



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 788**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C07K 5/06 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02788635 .7**

86 Fecha de presentación : **21.11.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1449917**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54

Título: **Procedimiento para la producción de L-aminoácidos utilizando *Escherichia*.**

30

Prioridad: **23.11.2001 RU 2001131570**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73

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

72

Inventor/es: **Livshits, Vitaliy Arkadyevich;**
Vitushkina, Maria Viacheslavovna;
Gusyatiner, Mikhail Markovich;
Ziyatdinov, Mikhail Kharisovich;
Akhverdian, Valery Zavenovich;
Savrasova, Ekaterina Alekseevna;
Doroshenko, Vera Georgievna y
Mashko, Sergey Vladimirovich

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 269 788 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de L-aminoácidos utilizando *Escherichia*.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la biotecnología, específicamente a un procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediante fermentación y más específicamente, a un gen derivado de la bacteria *Escherichia coli*. El gen es útil para mejorar la productividad de los L-aminoácidos, por ejemplo, L-fenilalanina y L-treonina.

10 **Antecedentes de la técnica**

Convencionalmente, los L-aminoácidos se han producido industrialmente mediante el procedimiento de fermentación, utilizando cepas de microorganismos obtenidos a partir de fuentes naturales o mutantes de las mismas, modificados especialmente para potenciar la productividad de los L-aminoácidos.

Se han dado a conocer muchas técnicas para potenciar la productividad de los L-aminoácidos, por ejemplo, mediante transformación del microorganismo mediante ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente US nº 4.278.765). Estas técnicas se basan en aumentar las actividades de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los aminoácidos y/o en la desensibilización de las enzimas diana a partir de la inhibición mediante retroalimentación por el L-aminoácido producido (véase, por ejemplo, la solicitud japonesa sometida a inspección pública No56-18596 (1981), WO 95/16042 o la patente US nº 5.661.012 y nº 6.040.160).

Por otra parte, la potenciación de la actividad excretora de los aminoácidos puede mejorar la productividad de la cepa productora del L-aminoácido. Se da a conocer la cepa productora de Lisina de una bacteria que pertenece al género *Corynebacterium* que presente un aumento de la expresión del gen de la excreción de la L-lisina (gen *lysE*) (WO 9723597A2). Además, se dan asimismo a conocer genes que codifican proteínas de salida apropiadas para la secreción de la L-cisteína, L-cistina, N-acetilserina o derivados de tiazolidina (patente US nº 5.972.663).

En la actualidad, se dan a conocer varios genes de *Escherichia coli* que codifican proteínas putativas de membrana que potencian la producción de L-aminoácidos. Copias adicionales del gen *rhtB* hacen a una bacteria más resistente a la L-homoserina y potencian la producción de L-homoserina, L-treonina, L-alanina, L-valina y L-isoleucina (solicitud de patente europea EP994190A2). Copias adicionales del gen *rhtC* hacen a una bacteria más resistente a la L-homoserina y a la L-treonina, y potencian la producción de L-homoserina, L-treonina y L-leucina (solicitud de patente europea EP1013765A1). Copias adicionales de los genes *yahN*, *yeaS*, *yfiK* e *yggA* potencian la producción del ácido L-glutámico, L-lisina, L-treonina, L-alanina-L-histidina, L-prolina, L-arginina, L-valina y L-isoleucina (solicitud de patente europea EP1016710A2).

Anteriormente, los presentes inventores obtuvieron, con respecto a la *E. coli* K-12, un mutante que presenta una mutación, *thrR* (a la que en la presente memoria se la alude como *rhtA23*) que está relacionada en la resistencia a altas concentraciones de treonina o homoserina en un medio mínimo (Astaurova, O.B. *et al.*, Appl. Biochem. Microbiol., 21, 611-616-1985). La mutación mejoró la producción de L-treonina (patente US nº 974817), homoserina y glutamato (Astaurova, O.B. *et al.*, Appl. Biochem. Microbiol., 27, 556-561, 1991) por las respectivas cepas productoras de *E. coli*.

Además, los presente inventores han revelado que el gen *rhtA* existe a 18 min en el cromosoma de *E. coli* cerca del operón *glnHPQ* que codifica los componentes del sistema de transporte de la glutamina, y que el gen *rhtA* es idéntico a *ybiF* ORF entre los genes *pexB* y *ompX*. La unidad que expresa una proteína codificada por el ORF se ha denominado como *rhtA* (*rht*:resistencia al gen de la homoserina y de la treonina).

Además, los presentes inventores han encontrado que la amplificación del gen *rhtA* confería asimismo resistencia a la homoserina y la treonina. La mutación *rhtA23* es una sustitución A por G en posición -1 con respecto al codón ATG de iniciación (RESUMEN del 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology en combinación con 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California, 24-29 agosto, 1997, resumen nº 457). Es sabido que una composición nucleótida del espaciador entre la secuencia SD y el codón de iniciación y especialmente las secuencias inmediatamente por encima del codón de iniciación afectan profundamente a la capacidad traductora del ARNm. Se encontró un registro de 20 veces en los niveles de expresión, dependiendo de la naturaleza de los tres nucleótidos que preceden al codón de inicio (Gold *et al.*, Annu. Rev. Microbiol., 35, 365-403, 1981; Hui *et al.*, *EMBO J.*, 3, 623-629, 1984). Por tanto, puede sugerirse que la mutación *rhtA23* aumenta la expresión del gen *rhtA*.

El gen *rhtA* codifica una proteína que está formada por 295 residuos aminoácidos y es una proteína altamente hidrofóbica que contiene 10 segmentos transmembranales predichos. Una búsqueda PSIBLAST de la secuencia nucleótida de la cepa K-12 de *A. coli* perteneciente al género *Escherichia coli* (Science, 277, 1453-1474 (1977) reveló por lo menos 10 proteínas homólogas a la RhtA. Entre ellas, hay proteínas codificadas por los genes *ydeD* y *yedA*. Anteriormente, se mostró que el gen *ydeD* está implicado en la salida de los metabolitos de la vía de la cisteína (Dassler *et al.*, Mol. Microbiol., 36, 1101-1112, 2000; US nº 5.972.663). El gen *yedA* ha sido conocido como subunidad transmembranosa putativa, que puede codificar una proteína funcionalmente desconocida (números 8037 a 8957 en la secuencia del registro GenBank AE000287 U00096).

El documento WO 01/70955 A da a conocer proteínas de proliferación de las células de *E. coli* y el ADN que codifica a estas proteínas, pudiendo sobreexpresarse dicho ADN para alcanzar la sobre producción proteica.

5 El documento EP-A-1 013 765 da a conocer una bacteria que pertenece al género *Escherichia* que posee la capacidad para la producción de un aminoácido, y en la que el gen *rhtC* codifica una proteína que presenta la actividad de hacer que una bacteria que tenga la proteína resistente a la L-treonina, se potencie.

10 Aleshin V.V. *et al.*: "A new family of amino-acid-efflux proteins" TIBS Trend in Biochemical Sciences, Elsevier Publication, Cambridge, EN, vol 24, n° 4, 1 abril 1999 (1999-04-01), páginas 133-135, XP004214249 ISSN; 0968-0004 da a conocer la identificación de una nueva familia de proteínas de salida de aminoácidos que pueden utilizarse para la producción de aminoácidos.

Exposición de la invención

15 Un objetivo de la presente invención consiste en potenciar la producción de cepas que produzcan L-aminoácidos y proporcionar un procedimiento para la producción de L-aminoácidos, por ejemplo, L-fenilalanina y L-treonina utilizando estas cepas.

20 El objetivo se alcanzó identificando que el gen *yedA* que codifica una proteína de membrana, homólogo al RhtA, que no está implicado en la vía biosintética de un L-aminoácido diana, confería una resistencia a microorganismos a varios aminoácidos y análogos de aminoácidos, cuando el alelo de tipo salvaje del gen se amplificó en un vector multicopia en el microorganismo. Además, el gen *yedA* puede potenciar la producción de aminoácidos cuando sus copias adicionales se introducen en las células de la cepa productora respectiva.

25 La presente invención es como sigue:

(1) Procedimiento para la producción de un L-aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por L-treonina y L-fenilalanina, que comprende cultivar una bacteria que pertenece al género *Escherichia* en un medio de cultivo y recuperar del medio de cultivo el L-aminoácido que va a producirse y acumularse en el medio, en el que dicha bacteria se potencia potenciando la actividad de una proteína tal como se define en los siguientes apartados (A) o (B) en una célula de dicha bacteria:

(A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 2 en la lista de Secuencias;

35 (B) una proteína que comprende una secuencia aminoácida que incluye delección, sustitución, inserción o adición de uno a cinco aminoácidos en la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°:2 en la lista de Secuencias, y que posee la actividad de conferir, a una bacteria que pertenece al género *Escherichia*, resistencia a un L-aminoácido, seleccionado de entre el grupo constituido por L-fenilalanina, L-treonina, L-homoserina y L-cisteína y/o un análogo de aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por p-fluoro-fenilalanina, 5-fluoro-DL-triptófano, S-(2-aminoetil)cisteína y 4-aza-DL-leucina, en la que dicha actividad de la proteína según se define en (A) o (B) se potencia transformando dicha bacteria con un ADN que codifica la proteína tal como se define en (A) o (B), utilizando un vector multicopia que contiene dicho ADN, o alterando la secuencia de regulación de la expresión de dicho ADN en el cromosoma de dicha bacteria.

45 (De ahora en adelante, se hará referencia a las proteínas definidas en los apartados anteriores (A) o (B) como "proteínas de la presente invención")

(2) Procedimiento según el procedimiento anterior, en el que el L-aminoácido que va a producirse es la L-fenilalanina.

50 (3) Procedimiento según el procedimiento anterior, en el que el L-aminoácido que va a producirse es la L-treonina.

(4) Procedimiento para la producción de un éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina, que comprende

55 cultivar la bacteria tal como se ha descrito anteriormente en un medio de cultivo para producir y acumular L-fenilalanina en el medio, presentando dicha bacteria productividad de la L-fenilalanina, y

60 sintetizando el éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina a partir del ácido aspártico o su derivado y la L-fenilalanina obtenida.

(5) Procedimiento según el procedimiento anterior, que comprende además

esterificar la L-fenilalanina para generar un éster alquílico inferior de la L-fenilalanina,

65 condensar el éster alquílico inferior de la L-fenilalanina con el derivado del ácido aspártico, en el que el derivado es anhídrido N-acil-L-aspártico,

separar el éster alquílico inferior de la N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina de la mezcla reactiva, e

hidrogenar el éster alquílico inferior de la N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina para generar el éster alquílico inferior de la α -aspartil-L-fenilalanina.

En la presente invención, un aminoácido es de configuración L-si no se indica lo contrario.

El procedimiento para la producción de el L-aminoácido incluye la producción de la L-fenilalanina utilizando la bacteria que produce la L-fenilalanina, en la que las actividades de las proteínas de la presente invención, tal como las que comprenden la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 2, se potencian. Asimismo, el procedimiento para la producción de el L-aminoácido incluye la producción de L-treonina utilizando una bacteria que produce la L-treonina, en la que las actividades de las proteínas de la presente invención tal como las que comprenden la secuencia aminoácida que se muestra en la SEC ID n°: 2, se potencian.

La presente invención se explicará en detalle a continuación.

La bacteria de la presente invención es una bacteria productora de un L-aminoácido que pertenece al género *Escherichia*, en la que la producción del L-aminoácido por la bacteria es potenciada potenciando la actividad de las proteínas de la presente invención en una célula de la bacteria.

En la presente invención, "bacteria productora de L-aminoácido" significa una bacteria que presenta la capacidad para producir y acumular el L-aminoácido en un medio, cuando la bacteria se cultiva en éste. La bacteria puede presentar la capacidad para producir dicho L-aminoácido como una propiedad de una cepa salvaje de la bacteria, o puede potenciarse o conferirse mediante la cría (o producción).

Una bacteria de la presente invención es la bacteria que produce L-aminoácidos que pertenece al género *Escherichia* que muestra una potenciación de las proteínas, que potencia la productividad del L-aminoácido diana. Concretamente, la bacteria de la presente invención es una bacteria productora de L-aminoácidos que pertenece al género *Escherichia* que posee actividades potenciadas de las proteínas de la presente invención. Más concretamente, la bacteria de la presente invención aloja al ADN que posee el gen *yedA* sobreexpresado en el cromosoma o en un plásmido en la bacteria y que posee capacidad potenciada para producir el L-aminoácido, por ejemplo, L-fenilalanina y L-treonina, utilizando estas cepas.

Las proteínas con actividad potenciada incluyen las definidas en los siguientes apartados, (A) o (B):

(A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 2 en la lista de Secuencias;

(B) una proteína que comprende una secuencia aminoácida que incluye delección, sustitución, inserción o adición de uno a cinco aminoácidos en la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°:2 en la lista de Secuencias, y que posee la actividad de hacer que una bacteria presente una potenciación de la resistencia a un aminoácido como fenilalanina, treonina, homoserina o cisteína y/o análogos de aminoácidos tales como la p-fluoro-fenilalanina, 5-fluoro-DL-triptófano, S-(2-aminoetil)cisteína y 4-aza-DL-leucina.

"Resistencia a un L-aminoácido y/o un análogo de aminoácido" significa la capacidad para la bacteria de desarrollarse en un medio mínimo que contenga el L-aminoácido o su análogo a una concentración bajo la cual la bacteria de tipo salvaje, o la cepa parental de la bacteria, no puede desarrollarse, o la capacidad para la bacteria de crecer más deprisa en un medio que contenga L-aminoácido o un análogo de aminoácido, más deprisa que el tipo no modificado o el tipo salvaje, o la cepa parental de la bacteria. Como ejemplos de análogos L-aminoácidos están la p-fluoro-fenilalanina, 5-fluoro-DL-triptófano, S-(2-aminoetil) cisteína, 4-aza-DL-leucina o similares. La concentración mencionada anteriormente de L-aminoácidos o del análogo de L-aminoácido está comprendida generalmente entre 1.000 y 10.000 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente entre 3000 y 5000 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de la L-homoserina, preferentemente entre 5.000 y 7.000 $\mu\text{g/ml}$ en el caso de la serina y cisteína, generalmente entre 0,1 y 1,0 $\mu\text{g/ml}$, preferentemente entre 0,2 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ en el caso del 5-fluoro-DL-triptófano, generalmente entre 0,1 y 2,0 mg/ml , preferentemente entre 0,5 y 1,0 mg/ml en el caso de la p-fluoro-fenilalanina; generalmente entre 0,1 y 2,0 mg/ml , preferentemente entre 0,5 y 1,0 mg/ml en el caso de la 4-aza-DL-leucina y S-(2-aminoetil) cisteína.

En la bacteria utilizada en el procedimiento de la presente invención, la actividad de las proteínas de la presente invención es potenciada por la transformación de dicha bacteria con ADN que codifica la proteína, tal como se define en (A) o (B), o alterando la secuencia de regulación de la expresión de dicho ADN en cromosoma de la bacteria.

El ADN, que se utiliza para la modificación de la bacteria puede codificar una proteína que presenta actividad excretora del L-aminoácido. Más concretamente, el ADN está representado por el gen *yedA*. El gen *yedA* puede obtenerse, por ejemplo, mediante PCR, utilizando cebadores basados en la secuencia nucleótida que se muestra en SEC.ID n°:1.

El ADN incluye un ADN que codifica la proteína que incluye delección, sustitución, inserción o adición de uno a cinco aminoácidos en una o más posiciones sobre la proteína (A), siempre que no se pierda la actividad de la proteína. El ADN que codifica sustancialmente la misma proteína que la proteína definida en (A) puede obtenerse, por ejemplo,

mediante modificación de la secuencia nucleótida que codifica la proteína definida en (A), utilizando mutagénesis dirigida, de forma que uno o más residuos de aminoácidos sea suprimido, sustituido, insertado o añadido. Dicho ADN modificado puede obtenerse mediante procedimientos convencionales, utilizando tratamiento con reactivos y condiciones que generen mutaciones. Dicho tratamiento incluye el tratamiento del ADN que codifica las proteínas que se utilizan en el procedimiento de la presente invención, con hidroxilamina o el tratamiento de la bacteria que alberga el ADN con irradiación UV o un reactivo tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina o ácido nítrico.

El ADN incluye variantes que pueden encontrarse en las distintas cepas y variantes de las bacterias que pertenecen al género *Escherichia* según la diversidad natural. El ADN que codifica dichas variantes puede obtenerse aislando el ADN, que se hibridiza con el gen *yedA* o parte del gen, bajo condiciones rigurosas, y que codifica la proteína que potencia la producción del L-aminoácido. El término "condiciones rigurosas" al que se hace referencia en la presente memoria, se refiere a una condición bajo la que el denominado híbrido específico, se forma, y el híbrido no específico, no se forma. Por ejemplo, las condiciones rigurosas incluyen una condición bajo la que los ADN que presentan una alta homología, por ejemplo, ADN que tienen una homología no menor que el 70% entre ellos, se hibridizan. Alternativamente, las condiciones rigurosas se ejemplifican por condiciones que comprenden la condición habitual de lavado en hibridización Southern, por ejemplo, 60°C, 1 x SSC, SDS al 0,1%, preferentemente 0,1 x SSC, SDS al 0,1%. Como sonda para el ADN que codifica variantes y se hibridiza con el gen y *yedA*, puede utilizarse asimismo una secuencia parcial de la secuencia nucleótida de SEC.ID n°: 1. Dicha sonda puede prepararse mediante PCR utilizando oligonucleótidos producidos basados en 1 la secuencia nucleótida de SEC ID n°: 1 como cebadores, y un fragmento de ADN que contenga la secuencia nucleótida de SEC ID:n°: 1 como una matriz. Cuando un fragmento de ADN de una longitud de 300 pares de bases aproximadamente se utiliza como la sonda, las condiciones de lavado para la hibridación consisten en, por ejemplo, 50°C, 2 x SSC, y SDS al 0,1%.

La transformación de la bacteria con un ADN que codifica una proteína, significa la introducción del ADN en la célula bacteriana, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales para aumentar la expresión del gen que codifica la proteína de la presente invención, y potenciar la actividad de la proteína en la célula bacteriana.

Los procedimientos para la potenciación de la expresión del gen incluyen un aumento del número de copias del gen. La introducción del gen en un vector que puede funcionar en una bacteria que pertenece al género *Escherichia*, aumenta el número de copias del gen. Con dicho propósito, pueden utilizarse preferentemente vectores multi-copia. El vector multi-copia se ejemplifica por pBR322, pUC19, pBluescript KS⁺, pACYC177, pACYC184, pAYC32, pMW119, pET22b o similares.

Además, la potenciación de la expresión del gen puede obtenerse introduciendo copias múltiples del gen en el cromosoma bacteriano mediante por ejemplo, el procedimiento de recombinación homóloga, o similares.

En el caso de que la expresión de dos o más genes sea potenciada, los genes pueden ser alojados juntos en el mismo plásmido o por separado en plásmidos distintos. Asimismo, puede aceptarse que uno de los genes se aloje en un cromosoma, y el otro gen se aloje en un plásmido.

Por otra parte, la potenciación de la expresión del gen puede alcanzarse situando el ADN bajo control de un potente promotor en vez del promotor original. La fuerza del promotor se define por la frecuencia de actos de la iniciación de la síntesis del ARN. Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R., Bujard, H. (Promoters in *Escherichia coli*: a hierarchy of *in vivo* strength indicates alternate structures. EMBO J. 1986, 5, 2987-2994). Por ejemplo, el promotor P_L del fago lambda es conocido como un promotor constitutivo potente. Otros promotores potentes conocidos son el promotor *lac*, promotor *trp*, *promotor trc* y similares. La utilización del promotor potente puede combinarse con la multiplicación de las copias génicas.

Los procedimientos para la preparación del ADN cromosómico, hibridización, PCR, preparación del ADN plasmídico, digestión y unión del ADN, transformación, selección de un oligonucleótido como cebador y similares, puede ser ordinariamente procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Estos procedimientos se describen en Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) y similares.

La bacteria que se utiliza en el procedimiento de la presente invención puede obtenerse introduciendo los ADN mencionados anteriormente en una bacteria que pertenece al género *Escherichia coli* que tiene la capacidad, inherentemente, de producir L-aminoácidos. Alternativamente, la bacteria puede obtenerse confiriendo capacidad para producir L-aminoácidos a la bacteria que pertenece al género *Escherichia coli* que ya alberga los ADN.

Una bacteria que pertenece al género *Escherichia* no está particularmente limitada, siempre que tenga una capacidad para producir el L-aminoácido o pueda conferir la capacidad, Los ejemplos de la bacteria que pertenece al género *Escherichia* incluye *Escherichia coli*.

Ejemplos de bacterias que producen aminoácidos, que pertenecen al género *Escherichia* se describen a continuación.

ES 2 269 788 T3

Bacterias que producen fenilalanina

Como una cepa parental que va a ser potenciada en la actividad de la proteína de la presente invención, pueden utilizarse las cepas de bacterias productoras de fenilalanina que pertenecen al género *Escherichia* tales como la cepa 5 AJ12739 (*tyra::Tn10, tyrR*) (VKPM B-8197); cepa HW1089 (N° de registro de ATCC 55371) que aloja el gen *pheA34* (US n° 5.354.672); cepa mutante MWEC101-b (KR8903681): cepas NRRL B-12141, NRRL B- 12145, NRR B-12146 y NRRL B-12147 (US n° 4.407.952) y análogas. Asimismo, como una cepa parental que va a ser potenciada en la actividad de la proteína de la presente invención, pueden utilizarse la bacteria productora de fenilalanina que pertenece al género *Escherichia*, la cepa K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAB (FERM BP-3566) de *E. coli*, la cepa K-12 10 [W3110 (*tyrA*)/pPHAD (FERM BP-12659) de *E. coli*, la cepa K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHATerm (FERM BP-12662), de *E. coli*, y la cepa K-12 [W3110 (*tyrA*)/pBR-aroG4,pACMAB], denominada como AH12604 (FERM BP-3579) (patente europea EP488424B1).

Bacterias productoras de treonina

15 Como una cepa parental que va a ser potenciada en la actividad de la proteína de la presente invención, pueden utilizarse las cepas de bacterias productoras de treonina que pertenecen al género *Escherichia* tales como la cepa MG442 (VKPM B-1628) (Gusyatiner, *et al.*, Genetika (en ruso), 14, 947-956, 1978, US n° 4.278.765); VKPM B-3996 (US n° 6.165.756); VKPM B-5318 (US n° 6.132.999); BP-3756 y BP-4072 (US n° 5.414.918); FERM BP-3519 20 y FERM BP-3520 (US n° 5.376.538) y similares.

El procedimiento de la presente invención incluye el procedimiento para la producción de L-fenilalanina, que comprende las etapas de cultivar la bacteria de la presente invención en un medio de cultivo, para dejar que la L-fenilalanina pueda producirse y acumularse en el medio de cultivo, y recuperar la L-fenilalanina a partir del medio 25 de cultivo. Asimismo, el procedimiento de la presente invención incluye el procedimiento para la producción de L-treonina, que comprende las etapas de cultivar la bacteria de la presente invención en un medio de cultivo, para dejar que la L-treonina pueda producirse y acumularse en el medio de cultivo, y recuperar la L-treonina partir del medio de cultivo.

30 En la presente invención, el cultivo, recuperación y purificación del L-aminoácido a partir del medio y similares, puede llevarse a cabo de una forma similar al procedimiento convencional de fermentación, en el que un amino es producido utilizando un microorganismo. Un medio que se utilice para el cultivo puede ser un medio sintético o un medio natural, siempre que el medio incluya una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno y minerales y, si es necesario, cantidades apropiadas de nutrientes que el microorganismo necesita para crecer. La 35 fuente de carbono puede incluir varios hidratos de carbono tales como glucosa y sacarosa, y varios ácidos orgánicos. Dependiendo del modo de asimilación del microorganismo que se utilice, puede emplearse alcohol, incluyendo etanol y glicerol. Como fuente de nitrógeno, se utilizan varias sales amónicas tales como el sulfato amónico y el amoníaco, otros compuestos de nitrógeno tales como aminas, una fuente natural de nitrógeno como la peptona, hidrolizado de soja y microorganismos fermentativos digeridos. Como minerales se utilizan monofosfato de potasio, sulfato de magnesio, cloruro sódico, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, cloruro cálcico, y similares. Puede añadirse algún nutriente adicional al medio, si es necesario. Por ejemplo, si el microorganismo requiere 40 tirosina para el desarrollo (auxotrofia de tirosina), puede añadirse la cantidad suficiente de tirosina al medio para cultivo.

45 El cultivo se lleva a cabo preferentemente bajo condiciones aeróbicas tales como un cultivo con agitación, agitando (dicho) cultivo con aireación, a una temperatura entre 20 y 40°C, preferentemente de entre 30 y 38°C. El pH del cultivo está habitualmente entre 5 y 9, preferentemente entre 6,5 y 7,2. El pH del cultivo puede ajustarse con amoníaco, carbonato cálcico, varios ácidos, varias bases, y tampones. Habitualmente, un cultivo de 1 a 5 días conduce a la 50 acumulación del L-aminoácido diana en el medio líquido.

Después del cultivo, los sólidos tales como células pueden eliminarse del medio líquido mediante centrifugación o filtración por membrana, y entonces, el L-aminoácido diana puede recuperarse y purificarse mediante un procedimiento convencional tal como el intercambio iónico, o los procedimientos de concentración y cristalización. 55

La fenilalanina producida mediante el procedimiento de la presente invención puede utilizarse para, por ejemplo, producir el éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina (al que se alude asimismo como "aspartano") Es decir, el procedimiento de la presente invención incluye el procedimiento para la producción del éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina, utilizando la L-fenilalanina como material en bruto. El procedimiento comprende sintetizar el éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina a partir de la L-fenilalanina producida 60 por el procedimiento de la presente invención tal como se ha descrito anteriormente, y el ácido aspártico o su derivado. Pueden hacerse referencia al éster alquílico inferior, al éster metílico, al éster etílico y al éster propílico, o similares.

65 En el procedimiento de la presente invención, un procedimiento para sintetizar el éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina a partir de la L-fenilalanina y del ácido aspártico o su derivado, no está particularmente limitado y puede aplicarse cualquier procedimiento convencional, con tal de que la L-fenilalanina o su derivado pueda utilizarse para la síntesis del éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina. Concretamente, por ejem-

plo, el éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina puede producirse mediante el procedimiento siguiente (patente US nº 3.786.039). La L-fenilalanina es esterificada para obtener el éster alquílico inferior de la L-fenilalanina. El éster alquílico de la L-fenilalanina se hace reaccionar con el derivado del ácido L-aspartico del cual el grupo amino y el grupo β -carboxilo están protegidos, esterificándose el grupo α -carboxilo para activar. El derivado incluye el anhídrido N-acil-L-aspartico tal como el anhídrido N-formil-, N-carbobenzoxi-, o N-p-metoxicarbobenzoxi-L-aspartico. Mediante la reacción de condensación, se obtiene la mezcla de N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina y N-acil- β -L-aspartil-L-fenilalanina. Si la reacción de condensación se lleva a cabo bajo la existencia de un ácido orgánico cuya constante de disociación ácida a 37°C es de 10^{-4} o menos, la proporción de la forma α a la β en la mezcla aumenta (publicación abierta al público de la patente japonesa nº 51-113841). Entonces, la N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina es separada de la mezcla, seguido por la hidrogenación para obtener la α -L-aspartil-L-fenilalanina.

Modo de poner en práctica la invención

La presente invención se explicará con mayor detalle a continuación haciendo referencia a los Ejemplos.

Ejemplo 1

Clonación del gen *yedA* de *E.coli*

La secuencia nucleótida completa de la cepa K-12 de *E. coli* se ha determinado ya (Science, 277, 1453-1474, 1977). Una búsqueda PSI-BLAST reveló que por lo menos 10 *rhtA* parálogos que incluían el gen *yedA*, se encuentran en el genoma de *E. coli* K-12. El gen *yedA* codifica la subunidad transmembranosa putativa, cuya FU función es desconocida.

Basándose en la secuencia nucleótida de la que se ha informado, se sintetizaron los cebadores que se muestran en SEC ID nº 3 (cebador 1) y nº4 (cebador 2). El cebador 1 es una secuencia complementaria a una secuencia de 179 a 153 nucleótidos por encima del codón de iniciación con un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Bam*HI introducido en su extremo 5'. El cebador 2 es una secuencia complementaria a una secuencia de 53 a 77 nucleótidos por debajo del codón de finalización con un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Sal*II introducido en su extremo 5'.

El ADN cromosómico de la cepa TG1 de *E. coli* se preparó mediante un procedimiento ordinario. Se llevó a cabo la PCR en un "Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400", bajo las condiciones siguientes: 40 seg a 95°C, 40 seg a 47°C, 40 seg a 72°C, 30 ciclos mediante la Taq polimerasa (Fermentas). El fragmento PCR obtenido que contenía el gen *yedA* con su propio promotor se trató con las restrictasas *Bam*HI y *Sal*II y se insertó en los vectores multicopia pUC19 o pAYCTER3 tratados previamente con las mismas enzimas. De este modo, se obtuvieron, respectivamente, los plásmidos pYEDA1 y pYEDA2. El vector pAYCTER3 es un derivado de pAYC32, un vector muy estable y con un número moderado de copias construido sobre la base de plásmido RSF1010 (Christoserdov A. YY., Tsygankov Y. D, Broad-host range vectors derived from a RSF1010 Tnl plasmid, Plasmid, 1986, v. 16, págs 161-167). El vector pAYCTER3 se obtuvo mediante introducción del poliengarce del plásmido pUC19 y del finalizador potente *rrnB* en el plásmido pAYC32 en vez de su promotor, de la forma siguiente. En primer lugar, el poliengarce del plásmido pUC19 se obtuvo mediante PCR, utilizando los cebadores que se muestran en SEC ID nº 5 y nº 6. El producto PCR obtenido se trató con las restrictasas *Eco*RI y *Bcl*II. El terminador *rruB* se obtuvo asimismo por PCR utilizando los cebadores representados en SEC ID nº 7 y nº 8. El producto PCR obtenido se trató con las restrictasas *Bgl*II y *Bcl*II. Entonces, estos dos fragmentos de ADN se unieron en el plásmido pAYC32 tratado previamente con las restrictasas *Eco*RI y *Bcl*II. De este modo se obtuvo el plásmido pAYCTER3.

Ejemplo 2

El efecto de la amplificación del gen *yedA* sobre la resistencia de la cepa TG1 de *E. coli* para los aminoácidos y los análogos de aminoácidos

Los plásmidos pYEDA1 y pYEDA2 y los vectores pUC19 y pAYCTER3 se introdujeron en la cepa TG1 de *E. coli*. Así, se obtuvieron las cepas TG1 (pYEDA1), TG1 (pYEDA2), TG1 (pUC19) y TG1 (pAYCTER3).

Entonces, la capacidad de estas cepas para crecer en presencia de aminoácidos y de análogos de aminoácidos para cada cepa, se determinó en placas mínimas M9 de agar glucosa que contenían concentraciones graduadas del inhibidor. Las placas se rociaron con 10^6 a 10^7 células de un cultivo nocturno desarrollado en un medio mínimo (suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina para las cepas plasmídicas). El crecimiento se estimó después de 44 horas de incubación a 37°C. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

ES 2 269 788 T3

TABLA 1

Substrato	Concentración ión, mg/ml	Crecimiento después de 44 h		
		TG1 (pUC19) *	TG1 (pYEDA1)	TG1 (pYEDA2)
-	-	+	+	+
L-fenilalanina	20,0	-	+	-
L-homoserina	3,0	-	+	n.d.
L-treonina	50,0	-	+	n.d.
L-cisteína	7,5	-	+	n.d.
L-histidina	20,0	-	+	n.d.
p-fluoro-DL-fenilalanina	1,0	-	+	+
p-fluoro-DL-fenilalanina	2,0	-	+	-
5-fluoro-DL-triptófano	0,0005	-	+	n.d.
S(2-aminoetil)-L-cisteína	0,4	-	+	+
4-aza-DL-leucina	1,0	-	+	n.d.

* Los mismos resultados se obtuvieron para la cepa TG1 que aloja el vector pAYCTER3.

+: crecimiento bueno; -: no hay crecimiento; n.d.: no determinado

Ejemplo 3

Efecto de la amplificación del gen yedA sobre la producción de fenilalanina

La cepa AJ12739 de *E. coli* que produce fenilalanina se utilizó como una cepa parental para la transformación con plásmidos que albergaban el gen *yedA*. La cepa AJ12739 se ha depositado en el Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Rusia, 113545 Moscow, 1st Dorozhny proezd, 1) en el 6 de noviembre, 2001, con el número de registro VKPM B-8197.

La cepa AJ12739 productora de fenilalanina se transformó con el plásmido pYEDA2 o con el vector pAYCTER3, para obtener las cepas AJ12739/pYEDA2 y AJ12739/pAYCTER3. Estas cepas se cultivaron cada una a 37°C durante 18 horas en un caldo (de cultivo) nutritivo con 100 mg/l de ampicilina, y 0,3 ml del cultivo obtenido se inocularon en 3 ml de un medio de fermentación que contenía 100 mg/ml de ampicilina, en un tubo de ensayo de 20 x 200 mm, cultivándose a 37° durante 48 horas con un agitador rotatorio. Después del cultivo, se determinó mediante TLC una cantidad acumulada de fenilalanina en el medio. Se utilizaron placas TLC de 10 x 15 cm revestidas con capas de 0,11 mm de gel síliceo Sorbfil sin indicador fluorescente (Stock Company Sorbpolymer, Krasnodar, Rusia). Las placas Sorbfil se desarrollaron con una fase móvil: propan-2-ol: etilacetato: 25% de amoníaco acuoso: agua=40:40:7:16 (vol/vol). Una solución (2%) de ninhidrina en acetona se utilizó como un reactivo de visualización. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Glucosa	40,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	16,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,0
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0,01
Tiamina-HCl	0,0002
Extracto de levadura	2,0
Tirosina	0,1
CaCO ₃	30,0

El sulfato de magnesio y la glucosa se esterilizan por separado. El CaCO₃ caliente y seco se esterilizan a 180° durante 2 horas. El pH se ajusta a 7,0. El antibiótico se introduce en el medio después de esterilización.

ES 2 269 788 T3

TABLA 2

Cepa de <i>E. coli</i>	OD ₆₀₀	Fenilalanina, g/l
AJ12739 (pAYCTER3)	7,0	1,5
AJ12739 (pAYCTER-YEDA2)	7,5	1,8

A partir de la tabla 2 puede apreciarse que la amplificación del gen *yedA* mejoró la productividad de la fenilalanina de la cepa AJ12739.

Ejemplo 4

Efecto de la amplificación del gen yedA sobre la producción de treonina

La conocida cepa de *E. coli* que produce treonina, VNIIGnetika MG442 (Gusyatiner, *et al.*, 1978, Genetika (en ruso), 14, pág 947-956) (depositada en el Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) según el Tratado de Budapest, con el n° de registro VKPM B-1628), se transformó con el plásmido pYEDA1 o con el vector pUC19, dando lugar a las cepas MG442/pYEDA1 y G442/pUC19.

Estas cepas se cultivaron cada una a 37°C durante 18 horas en un caldo (de cultivo) nutritivo con 100 mg/l de ampicilina, y 0,3 ml del cultivo obtenido se inocularon en 3 ml de un medio de fermentación que contenía 100 mg/ml de ampicilina, en un tubo de ensayo de 20 x 200 mm, cultivándose a 37° durante 48 horas con un agitador rotatorio. Después del cultivo, se determinó mediante TLC una cantidad acumulada de treonina en el medio. Las placas Sorbfil se desarrollaron en una fase móvil: propan-2-ol: acetona:agua:amoníaco acuoso al 25%=25:25:7:6 (vol/vol). Se utilizó una solución (2%) de ninhidrina en acetona como un reactivo de visualización. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

La composición del medio de fermentación (g/l):

Glucosa	50,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,4
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,02
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0,02
Tiamina-HCl	0,0002
Extracto de levadura	1,0
CaCO ₃	20,0

El sulfato de magnesio y la glucosa se esterilizan por separado. El CaCO₃ caliente y seco se esterilizan a 180° durante 2 horas. El pH se ajusta a 7,0. El antibiótico se introduce en el medio después de esterilización.

TABLA 3

Cepa de <i>E. coli</i>	Treonina, g/l	Rendimiento (%)
MG441 (pUC19)	2,9	5,8
MG442 (pYEDA1)	4,0	8,0

A partir de la tabla 2 puede apreciarse que la amplificación del gen *yedA* mejoró la productividad de la treonina de la cepa MG442.

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de L-aminoácidos utilizando una bacteria que pertenece al género *Escherichia* que presenta un aumento en la productividad de los aminoácidos, por ejemplo, L-fenilalanina y L-treonina.

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la producción de un L-aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por L-treonina y L-fenilalanina, que comprende cultivar una bacteria que pertenece al género *Escherichia* en un medio de cultivo y recuperar del medio de cultivo el L-aminoácido que va a producirse y acumularse en el medio, en el que dicha bacteria se potencia potenciando la actividad de una proteína tal como se define en (A) o (B) siguientes en una célula de dicha bacteria:

10 (A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 2 en el listado de secuencias;

15 (B) una proteína que comprende una secuencia aminoácida que incluye delección, sustitución, inserción o adición de uno a cinco aminoácidos en la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 2 en el listado de Secuencias, y que presenta una actividad de conferir, a una bacteria que pertenece al género *Escherichia*, resistencia a un L-aminoácido, seleccionado de entre el grupo constituido por L-fenilalanina, L-treonina, L-homoserina y L-cisteína y/o un análogo de aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por p-fluoro-fenilalanina, 5-fluoro-DL-triptófano, S-(2-aminoetil)cisteína y 4-aza-DL-leucina,

20 en el que dicha actividad de la proteína tal como se define en (A) o (B) se potencia transformando dicha bacteria con un ADN que codifica la proteína tal como se define en (A) o (B), utilizando un vector multicopia que contiene dicho ADN, o alterando la secuencia de regulación de la expresión de dicho ADN en el cromosoma de dicha bacteria.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el L-aminoácido que va a producirse es la L-fenilalanina.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el L-aminoácido que va a producirse es la L-treonina.

4. Procedimiento para la producción de un éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina, que comprende cultivar una bacteria en un medio de cultivo para producir y acumular L-fenilalanina en el medio, presentando dicha bacteria productividad de la L-fenilalanina, y

30 sintetizar el éster alquílico inferior de la α -L-aspartil-L-fenilalanina a partir del ácido aspártico o su derivado y la L-fenilalanina obtenida,

35 en el que dicha bacteria es potenciada potenciando la actividad de una proteína, tal como se define en (A) o (B) siguientes en una célula de dicha bacteria:

40 (A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 2 en el listado de secuencias;

45 (B) una proteína que comprende una secuencia aminoácida que incluye delección, sustitución, inserción o adición de uno a cinco aminoácidos en la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 2 en el listado de Secuencias, y que presenta una actividad de conferir, a una bacteria que pertenece al género *Escherichia*, resistencia a un L-aminoácido, seleccionado de entre el grupo constituido por L-fenilalanina, L-treonina, L-homoserina y L-cisteína y/o un análogo de aminoácido seleccionado de entre el grupo constituido por p-fluoro-fenilalanina, 5-fluoro-DL-triptófano, S-(2-aminoetil)cisteína y 4-aza-DL-leucina,

50 en la que dicha actividad de la proteína tal como se define en (A) o (B) se potencia transformando dicha bacteria con un ADN que codifica la proteína tal como se define en (A) o (B), utilizando un vector multicopia que contiene dicho ADN, o alterando la secuencia de regulación de la expresión de dicho ADN en el cromosoma de dicha bacteria.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, que comprende además esterificar la L-fenilalanina para generar un éster alquílico inferior de la L-fenilalanina,

55 condensar el éster alquílico inferior de la L-fenilalanina con el derivado del ácido aspártico, en el que el derivado es el anhídrido N-acil-L-aspártico,

separar el éster alquílico inferior de la N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina de la mezcla reactiva, e

60 hidrogenar el éster alquílico inferior de la N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina para generar el éster alquílico inferior de la α -aspartil-L-fenilalanina.

65

ES 2 269 788 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.

5 <120> Procedimiento para la producción de L-aminoácidos utilizando *Escherichia*.

<130> EPA-63468

10 <140>

<141> 2002-11-21

<150> RU 2001131570

15 <151> 2001-11-23

<160> 8

20 <170> PatentIn Ver. 2.1.

<210> 1

<211> 921

25 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<400> 1

30

```
atgcgtttcc gccagttggt accgcttttt ggcgcgctgt ttgcgttgta tatcatttgg 60
ggctcaaoct attttgcac tcggattggc gtggaaagct ggcctccgtt aatgatggcg 120
ggcgttcgat tcctggcagc cggatattta ttgctggcat ttttgctact gcgcggacac 180
aaactcccc cgctacgtcc gctgctcaat gccgcgctga ttggcctggt attgctggct 240
gtcggtaatg gcatggtgac ggttgccgaa catcaaaatg ttccttccgg catcgcgcc 300
gtagtggttg caaccgtgcc cctctttacc ctgtgcttca gccgcctggt tggcattaaa 360
acgcgcaaac tggaatgggt gggatttggc attgggcttg ccggaatcat catgctcaat 420
agcggtgaa atttaagcgg caatccgtgg ggcgcgattc tgattttaat cggctcgatt 480
agctgggctg ttggctcagt ttatggctcg cgcattacct tacctgtagg gatgatggcg 540
ggtgcgattg agatgctggc ggcaggcgtg gtgtaaatga tcgcgctgat gattgcgggt 600
gaaaaactga cggcgotccc ttccctttca ggcttccttg cggtcggcta tctggcgtg 660
tttggttcga ttatcgccat caacgcttat atgtatttaa tccgtaatgt cagtcggct 720
ctcgccacca gctacgctta cgtaaccgg gtggtcgcgg tcttgctggg tacgggactg 780
ggtggagaaa cactgtcgaa gattgaatgg ctggcgcctg gcgtaattgt cttcgcgggt 840
gtactggtca cgttgggaaa atatctcttc ccggcaaac ccgtagttgc gccagttatt 900
caggacgcat caagcgagta a 921
```

50

<210> 2

55 <211> 306

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

60

65

ES 2 269 788 T3

<400> 2

5 Met Arg Phe Arg Gln Leu Leu Pro Leu Phe Gly Ala Leu Phe Ala Leu
1 1 5 10 15
Tyr Ile Ile Trp Gly Ser Thr Tyr Phe Val Ile Arg Ile Gly Val Glu
20 25 30
10 Ser Trp Pro Pro Leu Met Met Ala Gly Val Arg Phe Leu Ala Ala Gly
35 40 45
Ile Leu Leu Leu Ala Phe Leu Leu Leu Arg Gly His Lys Leu Pro Pro
50 55 60
15 Leu Arg Pro Leu Leu Asn Ala Ala Leu Ile Gly Leu Leu Leu Leu Ala
65 70 75 80
20 Val Gly Asn Gly Met Val Thr Val Ala Glu His Gln Asn Val Pro Ser
85 90 95
Gly Ile Ala Ala Val Val Val Ala Thr Val Pro Leu Phe Thr Leu Cys
100 105 110
25 Phe Ser Arg Leu Phe Gly Ile Lys Thr Arg Lys Leu Glu Trp Val Gly
115 120 125
Ile Ala Ile Gly Leu Ala Gly Ile Ile Met Leu Asn Ser Gly Gly Asn
130 135 140
30 Leu Ser Gly Asn Pro Trp Gly Ala Ile Leu Ile Leu Ile Gly Ser Ile
145 150 155 160
Ser Trp Ala Phe Gly Ser Val Tyr Gly Ser Arg Ile Thr Leu Pro Val
165 170 175
35 Gly Met Met Ala Gly Ala Ile Glu Met Leu Ala Ala Gly Val Val Leu
180 185 190
40 Met Ile Ala Ser Met Ile Ala Gly Glu Lys Leu Thr Ala Leu Pro Ser
195 200 205
Leu Ser Gly Phe Leu Ala Val Gly Tyr Leu Ala Leu Phe Gly Ser Ile
210 215 220
45 Ile Ala Ile Asn Ala Tyr Met Tyr Leu Ile Arg Asn Val Ser Pro Ala
225 230 235 240
Leu Ala Thr Ser Tyr Ala Tyr Val Asn Pro Val Val Ala Val Leu Leu
245 250 255
50 Gly Thr Gly Leu Gly Gly Glu Thr Leu Ser Lys Ile Glu Trp Leu Ala
260 265 270
Leu Gly Val Ile Val Phe Ala Val Val Leu Val Thr Leu Gly Lys Tyr
275 280 285
55 Leu Phe Pro Ala Lys Pro Val Val Ala Pro Val Ile Gln Asp Ala Ser
290 295 300
60 Ser Glu
305

<210> 3

65 <211> 25

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

ES 2 269 788 T3

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

5 <400> 3
aagggatccc tctcattttt attgt 25

10 <210> 4
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

20 <400> 4
aagcgtcgac cgagcgtctg gaa 23

25 <210> 5
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

35 <400> 5
gaccatagat ctgaattcga gctcgttac 29

40 <210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

50 <400> 6
acggccagat ctaagcttgc atgcctgca 29

55 <210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

65 <400> 7
aacagtgatc attgccttgg cggcagtagc gcgg 34

ES 2 269 788 T3

<210> 8

<211> 41

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

10

<400> 8

ataaaaagct tagatctcaa aaagagtttg tagaaacgca a

41

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65