn Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr	
	15 20 25	
35	ttg aac gac tca gat ccg gag gag acc aac gag tgg atg gat tca etc	2488
	Leu Asn Asp Ser Asp Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu	
40	30 35 40	
	gac gga tta etc cag gag tct tct cca gaa cgt gct cgt tac etc atg	2536
45	Asp Gly Leu Leu Gln Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met	
	45 50 55	
50	ctt cgt ttg ctt gag cgt gca tct gca aag cgc gta tct ctt ccc cca	2584
	Leu Arg Leu Leu Glu Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro	
55	60 65 70 75	
60		
65		

ES 2 335 828 T3

	atg acg tca acc gac tac gtc aac acc att cca acc tct atg gaa cct	2632
	Met Thr Ser Thr Asp Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro	
5	80 85 90	
	gaa ttc cca ggc gat gag gaa atg gag aag cgt tac cgt cgt tgg att	2680
10	Glu Phe Pro Gly Asp Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile	
	95 100 105	
15	cgc tgg aac gca gcc atc atg gtt cac cgc gct cag cga cca ggc atc	2728
	Arg Trp Asn Ala Ala Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile	
20	110 115 120	
	ggc gtc ggc gga cac att tcc act tac gca ggc gca gcc cct ctg tac	2776
25	Gly Val Gly Gly His Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr	
	125 130 135	
30	gaa gtt ggc ttc aac cac ttc ttc cgc ggc aag gat cac cca ggc ggc	2824
	Glu Val Gly Phe Asn His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly	
35	140 145 150 155	
	ggc gac cag atc ttc ttc cag ggc cac gca tca cca ggt atg tac gca	2872
40	Gly Asp Gln Ile Phe Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala	
	160 165 170	
45	cgt gca ttc atg gag ggt cgc ctt tct gaa gac gat ctc gat ggc ttc	2920
	Arg Ala Phe Met Glu Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe	
50	175 180 185	
	cgt cag gaa gtt tcc cgt gag cag ggt ggc att ccg tcc tac cct cac	2968
55	Arg Gln Glu Val Ser Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His	
60		
65		

ES 2 335 828 T3

	190	195	200	
5	cca cac ggt atg aag gac ttc tgg gag ttc cca act gtg tcc atg ggt			3016
	Pro His Gly Met Lys Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly			
10	205	210	215	
15	ctt ggc cca atg gat gac att tac cag gca cgt ttc aac cgc tac ctc			3064
	Leu Gly Pro Met Asp Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu			
20	220	225	230	235
25	gaa aac cgt ggc atc aag gac acc tct gac cag cac gtc tgg gac ttc			3112
	Glu Asn Arg Gly Ile Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe			
	240	245	250	
30	ctt ggc gac ggc gaa atg gac gag cca gaa tca cgt ggt ctc atc cag			3160
	Leu Gly Asp Gly Glu Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln			
	255	260	265	
35	cag gct gca ctg aac aac ctg gac aac ctg acc ttc gtg gtt aac tgc			3208
	Gln Ala Ala Leu Asn Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys			
40	270	275	280	
45	aac ctg cag cgt ctc gac gga cct gtc cgc ggt aac acc aag atc atc			3256
	Asn Leu Gln Arg Leu Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile			
	285	290	295	
50	cag gaa ctc gag tcc ttc ttc cgt ggc gca ggc tgg tct gtg atc aag			3304
	Gln Glu Leu Glu Ser Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys			
55	300	305	310	315



ES 2 335 828 T3

	430	435	440	
5	ttc cgc gac aag cag ggc atc cca atc acc gat gag cag ctg gag aag			3736
	Phe Arg Asp Lys Gln Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys			
	445	450	455	
10	gat cct tac ctt cct cct tac tac cac cca ggt gaa gac gct cct gaa			3784
	Asp Pro Tyr Leu Pro Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu			
	460	465	470	475
20	atc aag tac atg aag gaa cgt cgc gca gcg ctc ggt ggc tac ctg cca			3832
	Ile Lys Tyr Met Lys Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro			
	480	485	490	
25	gag cgt cgt gag aac tac gat cca att cag gtt cca cca ctg gat aag			3880
	Glu Arg Arg Glu Asn Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys			
	495	500	505	
35	ctt cgc tct gtc cgt aag ggc toc ggc aag cag cag atc gct acc act			3928
	Leu Arg Ser Val Arg Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr			
	510	515	520	
40	atg gcg act gtt cgt acc ttc aag gaa ctg atg cgc gat aag ggc ttg			3976
	Met Ala Thr Val Arg Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu			
	525	530	535	
50	gct gat cgc ctt gtc cca atc att cct gat gag gca cgt acc ttc ggt			4024
	Ala Asp Arg Leu Val Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly			
	540	545	550	555



ES 2 335 828 T3

	670	675	680	
5	gag aac tac gac cca tcc ttt ggc tac gag atc gca cac ctg gtt cac			4456
	Glu Thr Tyr Asp Pro Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His			
	685	690	695	
10	cgt ggc atc gac cgc atg tac ggc cca ggc aag ggt gaa gat gtt atc			4504
	Arg Gly Ile Asp Arg Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile			
15	700	705	710	715
20	tac tac atc acc atc tac aac gag cca acc cca cag cca gct gag oca			4552
	Tyr Tyr Ile Thr Ile Tyr Asn Glu Pro Thr Pro Gln Pro Ala Glu Pro			
		720	725	730
25	gaa gga ctg gac gta gaa ggc ctg cac aag ggc atc tac ctc tac tcc			4600
	Glu Gly Leu Asp Val Glu Gly Leu His Lys Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser			
30	735	740	745	
35	cgc ggt gaa ggc acc ggc cat gag gca aac atc ttg gct tcc ggt gtt			4648
	Arg Gly Glu Gly Thr Gly His Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ser Gly Val			
40	750	755	760	
45	ggt atg cag tgg gct ctc aag gct gca tcc atc ctt gag gct gac tac			4696
	Gly Met Gln Trp Ala Leu Lys Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ala Asp Tyr			
	765	770	775	
50	gga gtt cgt gcc aac att tac tcc gct act tct tgg gtt aac ttg gct			4744
	Gly Val Arg Ala Asn Ile Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Val Asn Leu Ala			
55	780	785	790	795
60				
65				

ES 2 335 828 T3

	cgc gat gcc gct gct cgt aac aag gca cag ctg cgc aac oca ggt gca	4792
5	Arg Asp Gly Ala Ala Arg Asn Lys Ala Gln Leu Arg Asn Pro Gly Ala	
	800 805 810	
10	gat gct gcc gag gca ttc gta acc acc cag ctg aag cag acc tcc gcc	4840
	Asp Ala Gly Glu Ala Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly	
	815 820 825	
15	cca tac gtt gca gtg tct gac ttc tcc act gat ctg oca aac cag atc	4888
20	Pro Tyr Val Ala Val Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile	
	830 835 840	
25	cgt gaa tgg gtc oca gcc gac tac acc gtt ctc ggt gca gat gcc ttc	4936
	Arg Glu Trp Val Pro Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe	
	845 850 855	
30	ggt ttc tct gat acc cgc oca gct gct cgt cgc ttc ttc aac atc gac	4984
35	Gly Phe Ser Asp Thr Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp	
	860 865 870 875	
40	gct gag tcc att gtt gtt gca gtg ctg aac tcc ctg gca cgc gaa gcc	5032
	Ala Glu Ser Ile Val Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly	
	880 885 890	
45	aag atc gac gtc tcc gtt gct gct cag gct gct gag aag ttc aag ttg	5080
50	Lys Ile Asp Val Ser Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu	
	895 900 905	
55	gat gat cct acg agt gtt tcc gta gat oca aac gct cct gag gaa taaat	5130
60	Asp Asp Pro Thr Ser Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu	
65		

ES 2 335 828 T3

	910	915	920				
5	caoctcaagg	gacagataaa	tcccgccgoc	agacgttagt	ctggggcggg	gattcgtcgt	5190
	aaagcaagct	cttttagacc	gagaaagoc	ttgtcagaca	atgttgccgc	cttgatattg	5250
	gcgaactcct	gcagcaaatc	gcgcacagtc	aacttcgact	tggtagcctg	atctgocctg	5310
10	tagacaatct	ggccttcctg	catcatgate	agggcattgc	ccaggcgaat	tgccctgtcc	5370
	atgttgtgog	tgaccataag	cgtagtcaga	gttccatctg	ccacgatctt	ttcggccaag	5430
	gtggtcacia	gctctgcacg	ctgtggatca	agcgtgcggg	tgtgctcacc	caacagcctg	5490
15	atlttagggt	gagtaaaacc	agccatcagc	agggacaatg	cctgacgctg	accgcagag	5550
	agcaaaccaa	ctttggcagt	gagcctgttt	tccagaccca	gctcaaggcg	ctcaagtcc	5610
	tgcttgcaat	gctcacggcg	cttcgaggtc	agtgcanaag	ccantccacy	gcgcttgccg	5670
20	cgacgaacg	cgatggccag	attctctcca	atggtgagat	tcggcggggt	gcctgcacaa	5730
	ggatcctgaa	aaacgcggcc	gatgtagcgg	gcacgcttgt	gctctgacat	cttgtttacc	5790
25	ttgttgccgt	cgatggcaat	ctcgccggaa	tcaacaagca	aaagccaga	aacagcgttg	5850
	agcaggytgg	atttcccgcg	accgttagaa	ccgatgacgg	tgacaaaacc	gocctcagcc	5910
	atctcgagtt	tgagctgctg	caacgcggcg	cgctcattca	cagtgcgggg	gaagaaggtt	5970
30	ttggaatcc	cyttgatgga	taacatgtct	taagcctcca	ctgctactgg	ttgcttaggc	6030
	ttcgggtgoc	tgagaaactt	cgacgcgcc	ctgggcagca	gcattggcgc	aacccaccaag	6090
	atgcagaaa	ttgccttcct	atcgttgggg	tcaaggccaa	cgccagctgc	tgcgaaatg	6150
35	atcagggcgt	acgcgatggc	accgacgatg	acagccaaca	cagccaacca	cacgcgacgc	6210
	tgaccgaaga	tgccctggcc	ccaaaataac	cgatgcgaga	ccgatcacga	tgaggccaat	6270
40	accctatgaa	atctctgcga	agccttggtg	ctgagcgatg	agtgccccgg	caagaccaac	6330
	agaaccattg	gacagggaga	tggtgaggat	tttggtgaaa	tccgttgaaa	caccaaaagg	6390
	ctgcaccacc	ggcccgttgt	cgccgggtgga	tcgcagcgac	agtcogatat	cagtgttgag	6450
45	gaaccagatg	acgatgagtc	ccaaaaatcc	cactgcaacg	gcgaggatcg	ccgggcctgc	6510
	ccatgtgocg	aggaggccgg	cgctgcgaaag	cggggtgaaag	aggttatcgg	tgcgcaacaa	6570
	tggcacgttc	gcgcacccca	tgatgcgcaa	gttaaccgac	cacaacgcaa	tcatggtcaa	6630
50	aatacctgog	agcaaaccaat	cgatcttgcc	cttgggtgtgc	agcaaacccg	tgatcatgoc	6690
	agcgataaag	ccagtaacga	aaccagcggc	agtagccata	agaggaggcc	agccagacat	6750
55	aagagctgtc	gcagctgttg	ccgcgcagct	ggtcagggctg	ccgtcaacgg	tgaggtoggg	6810

## ES 2 335 828 T3

	aaagttgagc acacggaacg tcaaatagac gcccaatgcy acaactccgt acaascaatcc	6870
	gaactcaaaa ggcgcgatca taocggttcg gocttatcca aaatctcttg agggatctcc	6930
5	acgcctggc gctctgctgc atctctgctg atcactgagg tgaactcagt tgcagtctcc	6990
	acaggcatgg ttgctgggctc ttcgcgctcc tgcagaatac gcagagccat ctgcgccagt	7050
10	tggcggccaa gctcgytgta atcgataccc agggttccca gtgcgccacc ctcaacagtg	7110
	ccggactcag caccgatcac agggatctgc ttctgctcag caacctgaac cagagaagaa	7170
	ataccgaaa caacctatgt gtcagttgga acgtagatga catcaacatc gccgagagct	7230
15	tcaacagcct gctgaatctc gttcacgcta gtgacagtct gagtattaac ggacagcccc	7290
	agtggtcag cagccttggg gacctcctcg acctgcacct gagagttgac ctaccagac	7350
	gcgtagcga tgcgatgga ctttgcgta ggaaccagct gctgcaaac ctccaactgc	7410
20	tgctcaatcg gtgcgatata agaagtacc gtgacgttcc cgcaggtgc ttcattagaa	7470
	tccaccagct ctgcgcacac tgcctcggta actgcggtga acagcactgg gatctcagtg	7530
	atattctgcy cagttgcctg tgcctgctgga gttgcaacag ccaaacacag atccaaattg	7590
25	tcagaagcga actgctgaga aatagtcagt gcagtgcct gctcgcctgt agcgttttgc	7650
	tcacaaagc tgcctcacc gccctgctct tcaaaagctt ccttgaaac agtggtcgt	7710
30	gcacaaagt cagggctgctg aacaagctgg ttgatccaa ctccgtaaga gtcgccacct	7770
	gcagcatcag tggaggtgga gctgtcactg gaatcgtctg agcaccgaag caacgccaa	7830
	ggcccaacag taaagatgct tgcagctacc ttccaaaggg aagaaacat agcacatctc	7890
35	cttaaagtgt tattttcaaa aaggggcaga cagcgtcaac acatgtctcg gataaagaac	7950
	catatgtgaa atgtctcatg atttaacta cttgtctac cagtcatatg ccgaattccc	8010
	cctggatata ccgcaggaca tggacaaaat ggggtgatag cgggtgcacc aattcaatct	8070
40	tttaaaggcc ctgacacccg cgatttctt aatcgatcat taaagagga tctctcccc	8130
	taacaaacct ccaagacta gagtgggaa caccatgac gtttctcaa ataaaccag	8190
	tgactctgac ccgcaatata ttcaatcaga actcaocccg ctctgtgccc agggcgact	8250
45	cgatctagat acttaaccaag acgtggtga taocgtttg tctactgatg atctaggcga	8310
	gttgatgag atccctgccc gcttctggg agggccgca gttctcagc agcggcccca	8370
50	gcagccgca caaccacatc agcggccga acagcaacc ccacagcatt atggacaacc	8430
	cggctacgg caatcacctc aatataccc gcagcagcct ccgataatc agcccgyta	8490
	ttaccccgat cccggccctg gccagcaga accacagatg caacagccac caacgcgtcc	8550
55	aatca	

<210> 33

<211> 20

60 <212> ácido nucleico

<220> cebador para la construcción del plásmido de amplificación del gen LA de pdhA en *Brevibacterium lactofermentum*

65 <400> 33

aat gac agg agt caa cac cc

## ES 2 335 828 T3

<210> 34  
<211> 20  
<212> ácido nucleico  
5 <220> cebador para la construcción del plásmido de amplificación del gen LA de pdhA en *Brevibacterium lactofermentum*  
<400> 34  
10 aca tgg aac agg caa ttc gc  
<210> 35  
15 <211> 28  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador para introducir una mutación en el promotor del gen LA de pdfA en *Brevibacterium lactofermentum*  
20 <400> 35  
cgt ccc ggg ctg taa aac aaa tct tcg g  
<210> 36  
25 <211> 27  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador para introducir una mutación en el promotor del gen LA de pdfA en *Brevibacterium lactofermentum*  
30 <400> 36  
atc ccc ggg ctt acc acc aag ttt tgc  
35 <210> 37  
<211> 30  
<212> ácido nucleico  
40 <220> cebador para introducir una mutación en el promotor del gen LA de pdfA en *Brevibacterium lactofermentum*  
<400> 37  
45 ctt atg cgt tgc cac att cgt gca ctt cgg  
<210> 38  
<211> 40  
50 <212> ácido nucleico  
<220> cebador para introducir una mutación en el promotor del gen LA de pdfA en *Brevibacterium lactofermentum*  
<400> 38  
55 gcg ttg acc cat tcg tgc act tcg gtg tgc tat aat tag g  
<210> 39  
60 <211> 40  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador para introducir una mutación en el promotor del gen LA de pdfA en *Brevibacterium lactofermentum*  
65 <400> 39  
gcg ttg cca cat tcg tgc act tcg gtg tgc tat aat tag g

## ES 2 335 828 T3

<210> 40

<211> 38

<212> ácido nucleico

5 <220> cebador para introducir una mutación en el promotor del gen LA de pdfA en *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 40

10 ttt taa aac gtt ctg gag aag act cct gga gta atc cg

<210> 41

<211> 20

15 <212> ácido nucleico

<220> cebador para introducir una mutación en el promotor del gen LA de pdfA en *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 41

20

cga tct tgc ctt cgc gtg cc

<210> 42

25 <211> 30

<212> ácido nucleico

<400> 42

30

agaccgccgg agtatgcaag aacgatgccg

<210> 43

35 <211> 30

<212> ácido nucleico

<400> 43

40

gacttcacca tcaatcatct tcttcaggta

<210> 44

45 <211> 30

<212> ácido nucleico

<400> 44

50

accttcgacc agaccctggc taagggttt

<210> 45

55 <211> 30

<212> ácido nucleico

<400> 45

60

gctaacaagc gcgatcgca agctggcaac

<210> 46

65 <211> 25

<212> ácido nucleico

## ES 2 335 828 T3

<400> 46  
gcgatgacac cgttttgtt ctgc

5 <210> 47  
<211> 25  
<212> ácido nucleico

10 <400> 47  
ggcgacatcc ttgccagat gatca

15 <210> 48  
<211> 25  
<212> ácido nucleico

20 <400> 48  
gattcacca tcaatcatct tcttc

25 <210> 49  
<211> 24  
<212> ácido nucleico

30 <400> 49  
gccaggtaca actgtctgaa ttgc

35 <210> 50  
<211> 40  
<212> ácido nucleico  
<220> cebador para introducir una mutación

40 <400> 50  
gttaatcgct tgccaatgca ggcaggtgaa gtataaccg

45 <210> 51  
<211> 40  
<212> ácido nucleico

50 <400> 51  
gttaatcgct tgctaagca ggcaggtgaa gtataaccg

55 <210> 52  
<211> 40  
<212> ácido nucleico

60 <400> 52  
gttaatcgct tgccaatgca ggcaggtgaa gtataaccg

65 <210> 53  
<211> 40

## ES 2 335 828 T3

<212> ácido nucleico

<400> 53

5 gttaatcgct tgtaatgca ggcaggtaag gtataatccg

<210> 54

10 <211> 40

<212> ácido nucleico

<400> 54

15 gttaatcgct tgcaatgca ggcaggtaag gtataatccg

<210> 55

20 <211> 30

<212> ácido nucleico

<400> 55

25 gggttccagc ctcgtgcgga attcgtggag

<210> 56

30 <211> 25

<212> ácido nucleico

<400> 56

35 gcgttaccca gagctggatc ctcgg

<210> 57

40 <211> 16

<212> ácido nucleico

<400> 57

45 cagttgtggc tgatcg

<210> 58

50 <211> 17

<212> ácido nucleico

<400> 58

55 ctttccaga ctctggc

<210> 59

60 <211> 21

<212> ácido nucleico

<400> 59

65 gctataattt gacgtgagca t

## ES 2 335 828 T3

<210> 60  
<211> 25  
<212> ácido nucleico  
5  
<400> 60  
gctcacgtca aattatagca gtgtc  
10  
<210> 61  
<211> 54  
<212> ácido nucleico  
15  
<400> 61  
ttgttgcatt tctgtgac actgctataa ttgaaactg agcagttaac agcc  
20  
<210> 62  
<211> 63  
<212> ácido nucleico  
25  
<400> 62  
**gttaactgct cacgttcaaa ttatagcaft gtcgcacaga atgacaacaa agaattaaaa**  
30  
**ttg**  
<210> 63  
<211> 25  
<212> ácido nucleico  
35  
<400> 63  
gctagcctcg ggagctctct aggag  
40  
<210> 64  
<211> 25  
<212> ácido nucleico  
45  
<400> 64  
gatctttccc agactctggc cacgc  
50

### LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> Ajinomoto Co., Inc  
<120> Procedimiento para construir una bacteria que produce aminoácidos y procedimiento para producir aminoácidos por un método de fermentación con el uso de la bacteria construida que produce aminoácidos  
60  
<130> 82631 m3  
<140> 99944770.9  
65 <141> 1999-09-22  
<150> JP 10/271786

## ES 2 335 828 T3

<151> 1998-09-25

<150> JP 10/271787

5 <151> 1998-09-25

<160> 66

10 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 46

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 1

25 ttaattcttt gtggcatat ctgcgacct gccataatt gaacgt

46

<210> 2

<211> 46

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 2

40 ttaattcttt gcggcatat ctgcgacct gccataatt gaacgt

46

<210> 3

<211> 46

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 3

55 ttaattcttt gtggcatat ctgcgacct gctataatt gaacgt

46

<210> 4

<211> 46

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

## ES 2 335 828 T3

	<400> 4	
	ttaattcttt gttgacatat ctgcgacact gctataattt gaacgt	46
5	<210> 5	
	<211> 46	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 5	
	ttaattcttt gttgccatat ctgcgacact gctataattt gaacgt	46
20	<210> 6	
	<211> 46	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 6	
	ttaattcttt gttgtcatat ctgcgacact gctataattt gaacgt	46
35	<210> 7	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 7	
	gtcgacaata gcctgaatct gttctggtcg	30
50	<210> 8	
	<211> 30	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 8	
	aagcttatcg acgctcccct cccaccggt	30
65	<210> 9	
	<211> 20	

## ES 2 335 828 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 9

10 atcggataa cgtgtaacc 20

<210> 10  
15 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 10

25 atcggataa tgtgtaacc 20

<210> 11  
30 <211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 11

40 gattgacaa aaccgcatt atcggataa tgtgtaacc 40

<210> 12  
45 <211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 12

55 aggatccgt ccagtctcag acagcatc 28

<210> 13  
60 <211> 17  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

## ES 2 335 828 T3

	<400> 13	
	caggaacag ctatgac	17
5	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 14	
	gaattcgctc ccggtgcagc	20
20	<210> 15	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 15	
	gatgcagaat tccttgcgg	20
35	<210> 16	
	<211> 28	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 16	
	tggattgctg gctataatgg tgcgtga	28
50	<210> 17	
	<211> 53	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 17	
	caaccacgt tcagtgaca actactggattgctggctat aatggtgctg tga	53
65	<210> 18	
	<211> 53	

## ES 2 335 828 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 18	
10	caaccacgt tcagttgact actactggat tgctggctaa agtgggtcgc tga	53
	<210> 19	
15	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 19	
25	ggctgaaact gctataatag gcgccagc	28
	<210> 20	
30	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 20	
40	ggaaacacgg cgttgccatg cggggctgaa actgctataa taggcgccag c	51
	<210> 21	
45	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 21	
55	ggaaacacgg cgttgacatg cggggctgaa actgctataa taggcgccag c	51
	<210> 22	
60	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

## ES 2 335 828 T3

	<400> 22		
	gtgcgggtcc agatgatctt ag		22
5	<210> 23		
	<211> 20		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador		
15	<400> 23		
	gggatcccgg atgaatgtca		20
20	<210> 24		
	<211> 23		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador		
30	<400> 24		
	gcccggggtg ggcgaagaac tcc		23
35	<210> 25		
	<211> 23		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador		
45	<220>		
	<223> n = i		
50	<400> 25		
	acngntcna tgggncntngg ncc		23
55	<210> 26		
	<211> 23		
	<212> ADN		
60	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador		
65	<220>		
	<223> n = i		

## ES 2 335 828 T3

	<400> 26	
	ccttcnccgt tnagngtngt ncg	23
5	<210> 27	
	<211> 30	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 27	
	ttgcagtaa ccacgaaggt caggtgtcc	30
20	<210> 28	
	<211> 30	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 28	
	tggatgagac cacgtgattc tggctcgtcc	30
35	<210> 29	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 29	
	acagatcctg cacgaaggca tcaacgagc	30
50	<210> 30	
	<211> 30	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 30	
	tcategctgc ggtacctcc tacgccacc	30
65	<210> 31	
	<211> 2766	

# ES 2 335 828 T3

<212> ADN

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

5 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(2766)

10 <400> 31

```

      atg gcc gat caa gca aaa ctt ggt ggt aag ccc tcg gat gac tct aac   48
      Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro Ser Asp Asp Ser Asn
15      1          5          10          15

      ttc gcg atg atc cgc gat ggc gtg gca tct tat ttg aac gac tca gat   96
      Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Asp
20      20          25          30

      ccg gag gag acc aac gag tgg atg gat tca ctc gac gga tta ctc cag   144
      Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu Asp Gly Leu Leu Gln
25      35          40          45

      gag tct tct cca gaa cgt gct cgt tac ctc atg ctt cgt ttg ctt gag   192
      Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met Leu Arg Leu Leu Glu
30      50          55          60

      cgt gca tct gca aag cgc gta tct ctt ccc cca atg acg tca acc gac   240
      Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro Met Thr Ser Thr Asp
35      65          70          75          80

      tac gtc aac acc att cca acc tct atg gaa cct gaa ttc cca ggc gat   288
      Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro Glu Phe Pro Gly Asp
40      85          90          95

      gag gaa atg gag aag cgt tac cgt cgt tgg att cgc tgg aac gca gcc   336
      Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile Arg Trp Asn Ala Ala
45      100         105         110

      atc atg gtt cac cgc gct cag cga cca ggc atc ggc gtc ggc gga cac   384
      Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile Gly Val Gly Gly His
50      115         120         125

```

55

60

65

# ES 2 335 828 T3

5	<p>att tcc act tac gca ggc gca gcc cct ctg tac gaa gtt ggc ttc aac 432            Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Val Gly Phe Asn                      130                          135                          140</p>	
10	<p>cac ttc ttc cgc ggc aag gat cac cca ggc ggc ggc gac cag atc ttc 480            His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Gly Asp Gln Ile Phe            145                          150                          155                          160</p>	
15	<p>ttc cag ggc cac gca tca cca ggt atg tac gca cgt gca ttc atg gag 528            Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu                                      165                          170                          175</p>	
20	<p>ggt cgc ctt tct gaa gac gat ctc gat ggc ttc cgt cag gaa gtt tcc 576            Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser                                      180                          185                          190</p>	
25	<p>cgt gag cag ggt ggc att ccg tcc tac cct cac cca cac ggt atg aag 624            Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys                                      195                          200                          205</p>	
30	<p>gac ttc tgg gag ttc cca act gtg tcc atg ggt ctt ggc cca atg gat 672            Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly Leu Gly Pro Met Asp                      210                          215                          220</p>	
35	<p>gcc att tac cag gca cgt ttc aac cgc tac ctc gaa aac cgt ggc atc 720            Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Glu Asn Arg Gly Ile            225                          230                          235                          240</p>	
40	<p>aag gac acc tct gac cag cac gtc tgg gcc ttc ctt ggc gac ggc gaa 768            Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu                                      245                          250                          255</p>	
45	<p>atg gac gag cca gaa tca cgt ggt ctc atc cag cag gct gca ctg aac 816            Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln Gln Ala Ala Leu Asn                                      260                          265                          270</p>	
50	<p>aac ctg gac aac ctg acc ttc gtg gtt aac tgc aac ctg cag cgt ctc 864            Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu                      275                          280                          285</p>	
55	<p>gac gga cct gtc cgc ggt aac acc aag atc atc cag gaa ctc gag tcc 912            Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile Gln Glu Leu Glu Ser                      290                          295                          300</p>	
60	<p>ttc ttc cgt ggc gca ggc tgg tct gtg atc aag gtt gtt tgg ggt cgc 960            Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys Val Val Trp Gly Arg            305                          310                          315                          320</p>	

65







ES 2 335 828 T3

<210> 32

<211> 922

<212> PRT

5 <213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 32

10 Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro Ser Asp Asp Ser Asn  
1 5 10 15

15 Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Asp  
20 25 30

20 Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu Asp Gly Leu Leu Gln  
35 40 45

Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met Leu Arg Leu Leu Glu  
50 55 60

25 Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro Met Thr Ser Thr Asp  
65 70 75 80

30 Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro Glu Phe Pro Gly Asp  
85 90 95

Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile Arg Trp Asn Ala Ala  
100 105 110

35 Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile Gly Val Gly Gly His  
115 120 125

40 Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Val Gly Phe Asn  
130 135 140

45 His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Gly Asp Gln Ile Phe  
145 150 155 160

50 Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu  
165 170 175

55

60

65

# ES 2 335 828 T3

Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser  
 180 185 190

5

Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys  
 195 200 205

10

Asp Phe Trp Glu Phe Pro Thr Val Ser Met Gly Leu Gly Pro Met Asp  
 210 215 220

15

Ala Ile Tyr Gln Ala Arg Phe Asn Arg Tyr Leu Glu Asn Arg Gly Ile  
 225 230 235 240

20

Lys Asp Thr Ser Asp Gln His Val Trp Ala Phe Leu Gly Asp Gly Glu  
 245 250 255

25

Met Asp Glu Pro Glu Ser Arg Gly Leu Ile Gln Gln Ala Ala Leu Asn  
 260 265 270

30

Asn Leu Asp Asn Leu Thr Phe Val Val Asn Cys Asn Leu Gln Arg Leu  
 275 280 285

35

Asp Gly Pro Val Arg Gly Asn Thr Lys Ile Ile Gln Glu Leu Glu Ser  
 290 295 300

40

Phe Phe Arg Gly Ala Gly Trp Ser Val Ile Lys Val Val Trp Gly Arg  
 305 310 315 320

45

Glu Trp Asp Glu Leu Leu Glu Lys Asp Gln Asp Gly Ala Leu Val Glu  
 325 330 335

50

Ile Met Asn Asn Thr Ser Asp Gly Asp Tyr Gln Thr Phe Lys Ala Asn  
 340 345 350

55

Asp Gly Ala Tyr Val Arg Glu His Phe Phe Gly Arg Asp Pro Arg Thr  
 355 360 365

60

Ala Lys Leu Val Glu Asn Met Thr Asp Glu Glu Ile Trp Lys Leu Pro  
 370 375 380

65

Arg Gly Gly His Asp Tyr Arg Lys Val Tyr Ala Ala Tyr Lys Arg Ala  
 385 390 395 400

Leu Glu Thr Lys Asp Arg Pro Thr Val Ile Leu Ala His Thr Ile Lys  
 405 410 415

Gly Tyr Gly Leu Gly His Asn Phe Glu Gly Arg Asn Ala Thr His Gln  
 420 425 430

# ES 2 335 828 T3

Met Lys Lys Leu Thr Leu Asp Asp Leu Lys Leu Phe Arg Asp Lys Gln  
                   435                                  440                                  445

5

Gly Ile Pro Ile Thr Asp Glu Gln Leu Glu Lys Asp Pro Tyr Leu Pro  
                   450                                  455                                  460

10

Pro Tyr Tyr His Pro Gly Glu Asp Ala Pro Glu Ile Lys Tyr Met Lys  
 465                                  470                                  475                                  480

15

Glu Arg Arg Ala Ala Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Glu Arg Arg Glu Asn  
                                   485                                  490                                  495

20

Tyr Asp Pro Ile Gln Val Pro Pro Leu Asp Lys Leu Arg Ser Val Arg  
                                   500                                  505                                  510

25

Lys Gly Ser Gly Lys Gln Gln Ile Ala Thr Thr Met Ala Thr Val Arg  
                                   515                                  520                                  525

30

Thr Phe Lys Glu Leu Met Arg Asp Lys Gly Leu Ala Asp Arg Leu Val  
                   530                                  535                                  540

35

Pro Ile Ile Pro Asp Glu Ala Arg Thr Phe Gly Leu Asp Ser Trp Phe  
 545                                  550                                  555                                  560

40

Pro Thr Leu Lys Ile Tyr Asn Pro His Gly Gln Asn Tyr Val Pro Val  
                                   565                                  570                                  575

45

Asp His Asp Leu Met Leu Ser Tyr Arg Glu Ala Pro Glu Gly Gln Ile  
                                   580                                  585                                  590

50

Leu His Glu Gly Ile Asn Glu Ala Gly Ser Val Ala Ser Phe Ile Ala  
                                   595                                  600                                  605

55

Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Thr His Gly Lys Ala Met Ile Pro Leu Tyr  
                   610                                  615                                  620

60

Ile Phe Tyr Ser Met Phe Gly Phe Gln Arg Thr Gly Asp Ser Ile Trp  
 625                                  630                                  635                                  640

65

Ala Ala Ala Asp Gln Met Ala Arg Gly Phe Leu Leu Gly Ala Thr Ala  
                                   645                                  650                                  655

70

Gly Arg Thr Thr Leu Thr Gly Glu Gly Leu Gln His Met Asp Gly His  
                                   660                                  665                                  670

75

Ser Pro Val Leu Ala Ser Thr Asn Glu Gly Val Glu Thr Tyr Asp Pro  
                   675                                  680                                  685

## ES 2 335 828 T3

Ser Phe Ala Tyr Glu Ile Ala His Leu Val His Arg Gly Ile Asp Arg  
 690 695 700

5 Met Tyr Gly Pro Gly Lys Gly Glu Asp Val Ile Tyr Tyr Ile Thr Ile  
 705 710 715 720

10 Tyr Asn Glu Pro Thr Pro Gln Pro Ala Glu Pro Glu Gly Leu Asp Val  
 725 730 735

15 Glu Gly Leu His Lys Gly Ile Tyr Leu Tyr Ser Arg Gly Glu Gly Thr  
 740 745 750

Gly His Glu Ala Asn Ile Leu Ala Ser Gly Val Gly Met Gln Trp Ala  
 755 760 765

20 Leu Lys Ala Ala Ser Ile Leu Glu Ala Asp Tyr Gly Val Arg Ala Asn  
 770 775 780

25 Ile Tyr Ser Ala Thr Ser Trp Val Asn Leu Ala Arg Asp Gly Ala Ala  
 785 790 795 800

30 Arg Asn Lys Ala Gln Leu Arg Asn Pro Gly Ala Asp Ala Gly Glu Ala  
 805 810 815

Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly Pro Tyr Val Ala Val  
 820 825 830

35 Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile Arg Glu Trp Val Pro  
 835 840 845

40 Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe Gly Phe Ser Asp Thr  
 850 855 860

45 Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp Ala Glu Ser Ile Val  
 865 870 875 880

50 Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly Lys Ile Asp Val Ser  
 885 890 895

55 Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu  
 915 920

<210> 33

60 <211> 8556

<212> ADN

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

65 <220>

<221> CDS

<222> (2360)..(5125)

## ES 2 335 828 T3

<400> 33

tcacgttacg gcgatcaaca ccgcaaccac tacgagaaga tctccaaacg agaccaagag 60  
5 cgcttctaag cccgtctcat tttgcacctg ccattctgtg aggatatggc aggtgctttt 120  
tcatgccact atcttggggt tctcgggtatt agatcttctg ataaaaacce gatagttttc 180  
10 ttgcgctaga cactaattac ggcaccgctt aagcatggtc gtgacacgta aaacctgact 240  
taggccattt tgatgtgggt tagatcatat tgacgtcaat gaatgaagtg actaactccg 300  
15 ccgaatccac atcgtctaaa aggcctgggc gaccacgtaa agacgggcac gacgagaaga 360  
tcatcgacgc aactttacgg ctcatcgaca gcaatcgtcc cgtcacggtc aatgcagttg 420  
20 tcaaagaaag cggagtggca cgtgcagcgg tttatcgacg ctggcccagg ctagtggatc 480  
tagtagcgga agctttagat gccgggag ctccagttga aatagatacc ccaggggaca 540  
25 tcaaagagac cttgattgat gggctgttta caaatcaggc gaaaaccact ggagtctcct 600  
atcctcgtca gcgatttcgc aaacggctcg agttgggtgat gtcagatcaa gaattacagc 660  
30 tcgcctaatg gaattcacat gtgaagagac gtcgagaagc aaatattcgc gcgctgcaag 720  
tcgcgcaaga aaaaggccaa atccgggocg atctagacat cgaggcgtgc ctgatgcaa 780  
35 tccttggggt gttttattac caatcggtcg cgcgtggagt aaatttcacc gaccaaggta 840  
caacgcaacg atgcagagaa gccttggagg tgatctggca tggaatggaa ccttaaattc 900  
aggttctgac gaggtgcgaa gcaagttgtc gcgcgccgca cctcagtatc cggatcaact 960  
45 taatttcgaa gtgctggggt ttctcgcgca taccoaatgc gtaccgatgt gcccatgagc 1020  
gaaaaacagg ccacgataag tttcttaaaa cttatcgtgg cctgcttcta tatttgtgcg 1080  
50 ccctgacggg ctogaaccgc cgacctgctg ggtgtaaacc agctgctctt ccagctgagc 1140  
taaaggcgcg cacgtgcttt tctagaacca ccttgggtggc ctgaaagca acgagtgaaa 1200

55

60

65

## ES 2 335 828 T3

```

tactaacaca caatctccac agacctaaaa tcgctgctca ggccgtggaa attagcgatt 1260
gtaaggctt cttgtttcca cgctggacga ggcaagaacc ttgccaatta ccgagacggt 1320
5   ccgccttggc ctgcacgaga cctgccagtt gtgctgattc agagataact ccaggagcca 1380
gggtccttc tttaccaatg ccaggagtca acaccagat acgaccattc tcagcgaggg 1440
10  agcggatgga atccacaagt ccgtogacga gatgcgctc atcctcgcgc caccagagca 1500
gcacgacatc gcacagctcg tcggtttctt catcgagtag ttctcaccg attgcatctt 1560
15  cgatggactc gctgatcagc gtgtcggaat cttcatcca tccaatttct tgaacgatat 1620
gacccgattg aatgccgagt agttgagcat aatcctgggc accttgcttg actgcgcccg 1680
20  gagcgtcggc cactttaata atcctcctcg tgtgggccc gatgtgtttt tcgattacat 1740
ggattcaaca tgaaacccgc gggctattga tatatccgaa ttgcacatta ccgtccaacc 1800
25  ggtaacttga accaccttc cctggaattt tttcctttc ctccccctt acgctcaaga 1860
atcaatgaat tcaatcactg gccagcgatt aacttttca gtttcagtc ttggatttcc 1920
30  acaattctct tcaaaataat ggtggctaga ttttcatca aacctcacc aaaaggacat 1980
cagacctgta gttttatgcy attcgcgctca aacgtgagag aaacatcaca tctcacggga 2040
35  aactaccga taattctttg caaaactttg caaagggtaa tgaacatgca gctagtttcc 2100
gtagaaatgt tctttaaaaa atccacaaca attgccagga agcacaccga ttgatggata 2160
40  cctgaaatcc cagtgagcgc accactcccc ttacgtcaca gtctgtaaaa caaatcttcg 2220
gtgttgcgta tccttgtaa taacttatgc gttgacccat tcgtgcactt cgggtgtgcca 2280
caattaggta cgaccaagaa tgggaccggg aaaccgggac gtataaacga aataaaacat 2340
45  tccaacagga ggtgtggaa atg gcc gat caa gca aaa ctt ggt ggt aag ccc 2392
      Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro
          1           5           10
50  tcg gat gac tct aac ttc gcg atg atc cgc gat ggc gtg gca tct tat 2440
      Ser Asp Asp Ser Asn Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr
          15           20           25
55  ttg aac gac tca gat ccg gag gag acc aac gag tgg atg gat tca ctc 2488

```

# ES 2 335 828 T3

	Leu	Asn	Asp	Ser	Asp	Pro	Glu	Glu	Thr	Asn	Glu	Trp	Met	Asp	Ser	Leu		
			30					35					40					
5	gac	gga	tta	ctc	cag	gag	tct	tct	cca	gaa	cgt	gct	cgt	tac	ctc	atg	2536	
	Asp	Gly	Leu	Leu	Gln	Glu	Ser	Ser	Pro	Glu	Arg	Ala	Arg	Tyr	Leu	Met		
		45					50					55						
10	ctt	cgt	ttg	ctt	gag	cgt	gca	tct	gca	aag	cgc	gta	tct	ctt	ccc	cca	2584	
	Leu	Arg	Leu	Leu	Glu	Arg	Ala	Ser	Ala	Lys	Arg	Val	Ser	Leu	Pro	Pro		
	60					65					70				75			
15	atg	acg	tca	acc	gac	tac	gtc	aac	acc	att	cca	acc	tct	atg	gaa	cct	2632	
	Met	Thr	Ser	Thr	Asp	Tyr	Val	Asn	Thr	Ile	Pro	Thr	Ser	Met	Glu	Pro		
					80						85				90			
20	gaa	ttc	cca	ggc	gat	gag	gaa	atg	gag	aag	cgt	tac	cgt	cgt	tgg	att	2680	
	Glu	Phe	Pro	Gly	Asp	Glu	Glu	Met	Glu	Lys	Arg	Tyr	Arg	Arg	Trp	Ile		
				95					100					105				
25	cgc	tgg	aac	gca	gcc	atc	atg	gtt	cac	cgc	gct	cag	cga	cca	ggc	atc	2728	
	Arg	Trp	Asn	Ala	Ala	Ile	Met	Val	His	Arg	Ala	Gln	Arg	Pro	Gly	Ile		
			110						115					120				
30	ggc	gtc	ggc	gga	cac	att	tcc	act	tac	gca	ggc	gca	gcc	cct	ctg	tac	2776	
	Gly	Val	Gly	Gly	His	Ile	Ser	Thr	Tyr	Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Leu	Tyr		
		125												135				
35	gaa	ggt	ggc	ttc	aac	cac	ttc	ttc	cgc	ggc	aag	gat	cac	cca	ggc	ggc	2824	
	Glu	Val	Gly	Phe	Asn	His	Phe	Phe	Arg	Gly	Lys	Asp	His	Pro	Gly	Gly		
	140						145				150				155			
40	ggc	gac	cag	atc	ttc	ttc	cag	ggc	cac	gca	tca	cca	ggt	atg	tac	gca	2872	
	Gly	Asp	Gln	Ile	Phe	Phe	Gln	Gly	His	Ala	Ser	Pro	Gly	Met	Tyr	Ala		
					160						165				170			
45	cgt	gca	ttc	atg	gag	ggt	cgc	ctt	tct	gaa	gac	gat	ctc	gat	ggc	ttc	2920	
	Arg	Ala	Phe	Met	Glu	Gly	Arg	Leu	Ser	Glu	Asp	Asp	Leu	Asp	Gly	Phe		
				175										180		185		
50	cgt	cag	gaa	ggt	tcc	cgt	gag	cag	ggt	ggc	att	ccg	tcc	tac	cct	cac	2968	
	Arg	Gln	Glu	Val	Ser	Arg	Glu	Gln	Gly	Gly	Ile	Pro	Ser	Tyr	Pro	His		
					190									200				
55	cca	cac	ggt	atg	aag	gac	ttc	tgg	gag	ttc	cca	act	gtg	tcc	atg	ggt	3016	
	Pro	His	Gly	Met	Lys	Asp	Phe	Trp	Glu	Phe	Pro	Thr	Val	Ser	Met	Gly		
			205											215				
60	ctt	ggc	cca	atg	gat	gcc	att	tac	cag	gca	cgt	ttc	aac	cgc	tac	ctc	3064	

65



# ES 2 335 828 T3

	Ala	His	Thr	Ile	Lys	Gly	Tyr	Gly	Leu	Gly	His	Asn	Phe	Glu	Gly	Arg		
					415				420					425				
5	aac	gca	acc	cac	cag	atg	aag	aag	ctg	acg	ctt	gat	gat	ctg	aag	ttg	3688	
	Asn	Ala	Thr	His	Gln	Met	Lys	Lys	Leu	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys	Leu		
		430					435						440					
10	ttc	cgc	gac	aag	cag	ggc	atc	cca	atc	acc	gat	gag	cag	ctg	gag	aag	3736	
	Phe	Arg	Asp	Lys	Gln	Gly	Ile	Pro	Ile	Thr	Asp	Glu	Gln	Leu	Glu	Lys		
		445				450					455							
15	gat	cct	tac	ctt	cct	cct	tac	tac	cac	cca	ggt	gaa	gac	gct	cct	gaa	3784	
	Asp	Pro	Tyr	Leu	Pro	Pro	Tyr	Tyr	His	Pro	Gly	Glu	Asp	Ala	Pro	Glu		
		460			465					470				475				
20	atc	aag	tac	atg	aag	gaa	cgt	cgc	gca	gcg	ctc	ggt	ggc	tac	ctg	cca	3832	
	Ile	Lys	Tyr	Met	Lys	Glu	Arg	Arg	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Tyr	Leu	Pro		
					480				485					490				
25	gag	cgt	cgt	gag	aac	tac	gat	cca	att	cag	ggt	cca	cca	ctg	gat	aag	3880	
	Glu	Arg	Arg	Glu	Asn	Tyr	Asp	Pro	Ile	Gln	Val	Pro	Pro	Leu	Asp	Lys		
				495				500						505				
30	ctt	cgc	tct	gtc	cgt	aag	ggc	tcc	ggc	aag	cag	cag	atc	gct	acc	act	3928	
	Leu	Arg	Ser	Val	Arg	Lys	Gly	Ser	Gly	Lys	Gln	Gln	Ile	Ala	Thr	Thr		
				510			515							520				
35	atg	gcg	act	ggt	cgt	acc	ttc	aag	gaa	ctg	atg	cgc	gat	aag	ggc	ttg	3976	
	Met	Ala	Thr	Val	Arg	Thr	Phe	Lys	Glu	Leu	Met	Arg	Asp	Lys	Gly	Leu		
		525				530							535					
40	gct	gat	cgc	ctt	gtc	cca	atc	att	cct	gat	gag	gca	cgt	acc	ttc	ggt	4024	
	Ala	Asp	Arg	Leu	Val	Pro	Ile	Ile	Pro	Asp	Glu	Ala	Arg	Thr	Phe	Gly		
		540			545					550					555			
45	ctt	gac	tct	tgg	ttc	cca	acc	ttg	aag	atc	tac	aac	ccg	cac	ggt	cag	4072	
	Leu	Asp	Ser	Trp	Phe	Pro	Thr	Leu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Pro	His	Gly	Gln		
				560						565				570				
50	aac	tac	gtg	cct	ggt	gac	cac	gac	ctg	atg	ctc	tcc	tac	cgt	gag	gca	4120	
	Asn	Tyr	Val	Pro	Val	Asp	His	Asp	Leu	Met	Leu	Ser	Tyr	Arg	Glu	Ala		
			575						580					585				
55	cct	gaa	gga	cag	atc	ctg	cac	gaa	ggc	atc	aac	gag	gct	ggt	tcc	gtg	4168	
	Pro	Glu	Gly	Gln	Ile	Leu	His	Glu	Gly	Ile	Asn	Glu	Ala	Gly	Ser	Val		
		590				595								600				
60	gca	tcg	ttc	atc	gct	gcg	ggt	acc	tcc	tac	gcc	acc	cac	ggc	aag	gcc	4216	
65																		



# ES 2 335 828 T3

	Arg Asp Gly	Ala Ala Arg	Asn Lys Ala	Gln Leu Arg	Asn Pro Gly	Ala	
		800		805		810	
5	gat gct ggc gag gca ttc gta acc acc cag ctg aag cag acc tcc ggc						4840
	Asp Ala Gly Glu Ala Phe Val Thr Thr Gln Leu Lys Gln Thr Ser Gly	815	820	825			
10	cca tac gtt gca gtg tct gac ttc tcc act gat ctg cca aac cag atc						4888
	Pro Tyr Val Ala Val Ser Asp Phe Ser Thr Asp Leu Pro Asn Gln Ile	830	835	840			
15	cgt gaa tgg gtc cca ggc gac tac acc gtt ctg ggt gca gat ggc ttc						4936
	Arg Glu Trp Val Pro Gly Asp Tyr Thr Val Leu Gly Ala Asp Gly Phe	845	850	855			
20	ggt ttc tct gat acc cgc cca gct gct cgt cgc ttc ttc aac atc gac						4984
	Gly Phe Ser Asp Thr Arg Pro Ala Ala Arg Arg Phe Phe Asn Ile Asp	860	865	870	875		
25	gct gag tcc att gtt gtt gca gtg ctg aac tcc ctg gca cgc gaa ggc						5032
	Ala Glu Ser Ile Val Val Ala Val Leu Asn Ser Leu Ala Arg Glu Gly	880	885	890			
30	aag atc gac gtc tcc gtt gct gct cag gct gct gag aag ttc aag ttg						5080
	Lys Ile Asp Val Ser Val Ala Ala Gln Ala Ala Glu Lys Phe Lys Leu	895	900	905			
35	gat gat cct acg agt gtt tcc gta gat cca aac gct cct gag gaa						5125
	Asp Asp Pro Thr Ser Val Ser Val Asp Pro Asn Ala Pro Glu Glu	910	915	920			
40	taaatacact caaggacag ataaatcccg ccgccagacg ttagtctggc gccgggattc 5185						
45	gtcgtaaagc aagctctttt tagccgagaa acgccttgtc agacaatggt gcgcccttga 5245						
	tattggcgaa ctctgcagc aaatcgcgca cagtcaactt cgacttggtg gcctgatctg 5305						
50	cctggtagac aatctggcct tcatgcatca tgatcaggcg attgccagg cgaattgcct 5365						
	gttccatggt gtgcgtgacc ataagcgtag tcagagttcc atctgccag atcttttcgg 5425						
55	tcaagtggt cacaagctct gcacgctgtg gatcaagcgc tgcggtgtgc tcatccaaca 5485						
	gcatgatttt aggttgagta aaaccagcca tcagcaggga caatgcctga cgctgaccgc 5545						
60	cagagagcaa accaactttg gcagtgagcc tgttttcag acccagctca aggcgctcaa 5605						
	gttctgctt gaattgetca cggcgcttcg aggtcagtc aaagcccaat ccacggcgt 5665						
65							

## ES 2 335 828 T3

tgccgcgcag caacgcgatg gccagattct cttcaatggt gagattcggc gcggtgcctg 5725  
5 ccaaaggatc ctgaaaaacg cggccgatgt agcgggcacg cttgtgctct gacatcttgt 5785  
ttaccttgtt gccgtcgatg gaaatctcgc cggaatcaac aagcaaacgg ccagaaacag 5845  
10 cgttgagcag ggtggattta cccgcaccgt tagaacgat gacggtgaca aaatcgccct 5905  
cagccatata gagtttgagc tgctgcaacg cgoggcgctc attcacagtg ccggggaaga 5965  
15 aggttttga aattccgttg atggataaca tgtcttaagc ctccactgct actggttget 6025  
taggcttcgg tgccttgag aacttcgac gccacctcg cagcagcatg gcgacaacca 6085  
20 ccaagatcgc agaaattgcc ttcatatogt tggggtcaag gccaacgcgc agtgctgcga 6145  
aaatgatcag gcggtacgcg atggcaccga cgatgacagc caacacagcc aaccacagc 6205  
25 gacgctgacc gaagatggcc tggcccaaaa ataaccgatg cgagaccgat cacgatgagg 6265  
ccaataccca tcgaaatata tgcgaagccc tggtactgag cgatgagtgc accggcaaga 6325  
30 ccaacagaac catttgacag ggagatggtg aggattttgg tgaatccgt tgaaacacca 6385  
aaggactgca ccatcgccc gttgtcgccg gtggatcgca gcgacagtcc gatatcagtg 6445  
35 ttgaggaacc agatgacgat gagtcccaaa aatcccactg caacggcgag gatcgccggg 6505  
cctgcccatag tgccgaggag gccggcgctc cgaagcgggg tgaagagggt atcgggtgoc 6565  
40 aacaatggca cgttcgccc acccatgatg cgcaagttaa ccgaccacia cgcaatcatg 6625  
gtcaaaatac ctgcgagcaa accatcgatc ttgcccttgg tgtgcagcaa accggtgatc 6685  
45 atgccagcga taaagccagt aacgaaacca gcggcagtag ccataagagg aggccagcca 6745  
gacataagag ctgtcgcagc tgttgccgcg ccagtggta ggtgcccgc aacggtgagg 6805  
50 tcgggaaagt tgagcacacg gaacgtcaaa tagacgcca atgcgacaac tccgtacaac 6865  
aatccgaact caaaagcgc gatcatacgc gttcggcctt atccaaaatc tcttgaggga 6925  
55 tctccacgcc ctggcgctct gctgcatctt cgttgatcac gtaggtgaac tcagttgcag 6985  
tctccacagg catggttgct gggttotcgc cgtcctgcag aatacgcaga gccatctcgc 7045  
60 cagtctggcg gccaaagctc gtgtaatcga taaccagggt tgccagtgcg ccaccctcaa 7105  
65

## ES 2 335 828 T3

cagtgccgga ctcagcaccg atcacagga tctgcttctg ctcagcaacc tgaaccagag 7165  
 aagaaatacc ggaaacaacc atgttgtcag ttggaacgta gatgacatca acatcgccga 7225  
 5 gagcttcaac agcctgctga atctcgttca cggtagtgac agtctgagta ttaacggaca 7285  
 gccccagtgg ctcagcagcc ttggtgacct catcgacctg cacctgagag ttgacctcac 7345  
 10 cagacgcgta gacgatgccg atggactttg cgtcaggaac cagctgctgc aaaagctcca 7405  
 actgctgctc aatcgggtgc atatcagaag taccggtgac gtttccgcca ggtgcttcat 7465  
 15 tagaatccac cagctctgcc gacactgcat cggtaactgc ggtgaacagg actgggatat 7525  
 cagtgatatt ctgcgcagtt gcctgtgctg ctggagttgc aacagccaac acgagatcca 7585  
 20 aattgtcaga agcgaactgc tgagaaatag tcagtgcagt gccctgctcg ccgtagcgt 7645  
 tttgctcatc aaaggtgacg tcaacgcctg cctcttcaaa agcttccttg aaaccagtgg 7705  
 25 tcgctgcata aagtgcaggg tgctgaacaa gctggttgat gccaaactcg taagagtgc 7765  
 cacctgcagc atcagtggag gtggagctgt cactggaatc gcttgagcac gaagccaacg 7825  
 30 ccaaggcgcc aacagtaaag atgcttgca gtaccttca acggaagaa aacatagcac 7885  
 atctccttaa agtgttatct tcaaaaagg gcagacagcg tcaacacatg tctcggataa 7945  
 35 agaaccatat gtgaaatgtc tcatgattta aactacttgt tctaccagtc atatgcgcaa 8005  
 ttccccctgg atatcccgca ggacatggac aaaatgggtg gatagcgggt gcaccaattc 8065  
 40 aatcttttaa aggcctaga caccgcgatt tccttaatcg atcattaaag agggatcctc 8125  
 tcccctaaca aacctcaaaa gactagagtg gggaacacca tgaacgtttc ctcaataaaa 8185  
 45 cccagtgact ctgaccgga atatcttcaa tcagaactca cccggctcgt tggccagggg 8245  
 cgactcgatc tagatactta ccaagacgtg gttgataccg tttggtctac tgatgatcta 8305  
 50 ggcgagttga tgaggatccg tgcccgttc ctgggagggc cgcaggtttc gcagcagcgg 8365  
 ccccagcagc cgcagcaacc acatcagcgg ccgcaacagc aaccgccaca gcattatgga 8425  
 55 caaccocgct acggccaate acctcaatat ccaccgcagc agcctccgca taatcagccc 8485  
 60 ggctattacc ccgatcccgg ccttgccag cagcaaccac cgatgcacca gccaccaacg 8545  
 cgtccaaatc a 8556

<210> 34

65 <211> 922

<212> PRT

# ES 2 335 828 T3

<213> *Brevibacterium lactofermentum*

<400> 34

```

5      Met Ala Asp Gln Ala Lys Leu Gly Gly Lys Pro Ser Asp Asp Ser Asn
      1              5              10              15

10     Phe Ala Met Ile Arg Asp Gly Val Ala Ser Tyr Leu Asn Asp Ser Asp
      20              25              30

15     Pro Glu Glu Thr Asn Glu Trp Met Asp Ser Leu Asp Gly Leu Leu Gln
      35              40              45

20     Glu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Met Leu Arg Leu Leu Glu
      50              55              60

25     Arg Ala Ser Ala Lys Arg Val Ser Leu Pro Pro Met Thr Ser Thr Asp
      65              70              75              80

30     Tyr Val Asn Thr Ile Pro Thr Ser Met Glu Pro Glu Phe Pro Gly Asp
      85              90              95

35     Glu Glu Met Glu Lys Arg Tyr Arg Arg Trp Ile Arg Trp Asn Ala Ala
      100             105             110

40     Ile Met Val His Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ile Gly Val Gly Gly His
      115             120             125

45     Ile Ser Thr Tyr Ala Gly Ala Ala Pro Leu Tyr Glu Val Gly Phe Asn
      130             135             140

50     His Phe Phe Arg Gly Lys Asp His Pro Gly Gly Gly Asp Gln Ile Phe
      145             150             155             160

55     Phe Gln Gly His Ala Ser Pro Gly Met Tyr Ala Arg Ala Phe Met Glu
      165             170             175

60     Gly Arg Leu Ser Glu Asp Asp Leu Asp Gly Phe Arg Gln Glu Val Ser
      180             185             190

65     Arg Glu Gln Gly Gly Ile Pro Ser Tyr Pro His Pro His Gly Met Lys
      195             200             205

```

## ES 2 335 828 T3

	Asp Phe Trp	Glu Phe Pro	Thr Val Ser	Met Gly Leu	Gly Pro Met	Asp
	210		215		220	
5	Ala Ile Tyr	Gln Ala Arg	Phe Asn Arg	Tyr Leu Glu	Asn Arg Gly	Ile
	225		230		235	240
10	Lys Asp Thr	Ser Asp Gln	His Val Trp	Ala Phe Leu	Gly Asp Gly	Glu
		245		250		255
15	Met Asp Glu	Pro Glu Ser	Arg Gly Leu	Ile Gln Gln	Ala Ala Leu	Asn
		260		265		270
20	Asn Leu Asp	Asn Leu Thr	Phe Val Val	Asn Cys Asn	Leu Gln Arg	Leu
	275		280		285	
25	Asp Gly Pro	Val Arg Gly	Asn Thr Lys	Ile Ile Gln	Glu Leu Glu	Ser
	290		295		300	
30	Phe Phe Arg	Gly Ala Gly	Trp Ser Val	Ile Lys Val	Val Trp Gly	Arg
	305		310		315	320
35	Glu Trp Asp	Glu Leu Leu	Glu Lys Asp	Gln Asp Gly	Ala Leu Val	Glu
		325		330		335
40	Ile Met Asn	Asn Thr Ser	Asp Gly Asp	Tyr Gln Thr	Phe Lys Ala	Asn
		340		345		350
45	Asp Gly Ala	Tyr Val Arg	Glu His Phe	Phe Gly Arg	Asp Pro Arg	Thr
	355		360		365	
50	Ala Lys Leu	Val Glu Asn	Met Thr Asp	Glu Glu Ile	Trp Lys Leu	Pro
	370		375		380	
55	Arg Gly Gly	His Asp Tyr	Arg Lys Val	Tyr Ala Ala	Tyr Lys Arg	Ala
	385		390		395	400
60	Leu Glu Thr	Lys Asp Arg	Pro Thr Val	Ile Leu Ala	His Thr Ile	Lys
		405		410		415
65	Gly Tyr Gly	Leu Gly His	Asn Phe Glu	Gly Arg Asn	Ala Thr His	Gln
		420		425		430
70	Met Lys Lys	Leu Thr Leu	Asp Asp Leu	Lys Leu Phe	Arg Asp Lys	Gln
		435		440		445
75	Gly Ile Pro	Ile Thr Asp	Glu Gln Leu	Glu Lys Asp	Pro Tyr Leu	Pro
	450		455		460	





## ES 2 335 828 T3

	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 36	
	acatggaaca ggcaattcgc	20
15	<210> 37	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 37	
	cgtcccgggc tgtaaaca atcttcgg	28
30	<210> 38	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
40	<400> 38	
	atccccgggc ttaccacaa gttttgc	27
45	<210> 39	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
55	<400> 39	
	cttatcggtt gccacattcg tgcacttcgg	30
60	<210> 40	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

## ES 2 335 828 T3

	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 40	
5	gcgttgacctt atcgtgcac ttcggtgtgc tataattagg	40
	<210> 41	
10	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 41	
20	gcgttgccac atcgtgcac ttcggtgtgc tataattagg	40
	<210> 42	
25	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 42	
35	ttttaaaccg ttctggagaa gactcctgga gtaatccg	38
	<210> 43	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 43	
50	cgatcttgcc ttcgctgcc	20
	<210> 44	
55	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 44	
65	agaccgccgg agtatgcaag aacgatgccg	30

## ES 2 335 828 T3

	<210> 45	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
10	<400> 45	
	gattcacca tcaatcatct tcttcagta	30
15	<210> 46	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
25	<400> 46	
	accttcgacc agaccctggc taagggttt	30
30	<210> 47	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
40	<400> 47	
	gctaacaagc gcgatcgca agctggcaac	30
45	<210> 48	
	<211> 25	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
55	<400> 48	
	gcatgacac cgttttctc ctcgc	25
60	<210> 49	
	<211> 25	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 335 828 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 49	
	ggegacatcc ttgccagat gatca	25
10	<210> 50	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
20	<400> 50	
	gattcacca tcaatcatct tcttc	25
25	<210> 51	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 51	
	gccaggtaca actgtctgaa ttgc	24
40	<210> 52	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 52	
	gttaatcgct tgccaatgca ggcaggtgaa gtataaccg	40
55	<210> 53	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 49	
	gttaatcgct tgctaatgca ggcaggtgaa gtataaccg	40

## ES 2 335 828 T3

<210> 54  
<211> 40  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
10  
<400> 54

gttaatcgct tgtcaatgca ggcaggtgtaag gtataaccg 40

15  
<210> 55  
<211> 40  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
25  
<400> 55

gttaatcgct tgtaatgca ggcaggtgtaag gtataatccg 40

30  
<210> 56  
<211> 40  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
40  
<400> 56

gttaatcgct tgtcaatgca ggcaggtgtaag gtataatccg 40

45  
<210> 57  
<211> 30  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
55  
<400> 57

gggtccagc ctctgctcgga attcgtggag 30

60  
<210> 58  
<211> 25  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia artificial

## ES 2 335 828 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
5	<400> 58	
	gcgttaccca gagctggatc ctgg	25
10	<210> 59	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
20	<400> 59	
	cagttgtggc tgatcg	16
25	<210> 60	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
35	<400> 60	
	cttcccaga ctctggc	17
40	<210> 61	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
50	<400> 61	
	gctataattt gacgtgagca t	21
55	<210> 62	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
65	<400> 62	
	gctcagtc aattatagca gtgtc	25

## ES 2 335 828 T3

<210> 63  
<211> 54  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
10

<400> 63  
ttgttgcac tctgtgac actgctataa ttgaacgtg agcagtaac agcc 54

15 <210> 64  
<211> 62  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
25

<400> 64  
gttaactgct cacgttcaaa ttatagcatg tcgcacagaa tgacaacaaa gaattaaaat 60  
30 tg 62

<210> 65  
<211> 25  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 65  
45 gctagcctcg ggagctctct aggag 25

<210> 66  
<211> 25  
50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
55 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 66  
60 gatctttccc agactctggc cacgc 25

65