



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 432**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01941065 .3**

96 Fecha de presentación : **15.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1302537**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2003**

54 Título: **Nueva glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.**

30 Prioridad: **21.06.2000 JP 2000-185789**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2010

73 Titular/es: **Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.**
1-6-1, Ohtemachi
Chiyoda-ku, Tokyo, 100-8185, JP

72 Inventor/es: **Yokoi, H.;**
Ando, S.;
Ochiai, K.;
Yonetani, Y. y
Hashimoto, S.

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Nueva glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una nueva glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (en adelante denominada "G6PD") obtenida a partir de una bacteria perteneciente al género *Corynebacterium*, un ADN que codifica dicha enzima, un ADN recombinante que comprende el ADN, un transformante que comprende el ADN recombinante, un transformante que comprende el ADN en su cromosoma y un procedimiento para producir un L-aminoácido que comprende el cultivo del transformante descrito en las reivindicaciones.

Antecedentes de la técnica

Para obtener una cepa bacteriana que produzca un aminoácido con eficacia, es importante conocer las propiedades de los genes relacionados con la biosíntesis del aminoácido en las bacterias y su forma de controlar la expresión y la actividad, y llevar a cabo un cultivo racional basándose en estas características.

Uno de los procedimientos más importantes para comprender las funciones de los genes relacionadas con la producción de aminoácidos es, por ejemplo, un procedimiento genético en el que se dilucida la relación entre el incremento o el decremento de la productividad de aminoácidos y la mutación génica.

El cultivo de microorganismos productores de aminoácidos se realiza principalmente confiriendo resistencia a fármacos tales como los análogos de aminoácidos y otros, pero en muchos casos, no está claro qué gen contribuye a incrementar la productividad a través de su mutación.

Se necesita NADPH como coenzima en la reacción de reducción de la biosíntesis de aminoácidos de muchos microorganismos. Por ejemplo, se necesitan 4 moléculas de NADPH para la biosíntesis de 1 molécula de L-lisina. De la misma manera, se necesitan 3 moléculas de NADPH para 1 molécula de treonina y 5 moléculas de NADPH para 1 molécula de isoleucina. Por lo tanto, se necesitan dos o más moléculas de NADPH para la biosíntesis de 1 molécula de la mayoría de aminoácidos. En consecuencia, el suministro de NADPH es una cuestión importante en la producción de estos aminoácidos utilizando microorganismos.

En muchos microorganismos, las enzimas que suministran NADPH son limitadas. Se considera que las enzimas que pueden suministrar NADPH en las vías principales del metabolismo de los azúcares de los microorganismos son principalmente la G6PD [EC 1.1.1.49] y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa [EC 1.1.1.4] en la vía de la pentosa fosfato (HMP), y la isocitrato deshidrogenasa [EC 1.1.1.41] en la vía del TCA.

Particularmente, la G6PD, que es la primera enzima de la HMP y también la enzima del punto de división de la vía de Embden-Meyerhof (EMP), es considerada una enzima muy importante para la producción de diversos aminoácidos por bacterias pertenecientes al género *Escherichia* y el género *Corynebacterium*, y se han llevado a cabo varios análisis sobre sus diversas propiedades bioquímicas. Por ejemplo, la G6PD de bacterias pertenecientes al género *Corynebacterium* se describe en el documento Journal of Bacteriology, 98, 1151 (1969), *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 101 (1987) y en la solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 224661/97, pero no se ha dado a conocer ninguna investigación sobre mejora de la productividad de aminoácidos mediante la enzima.

Asimismo, se ha determinado la secuencia de nucleótidos de la G6PD de bacterias tales como *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum* (Journal of Bacteriology, 173, 968 (1991) y solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 224661/97), pero no se ha dado a conocer ninguna investigación sobre mejora de la productividad de aminoácidos mediante el gen.

Exposición de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en producir L-aminoácidos a nivel industrial de manera ventajosa, utilizando la G6PD en relación con la biosíntesis de L-aminoácidos, un ADN que codifica la enzima, un ADN recombinante obtenido insertando el ADN en un vector o un transformante que comprende el ADN recombinante, para incrementar de ese modo aún más la productividad de L-aminoácidos de un microorganismo.

En el contexto de la presente invención se ha aislado con éxito un ADN que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n.º:2, y se ha determinado que puede utilizarse en la producción de L-aminoácidos. Asimismo, como resultado de estudios exhaustivos, se ha determinado que un polipéptido en el que el aminoácido Ala de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n.º:2 es sustituido por otro aminoácido y que presenta actividad G6PD puede aumentar todavía más la productividad del L-aminoácido. Por lo tanto, la presente invención ha cumplido con su objetivo. En particular, la presente invención se refiere a los elementos (1) a (21) siguientes y se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 341 432 T3

(1) Polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido Ala en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:2 es sustituido por la treonina, y presenta actividad G6PD.

(2) Polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:12.

(3) Polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos, en la que se elimina, se sustituye o se añade uno o varios aminoácidos distintos al resto de aminoácido situado en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos del polipéptido del tipo (1), que presenta actividad G6PD y una homología del 95% o más con la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:2.

(4) Polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:12.

(5) ADN que codifica los polipéptidos de cualquiera de los tipos (1) a (4).

(6) ADN que comprende una secuencia de nucleótidos, en la que una secuencia de nucleótidos entre las posiciones 637 y 639 que codifica el aminoácido Ala de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n°:1 es sustituida por un codón que codifica un aminoácido distinto a la Ala.

(7) ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n°:11.

(8) ADN recombinante que se puede obtener insertando el ADN de cualquiera de los tipos (5) a (7) en un vector.

(9) ADN recombinante del tipo (8), en el que el ADN recombinante es replicable en un microorganismo perteneciente al género *Escherichia* o al género *Corynebacterium*.

(10) Plásmido pCRBzwfM contenido en *Escherichia coli* TOP10 (FERM BP-7135).

(11) Transformante que se puede obtener introduciendo el ADN o el plásmido recombinante de cualquiera de los tipos (8) a (10) dentro de una célula huésped.

(12) Transformante del tipo (11), en el que la célula huésped es un microorganismo que es capaz de producir un L-aminoácido.

(13) Transformante del tipo (12), en el que la célula huésped es un microorganismo perteneciente al género *Escherichia* o el género *Corynebacterium*.

(14) Transformante perteneciente al género *Escherichia* o el género *Corynebacterium*, que comprende un cromosoma en el cual se integra artificialmente el ADN de cualquiera de los tipos (5) a (7).

(15) Transformante del tipo (13) o (14), en el que el microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.

(16) Procedimiento para producir un polipéptido, que comprende el cultivo del transformante de cualquiera de los tipos (11) a (15) en un medio para generar y acumular el polipéptido de cualquiera de los tipos (1) a (4) en un cultivo, y la recuperación del polipéptido a partir del cultivo.

(17) Procedimiento para producir un L-aminoácido, que comprende el cultivo del transformante de cualquiera de los tipos (12) a (15) en un medio para generar y acumular un L-aminoácido que se biosintetiza utilizando NADPH en el cultivo, y la recuperación del L-aminoácido a partir del cultivo.

(18) Procedimiento para producir un L-aminoácido del tipo (17), en el que el L-aminoácido que se biosintetiza utilizando NADPH se selecciona de entre L-lisina, L-treonina, L-isoleucina, L-triptófano, L-fenilalanina, L-tirosina, L-histidina y L-cisteína.

(19) Procedimiento para producir un L-aminoácido del tipo (17), en el que el L-aminoácido es L-lisina.

A continuación, se describirá con mayor detalle la presente invención.

El polipéptido de la presente invención es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido Ala situado en la posición 213 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:2 es sustituido por treonina, y presenta actividad G6PD y una homología del 95% o más con la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID n°:2. Entre los ejemplos del polipéptido cabe citar un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:12.

No obstante, el polipéptido no comprende la G6PD conocida (por ejemplo, un polipéptido en el que el aminoácido Thr situado en la posición 120 de la SEC ID n°:2 es sustituido por Ala).

La proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en la que se elimina, sustituye o añade uno o varios aminoácidos y presenta actividad G6PD puede obtenerse introduciendo una mutación dirigida a sitio específico en un ADN que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:12, utilizando la mutagénesis dirigida a sitio específico descrita en los documentos *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (denominado en lo sucesivo “*Molecular Cloning*, segunda edición”), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 - 1997) (denominado en lo sucesivo “*Current Protocols in Molecular Biology*”), *Nucleic Acids Research*, 10, 6487 (1982), *Proc. Natl. acad. Sci. USA.*, 79, 6409 (1982), *Gene*, 34, 315 (1985), *Nucleic Acids Research*, 13, 4431 (1985), *Proc. Natl. acad. Sci. USA.*, 82, 488 (1985), etcétera. Dicha proteína también puede obtenerse introduciendo una mutación dirigida a sitio específico, según el anterior procedimiento, en un ADN que codifica un polipéptido que originalmente presenta una secuencia en la que se elimina, sustituye o añade uno o varios aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:2, y que presenta actividad G6PD (por ejemplo, una G6PD obtenida a partir de un microorganismo parecido a *Corynebacterium glutamicum*), para sustituir de ese modo un aminoácido correspondiente al aminoácido de la posición 213 de la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:2 por treonina.

En la presente memoria, se describen polipéptidos en los que el número de aminoácidos que se van a eliminar, sustituir o añadir no está particularmente limitado, sino que es el número que puede eliminarse, sustituirse o añadirse mediante un procedimiento muy conocido, tal como la mutagénesis dirigida a sitio específico u otro similar, y es preferentemente un número comprendido entre 1 y 10 y más preferentemente entre 1 y 5.

Asimismo, para que el polipéptido de la presente invención presente actividad G6PD, resulta preferido que el polipéptido presente una homología del 95% o más con la secuencia de aminoácidos descrita en SEC ID n°:2, en la que el aminoácido treonina se halla en la posición 213, o en SEC ID n°:12, calculada mediante los programas BLAST [*J. Mol. Biol.*, 215, 403 (1990)], FASTA [*Methods in Enzymology*, 183, 63-98 (1990)] u otros.

Entre los ejemplos de ADN de la presente invención que codifican el polipéptido de la presente invención se incluye un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos, en la que la secuencia de nucleótidos de las posiciones 637 a 639 que codifica el aminoácido Ala de la secuencia representada por SEC ID n°:1 es sustituida por un codón que codifica la treonina (denominada en lo sucesivo “SEC ID n°:1 sub”), y un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n°:11, en la que el nucleótido en la posición 637 de la secuencia de nucleótidos SEC ID n°:1 es adenina.

En la presente memoria también se describe un ADN que comprende un ADN que se hibrida con un ADN que presenta la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n°:1 en condiciones estrictas, contiene una secuencia de nucleótidos en la que la secuencia de nucleótidos comprendida entre la posición 637 y la 639 que codifica el aminoácido Ala de la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n°:1 se sustituye por un codón que codifica un aminoácido distinto a la Ala, y codifica un polipéptido que presenta actividad G6PD. No obstante, el ADN no comprende un ADN conocido (por ejemplo, un ADN en el que la adenina en la posición 358 de SEC ID n°:1 se sustituye por guanina).

En la presente memoria, el ADN que se hibrida con el ADN de SEC ID n°:1 en condiciones estrictas corresponde a un ADN que se puede obtener mediante hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación Southern blot, etc., utilizando un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n°:1 u 11 como sonda, y entre los ejemplos de este cabe citar un ADN que puede identificarse realizando hibridación a 65°C en presencia de 0,7 a 1,0 mol/l de cloruro de sodio, mediante un filtro en el cual se inmoviliza un ADN obtenido de una colonia o placa, y a continuación lavando el filtro a 65°C mediante una solución SSC entre 0,1 y 2 veces concentrada (la composición de SSC 1 vez concentrada contiene 150 mmol/l de cloruro de sodio y 15 mmol/l de citrato de sodio). La hibridación puede realizarse según el procedimiento descrito en, por ejemplo, los documentos *Molecular Cloning*, segunda edición, *Current Protocols in Molecular Biology* o *DNA Cloning 1: Core Techniques, A practical Approach*, segunda edición, Oxford University (1995). Los ejemplos de ADN que se puede hibridar comprenden un ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que presenta por lo menos un 60% o más de identidad con la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n°:1 u 11, preferentemente un ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que presenta un 80% o más de identidad, y más preferentemente un ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que presenta un 95% o más de identidad según el programa BLAST, FASTA u otros similares.

El ADN de la presente invención puede obtenerse a partir de *Corynebacterium glutamicum* N.º 58 (FERM BP-7134) o a partir de un mutante que presenta una productividad de L-aminoácido incrementada, obtenido aplicando una operación de mutagénesis general a la cepa.

Entre los ejemplos de la operación de mutagénesis se incluyen el procedimiento convencional mediante N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG); (*Microbial Experimentation Manual*, 1986, p.131, Kodansha Scientific).

El ADN de la presente invención puede aislarse mediante el procedimiento siguiente.

Se prepara un ADN cromosómico a partir de una cepa que contiene el ADN, por ejemplo mediante el procedimiento de Saito *et al.* [*Biochimica et Biophysica Acta*, 72, 619 (1963)], y el ADN cromosómico se digiere con una enzima de restricción adecuada. El fragmento de ADN obtenido se liga a un vector (por ejemplo, un plásmido) que puede replicarse de manera autónoma en células bacterianas, y el ADN ligado se introduce en un microorganismo

que presenta actividad G6PD deficiente. Se aísla un transformante a partir del microorganismo obtenido utilizando la actividad G6PD como índice, y se aísla el gen para la enzima a partir del transformante.

Por ejemplo, una cepa de *Escherichia coli* que es deficiente sólo en glucosa-6-fostato isomerasa puede crecer en un medio que contiene glucosa como única fuente de carbono, pero una cepa que además es deficiente en G6PD no puede crecer en un medio que contiene glucosa como fuente única de carbono [*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, 192 (1996)]. Por lo tanto, el ADN de la presente invención puede aislarse a partir de la cepa, seleccionando una cepa que pueda crecer en un medio que contiene glucosa como única fuente de carbono entre las cepas obtenidas introduciendo el ADN en la cepa doblemente deficiente.

El microorganismo dentro del cual se introduce el ADN de la presente invención puede ser una bacteria perteneciente a cualquier género, siempre y cuando el ADN pueda expresarse. Asimismo, el vector replicable de manera autónoma puede ser cualquier vector, con tal que pueda replicarse autónomamente en la bacteria. Por ejemplo, cuando se utiliza un microorganismo perteneciente al género *Escherichia*, particularmente *Escherichia coli*, el vector replicable autónomamente comprende un pUC18 (fabricado por Takara Schuzo) y un pBluescript SK(-) (fabricado por TOYOBO). Asimismo, el vector puede ser un vector transportador que es autónomamente replicable tanto en *Escherichia coli* como en una bacteria del género *Corynebacterium*, tal como el pCE54 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 105999/83).

El vector puede ligarse al ADN de la presente invención mediante un procedimiento general en el que se utiliza una T4 ADN ligasa y similares. Por ejemplo, cuando se utiliza *Escherichia coli*, el vector puede introducirse en un huésped mediante el procedimiento de Hanahan *et al.* [Journal of Molecular Biology, 166, 557 (1983)] y similares.

Asimismo, el gen también puede aislarse a partir de una cepa que se obtiene sintetizando un ADN oligomérico basado en la información de la secuencia de nucleótidos del gen de la G6PD (por ejemplo, entrada n.º E13655 de GenBank o la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n.º:1 en el caso de *Corynebacterium glutamicum*), realizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el ADN oligomérico como cebador y el ADN cromosómico de un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* como molde, ligando el fragmento de ADN obtenido a un vector que presenta un gen marcador de selección y a continuación introduciéndolo en un huésped adecuado, tal como una bacteria del género *Escherichia* o el género *Corynebacterium*. En este caso, no es necesario utilizar una cepa deficiente en G6PD.

Además, el gen puede sintetizarse también mediante un sintetizador de ADN de uso general, tal como el ABI 3948 fabricado por Perkin-Elmer, basado en una secuencia de nucleótidos del gen; por ejemplo, la secuencia de nucleótidos representada por SEC ID n.º:1.

El ADN de la presente invención aislado mediante el procedimiento anterior se introduce en un vector de expresión que puede replicarse y expresarse en el microorganismo huésped, y el microorganismo huésped se transforma con el vector recombinante obtenido de esta manera.

El ADN recombinante que comprende el ADN que codifica el polipéptido de la presente invención es preferentemente un vector que puede replicarse de forma autónoma y que comprende un promotor, una secuencia de unión al ribosoma, el ADN de la presente invención y una secuencia de terminación de la transcripción. El ADN recombinante también puede contener un gen para regular el promotor.

Cuando se utiliza un microorganismo perteneciente al género *Escherichia*, los ejemplos de vector para este objetivo comprenden pBTrp2, pBTac1 y pTlac2 (comercializados todos por Boehringer Mannheim), pKK233-2 (fabricado por Pharmacia), pSE280 (fabricado por Invitrogen), pGEMEX-1 (fabricado por Promega), pQE-8 (fabricado por QIAGEN), pKYP10 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 110600/83), pKYP200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)], pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)], pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)], pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene), pTrs30 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM 09/pTrs30 (FERM BP-5407)], pTrs32 [preparado a partir de *Escherichia coli* JM 109/pTrs32 (FERM BP-5408)], pGHA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGHA2 (FERM B-400), solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 221091/85], pGKA2 [preparado a partir de *Escherichia coli* IGKA2 (FERM BP-6798), solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 221091/85], pTerm2 (US n.º 4.686.191, US n.º 4.939.094 y US n.º 5.160.735), pSupex, pUB110, pTP5, pC194, pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)], pGEX (fabricado por Pharmacia) y el sistema pET (fabricado por Novagen). Cuando se utiliza un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium*, los ejemplos comprenden pCG1 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 134500/82), pCG2 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 35197/83), pCG4 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 183799/82), pCG11 (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 134500/82), pCG116, pCE54 y pCB101 (todos de la solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 105999/83), pCE51, pCE52 y pCE53 [todas de Molecular and General Genetics, 196, 175 (1984)] y pCS299P descrito en los ejemplos de la presente solicitud.

Puede utilizarse cualquier promotor, siempre y cuando pueda funcionar en la célula huésped. Entre los ejemplos cabe citar los promotores obtenidos a partir de *Escherichia coli*, bacteriófagos, etc., tales como el promotor trp (P_{trp}), el promotor lac, el promotor P_L , el promotor P_R , el promotor T7, etc. Asimismo, se pueden utilizar promotores diseñados y modificados artificialmente, tales como un promotor en el que se enlazan dos P_{trp} conjuntamente ($P_{trp} \times 2$), el promotor tac, el promotor lacT7, el promotor letI, etc.

ES 2 341 432 T3

Resulta preferido utilizar un plásmido en el que el espacio entre la secuencia Shine-Dalgarno, que es la secuencia de unión al ribosoma, y el codón de iniciación se ajusta a una distancia adecuada (por ejemplo, de 6 a 18 bases).

En el ADN recombinante de la presente invención, la secuencia de terminación de la transcripción no siempre es necesaria para la expresión del ADN de la presente invención. No obstante, resulta preferido facilitar una secuencia de terminación de la transcripción justo a continuación del gen estructural.

Puede utilizarse cualquier célula huésped, siempre y cuando sea una célula capaz de producir el L-aminoácido descrito más adelante. Preferentemente, se utiliza un microorganismo capaz de producir el aminoácido. Preferentemente, dicho microorganismo es un microorganismo perteneciente al género *Escherichia* o el género *Corynebacterium*, más preferentemente un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium*, y todavía más preferentemente *Corynebacterium glutamicum*.

Entre los ejemplos de microorganismos cabe mencionar los microorganismos pertenecientes al género *Serratia*, el género *Corynebacterium*, el género *Arthrobacter*, el género *Microbacterium*, el género *Bacillus* y el género *Escherichia*. Los ejemplos específicos comprenden *Escherichia coli* XL1-Blue, *Escherichia coli* XL2-Blue, *Escherichia coli* DH1, *Escherichia coli* MC1000, *Escherichia coli* KY3276, *Escherichia coli* W1485, *Escherichia coli* JM109, *Escherichia coli* HB101, *Escherichia coli* n.º 49, *Escherichia coli* W3110, *Escherichia coli* NY49, *Escherichia coli* G1698, *Escherichia coli* TB1, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Escherichia coli* FERM BP-5985, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872, *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Brevibacterium roseum* ATCC 13825, *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13870, *Corynebacterium calluna* ATCC 15991, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354 y *Corynebacterium thermoaminogenes* AJJ 12340. Preferentemente, se utiliza una de las cepas del microorganismo siguiente o una cepa mutante productora de L-aminoácidos obtenida a partir de las cepas del microorganismo siguiente:

Corynebacterium glutamicum ATCC 13.032;

Corynebacterium glutamicum ATCC 13869 y

Corynebacterium glutamicum ATCC 13870.

Puede utilizarse cualquier procedimiento de introducción de ADN dentro de la célula huésped como procedimiento de introducción del vector recombinante. Por ejemplo, cuando se utiliza un microorganismo perteneciente al género *Escherichia*, entre los ejemplos de procedimientos se incluye el procedimiento que comprende la utilización de un ion de calcio [*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 69, 2110 (1972)] y el procedimiento de electroporación [*Methods in Enzymology*, 235, 375 (1994)]. Cuando se utiliza un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium*, entre los ejemplos de procedimientos se incluye el procedimiento del protoplasto (por ejemplo, solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 186492/82 y solicitud de patente japonesa publicada sin examinar n.º 18649/82), y el procedimiento de electroporación [por ejemplo, *Journal of Bacteriology*, 175, 4096 (1993)].

El microorganismo que pertenece al género *Escherichia* o el género *Corynebacterium* y comprende el ADN de la presente invención en el cromosoma puede ser cualquier microorganismo en el que el fragmento de ADN se integra artificialmente en el cromosoma mediante una recombinación genética o un tratamiento mutagénico. Por ejemplo, el microorganismo puede ser una cepa modificada mediante un tratamiento mutagénico a través del cual la cepa que contiene un gen de la G6PD de cualquier secuencia se convierte en una cepa que comprende el ADN de la presente invención, o una cepa en la que el fragmento de ADN se integra artificialmente en el cromosoma mediante el procedimiento de recombinación homóloga [*BioITechnology*, 9, 84 (1991); *Microbiology*, 144, 1863 (1998)], el procedimiento en el que se emplea un bacteriófago o transposón [*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, 2325-2339 (1996)], y similares. Preferentemente, se ejemplifica una cepa en la que el ADN se integra en el cromosoma mediante el procedimiento de recombinación homóloga.

En la presente invención, una cepa obtenida mediante un tratamiento mutagenético, así como una cepa obtenida mediante recombinación genética, se denomina transformante.

El polipéptido de la presente invención puede producirse cultivando el transformante de la presente invención obtenido de esta forma en un medio, para formar y acumular el polipéptido de la presente invención en el cultivo y posteriormente recuperarlo del cultivo.

Asimismo, el L-aminoácido puede producirse cultivando el transformante en un medio, para formar y acumular de ese modo el L-aminoácido en el cultivo y posteriormente recuperarlo del cultivo.

Es posible producir cualquier L-aminoácido, siempre y cuando se necesite NADPH para la biosíntesis de este. Entre los ejemplos se hallan: L-lisina, L-treonina, L-isoleucina, L-triptófano, L-fenilalanina, L-tirosina, L-histidina y L-cisteína. Asimismo, es posible producir un compuesto que no es un aminoácido y que emplea dichos aminoácidos

ES 2 341 432 T3

como intermediarios. Preferentemente, se ejemplifica la L-lisina. En la figura 1, se representan las vías biosintéticas de los aminoácidos. En el dibujo, las reacciones que consumen NADPH se indican con un subrayado.

5 El transformante de la presente invención puede cultivarse en un medio según el procedimiento habitual utilizado para cultivar un huésped.

Como medio de cultivo, puede utilizarse el medio nutritivo general que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, etc.

10 Se utiliza cualquier fuente de carbono que puede ser asimilada por el transformante o el microorganismo de la presente invención. Entre los ejemplos de fuentes de carbono cabe citar hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melazas que contienen a estas, almidón, almidón hidrolizado, etc.; ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, etc.; y alcoholes tales como etanol, propanol, etc.

15 Los ejemplos de fuentes de nitrógeno comprenden amoníaco; sales de amonio de ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos, tales como cloruro amónico, sulfato amónico, acetato amónico, fosfato amónico, etc.; otros compuestos que contienen nitrógeno; peptona; extracto de carne; extracto de levadura; agua de maceración de maíz; hidrolizado de caseína; harina de soja e hidrolizado de harina de soja; y diversas células obtenidas mediante fermentación y sus productos digeridos.

20 Los ejemplos de sales inorgánicas comprenden potasio dihidrógeno fosfato, di-potasio hidrógeno fosfato, fosfato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, sulfato de cobre y carbonato cálcico.

25 El cultivo se realiza en condiciones aeróbicas en cultivo agitado, cultivo sumergido con agitación centrífuga y ventilación o similares. La temperatura de cultivo está comprendida preferentemente entre 15 y 40°C, y el tiempo de cultivo está comprendido generalmente entre 16 horas y 7 días. El pH durante el cultivo se mantiene preferentemente entre 3.0 y 9.0. El pH puede ajustarse utilizando un ácido inorgánico u orgánico, una solución de álcali, urea, carbonato cálcico, amoníaco, etc.

30 Asimismo, pueden añadirse antibióticos tales como ampicilina, tetraciclina, etc. al medio durante el cultivo, si es necesario.

35 Cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante que lleva un promotor de tipo inducible, puede añadirse un inductor al medio, si es necesario. Por ejemplo, cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante que lleva el promotor *lac*, puede añadirse isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) o un compuesto similar al medio, o cuando se cultiva un microorganismo transformado con un vector recombinante que lleva el promotor *trp*, puede añadirse ácido indoleacético o un compuesto similar al medio.

40 Tras el cultivo, los precipitados tales como células y similares se eliminan del cultivo, y entonces se puede recuperar el aminoácido del cultivo, mediante un tratamiento combinado de intercambio iónico, concentración, extracción por adición de sal y similares.

45 El polipéptido producido mediante el transformante de la presente invención puede aislarse y purificarse utilizando el procedimiento habitual para aislar y purificar una enzima. Por ejemplo, cuando el polipéptido de la presente invención se expresa como un producto soluble en las células huésped, las células se recuperan mediante centrifugación tras el cultivo, se suspenden en un tampón acuoso y se fraccionan mediante un ultrasonificador, una prensa francesa, un homogeneizador Manton Gaulin, un molino Dynomill o un dispositivo similar para obtener una solución de extracto libre de células. A partir del sobrenadante obtenido centrifugando la solución de extracto libre de células, 50 puede obtenerse un producto purificado mediante el procedimiento habitual utilizado para aislar y purificar una enzima, por ejemplo, extracción por solvente; extracción por adición de una sal como el sulfato de amonio o similar; desalación, precipitación mediante un solvente orgánico; cromatografía de intercambio aniónico mediante una resina como la dietilaminoetil (DEAE)-sefarsa, la DIAION HPA-75 (fabricada por Mitsubishi Chemical) etc.; cromatografía de intercambio catiónico mediante una resina como la S-Sefarsa FF (fabricada por Pharmacia), etc.; cromatografía 55 hidrofóbica mediante una resina como la butil sefarsa, la fenil sefarsa, etc.; filtración en gel mediante un tamiz molecular; cromatografía de afinidad; cromatografía de enfoque; electroforesis, tal como enfoque isoeléctrico, etc.; y otras técnicas similares, por separado o en combinación.

60 Cuando el polipéptido se expresa como un cuerpo de inclusión intracelular, las células se recuperan de la misma manera, mediante fraccionamiento y centrifugación para recuperar el polipéptido en forma de fracción de precipitación. El cuerpo de inclusión del polipéptido recuperado se solubiliza con un agente desnaturizante de proteínas. La solución de polipéptido solubilizado se diluye o dializa para reducir la concentración del agente desnaturizante de proteínas en la solución, y restaurar de ese modo la estructura terciaria normal del polipéptido. Tras el procedimiento, puede obtenerse un producto purificado del polipéptido mediante un procedimiento de purificación/aislamiento similar 65 a los anteriores.

Cuando el polipéptido de la presente invención se secreta extracelularmente, el polipéptido puede recuperarse en el sobrenadante del cultivo. En particular, el sobrenadante del cultivo se obtiene aplicando al cultivo un tratamiento

similar a los anteriores, tal como la centrifugación u otro. A continuación, puede obtenerse un producto purificado a partir del sobrenadante, mediante un procedimiento de purificación/aislamiento similar a los anteriores.

Entre los ejemplos de polipéptidos obtenidos de esta manera se halla un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID n°:12.

Asimismo, el polipéptido de la presente invención puede producirse mediante un procedimiento de síntesis química, tal como el procedimiento del Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonil), tBoc (t-butiloxycarbonil) o procedimientos similares. Además, el polipéptido puede sintetizarse químicamente utilizando un sintetizador de péptidos fabricado por Advanced ChemTech, Perkin-Elmer, Pharmacia, Protein Technology Instrument, Synthecell-Vega, PerSeptive, Shimadzu Corporation o similares.

A continuación se proporcionan ejemplos no limitativos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa las vías biosintéticas de 20 aminoácidos que forman proteínas en una bacteria del género *Corynebacterium*. Las partes subrayadas representan reacciones que consumen NADPH. Las partes enmarcadas representan reacciones que producen NADPH.

La denominación de los genes que corresponden a enzimas relativas a las respectivas reacciones se realiza básicamente de conformidad con la nomenclatura de *Escherichia coli*. En el dibujo, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se representa como G6PD (zwf).

La figura 2 representa las etapas de construcción del vector pCS299P.

Modo de poner en práctica la invención

Ejemplo 1

Preparación de un gen G6PD nuevo

(1) Determinación de la secuencia de nucleótidos del gen de la G6PD

Corynebacterium glutamicum n.º 58 (en lo sucesivo, denominada “cepa n.º 58”) es una cepa productora de L-lisina obtenida aplicando una operación de mutagénesis a *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (en adelante, denominada “cepa ATCC 13032”).

La cepa se depositó el 14 de abril de 2000 en la institución International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chrome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (nombre antiguo: National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology: 1-3, Higashi 1-Chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón), con número de entrada FERM BP 7134. Los genes de la G6PD de la cepa ATCC 13032 y la cepa n.º 58 se clonaron de la forma indicada a continuación.

Se prepara un ADN cromosómico de cada cepa mediante el procedimiento de Saito *et al.* [Biochimica et Biophysica Acta, 72, 619 (1963)]. Asimismo, basándose en la secuencia de nucleótidos del gen de la G6PD conocida previamente en *Corynebacterium glutamicum* MJ233 (número de entrada GenBank E13655), se preparan cebadores de PCR para la secuencia de nucleótidos de destino mediante el procedimiento habitual. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores se representan en SEC ID n°: 3 y 4. La PCR se realiza en 25 ciclos, cada uno de los cuales consiste en una reacción a 94°C durante 1 minuto, una reacción a 60°C durante 1 minuto y una reacción a 74°C durante 2 minutos, utilizando un termociclador fabricado por Perkin-Elmer (GeneAmp PCR System 9600), ADN polimerasa Pfu turbo (fabricada por Stratagene), 100 ng de cada ADN cromosómico y el tampón añadido. Un producto de la PCR amplificado de alrededor de 2,2 kb se somete a electroforesis en gel de agarosa y se extrae y purifica mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por Qiagen).

El fragmento de ADN de 2,2 kb anterior que contiene el gen de la G6PD y un vector pCR-Blunt (fabricado por Invitrogen) se ligan mediante la T4 ADN ligasa (fabricada por Takara Shuzo), y el resultado de esta unión se utiliza para transformar células competentes de *Escherichia coli* Shot TOP10 (fabricadas por Invitrogen) según el procedimiento habitual. Cada uno de los transformantes seleccionados en un medio de agar LB [medio que contiene 5 g de extracto de levadura (fabricado por Difco), 10 g de Bacto-triptona (fabricada por Difco), 10 g de cloruro de sodio y 16 g de agar (fabricado por Difco) en 1 litro de agua y ajustado a un pH 7,2] que contiene 50 µg/ml de kanamicina se cultiva durante toda la noche en un medio LB que contiene 50 µg/ml de kanamicina, y se preparan plásmidos a partir de los respectivos medios de cultivo obtenidos mediante el procedimiento de lisis alcalina con SDS (*Molecular Cloning*, segunda edición).

Al plásmido que contiene el gen de la G6PD obtenido a partir de la cepa ATCC 13032, se le asigna la denominación pCRBzwf1, y al plásmido que contiene el gen de la G6PD obtenido a partir de la cepa n.º 58, se le asigna la denominación pCRBzwf2.

A continuación, se determinan las secuencias de nucleótidos del gen de la G6PD en los plásmidos mediante el procedimiento convencional. Se comprueba que las secuencias de nucleótidos de los genes de la G6PD obtenidas a partir de la cepa ATCC 13032 y n.º 58 son completamente idénticas. La secuencia de nucleótidos se representa en SEC ID n.º:1. Es decir, se demuestra que el gen de la G6PD de la cepa productora de L-lisina n.º 58 es un gen natural.

(2) Preparación de un nuevo gen de la G6PD

La cepa n.º 58 se somete a un tratamiento mutagénico con NTG (Microbial Experimentation Manual, 1986, p. 131, Kodansha Scientific) y a continuación se inocula en un medio de agar mínimo [un medio que contiene 10 g de glucosa, 4 g de cloruro de amonio, 2 g de urea, 1 g de potasio dihidrógeno fosfato, 3 g de di-potasio hidrógeno fosfato, 4 mg de sulfato ferroso heptahidratado, 40 µg de cloruro de zinc heptahidratado, 200 µg de cloruro férrico hexahidratado, 10 µg de cloruro de cobre dihidratado, 10 µg de cloruro de manganeso tetrahidratado, 10 µg de tetraborato de sodio decahidratado, 10 µg de molibdato de amonio tetrahidratado, 50 µg de biotina, 5 mg de ácido nicotínico y 16 g de agar (fabricado por Difco) en 1 litro de agua y ajustado a un pH 7,2] que contiene 1 mg/ml de 6-azauracilo y se cultiva a 30°C durante 2 días. Las colonias formadas de esta manera se aíslan y someten al test de producción de L-lisina descrito en el Ejemplo 2(4), y se seleccionan los clones que presentan una productividad superior a la cepa n.º 58. A una de estas cepas se la denomina "cepa M1". Se aísla el gen de la G6PD de la cepa M1 mediante el procedimiento indicado en el punto (1), y el gen se inserta en el vector pCR-Blunt. Al plásmido recombinante obtenido de esta forma, se le denomina pCRBzwfM. Cuando se determina su secuencia de nucleótidos, el nucleótido de la posición 637 de SEC ID n.º:1, que es guanina en los genes de la G6PD de la cepa ATCC 13032 y la cepa n.º 58, se ha cambiado por la adenina del gen G6PD de la cepa M1. La secuencia de nucleótidos se representa en SEC ID n.º:11.

Como consecuencia de la mutación, el aminoácido Ala de la posición 213 (codón GCT) del lado del terminal amino de la G6PD de la cepa ATCC 13032 y n.º 58 ha cambiado a Thr (codón ACT) de la G6PD de la cepa M1. La secuencia de aminoácidos se representa en SEC ID n.º:12.

Es decir, se demuestra que la mutación de sustitución del aminoácido Ala213Thr está presente en la G6PD de la cepa M1. *Escherichia coli* Top10 que comprende el plásmido pCRBzwfM se deposita el 14 de abril de 2000 en la institución International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chrome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón (nombre antiguo: National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology: 1-3, Higashi 1-Chrome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón) con número de entrada FERM BP-7135.

Ejemplo 2

Efecto de la producción de L-lisina del nuevo gen de la G6PD

(1) Construcción de vector para sustitución génica

Para examinar el efecto de la mutación de sustitución del aminoácido en la G6PD indicada en el Ejemplo 1, el gen de la G6PD de la cepa n.º 58 se sustituye en un mutante.

Se construye un vector para esta sustitución génica de la forma indicada a continuación.

Se sintetiza un ADN de cadena sencilla de 37 meros y un ADN de cadena sencilla de 29 meros que comprenden las secuencias de nucleótidos representadas por SEQ ID No:5 y 6, respectivamente, según el procedimiento convencional. Estos ADN se mezclan en 50 µl de 0,1 M de NaCl para obtener una respectiva concentración de 10 pmol/µl y se mantienen a 95°C durante 2 minutos y, a continuación, a 65°C durante 15 minutos. Tras enfriamiento a 30°C durante 3 horas, ambas moléculas de ADN de cadena sencilla se aparean para obtener un ADN de cadena doble.

El plásmido pHSG299 (fabricado por Takara Shuzo) se digiere con las enzimas EcoRI y SphI (ambas fabricadas por Takara Shuzo), se somete a electroforesis en gel de agarosa y a continuación se extrae y purifica mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por Qiagen). El fragmento de plásmido pHSG299 obtenido se liga con el fragmento de ADN de cadena doble anterior mediante el sistema Ligation Kit versión 2 (fabricado por Takara Shuzo), y los fragmentos unidos se utilizan para transformar *Escherichia coli* DH5α según el procedimiento habitual. La cadena se cultiva en un medio de agar LB que contiene 50 µg/ml de kanamicina, y se seleccionan transformantes. Una cepa de los transformantes se cultiva durante toda la noche en un medio LB que contiene 50 µg/ml de kanamicina, y se prepara un plásmido a partir del medio de cultivo obtenido de esta forma mediante el procedimiento de lisis alcalina con SDS. Al plásmido obtenido se le denomina pHSG299L.

(2) Construcción del plásmido pCS299P

Se prepara un vector transportador pCS299P que se puede replicar autónomamente tanto en *Escherichia coli* como en las bacterias corineformes de conformidad con el procedimiento siguiente.

Se obtiene un fragmento digerido mediante BG III, realizando la digestión de pCG116 [Biol Technnology, 11, 921 (1993)] con la enzima Bg III (fabricada por Takara-Shuzo).

ES 2 341 432 T3

Tras la digestión del plásmido pHSG299 (fabricado por Takara Shuzo) con *Bam*HI (fabricada por Takara Shuzo), el fragmento digerido mediante *Bam*HI obtenido de esta forma se concentra mediante precipitación en etanol según el procedimiento convencional, y el fragmento se trata con fosfatasa alcalina. Los dos fragmentos obtenidos se mezclan y someten a una reacción de ligación mediante el sistema Ligation Kit versión 1 (fabricado por Takara Shuzo). Con el producto de la reacción, se transforma *Escherichia coli* NM522 según el procedimiento convencional (*Molecular Cloning*, segunda edición). La cepa se cultiva en un medio de agar LB que contiene 20 µg/ml de kanamicina para seleccionar un transformante. El transformante se cultiva durante toda la noche en un medio de agar LB que contiene 20 µg/ml de kanamicina, y se prepara un plásmido a partir del cultivo obtenido de esta forma mediante el procedimiento de lisis alcalina con SDS para obtener ADN pCS116-299Bg11.

Se confirman los sitios de restricción del ADN pCS116-299Bg11 según el procedimiento convencional.

Utilizando el ADN pCS116-299Bg11, se transforma *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 mediante electroporación [FEMS Microbiology Letters, 65, 299 (1989)].

Se selecciona un transformante cultivando la cepa en un medio de agar CM [un medio que contiene 10 g de peptona S (fabricada por Nihon Pharmaceutical), 5 g de extracto de levadura S (fabricado por Nihon Pharmaceutical), 10 g de extracto de carne Ehrlich (fabricado por Kyokuto Pharmaceutical), 3 g de cloruro de sodio y 30 µg de biotina en 1 litro de agua y ajustado a un pH 7,2] que contiene 20 µg/ml de kanamicina. Se extrae un plásmido del transformante según el procedimiento convencional, y el plásmido se digiere con enzimas de restricción para confirmar que el plásmido es pCS116-299Bg11.

El ADN pCS116-299Bg11 se digiere con la enzima PstI (fabricada por Takara Shuzo) y *Bam*HI y después se purifica mediante precipitación en etanol. Se prepara un plásmido parcialmente eliminado a partir del ADN obtenido de esta forma, mediante el sistema Deletion kit for kilo-sequencing (fabricado por Takara Shuzo). Se transforma *Escherichia coli* NM522 mediante el plásmido según el procedimiento convencional. La cepa se cultiva en un medio de agar LB que contiene 20 µg/ml de kanamicina para seleccionar transformantes. Los transformantes se cultivan durante toda la noche en un medio LB que contiene 20 µg/ml de kanamicina, y se preparan plásmidos a partir del medio de cultivo obtenido mediante el procedimiento de lisis alcalina con SDS. Según el procedimiento convencional, se prepara un mapa de restricción de cada uno de los plásmidos obtenidos, y se seleccionan plásmidos que presentan una longitud parcialmente eliminada diferente.

Se transforma *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 utilizando los plásmidos seleccionados mediante electroporación. Los transformantes obtenidos se siembran en un medio de agar CM que contiene 20 µg/ml de kanamicina y se cultivan a 30°C durante 2 días, y se seleccionan plásmidos que se pueden replicar de forma autónoma en *Corynebacterium ammoniagenes*, dependiendo de si se forman o no colonias resistentes a la kanamicina.

Entre los plásmidos dotados de capacidad de replicación autónoma, se selecciona un plásmido que presenta la zona de eliminación más larga, y a este plásmido se le denomina pCS299de16.

El ADN pCS299de16 se prepara a partir del transformante según el procedimiento convencional y a continuación se digiere con las enzimas de restricción DraI y PvuII (ambas fabricadas por Takara Shuzo). Los fragmentos de ADN digeridos se fraccionan mediante electroforesis en gel de agarosa, y se separa un fragmento de ADN de alrededor de 2,7 kb que presenta un ADN obtenido a partir del pCG116, y a continuación este se extrae y purifica mediante el sistema DNA prep (fabricado por Asahi Glass).

El ADN del vector pBluescript SK(+) (fabricado por TOYOBO) se digiere con la enzima EcoRV (fabricada por Takara Shuzo) según el procedimiento convencional. Los fragmentos de ADN digeridos de esta forma se concentran mediante precipitación en etanol y posterior tratamiento con fosfatasa alcalina. Los fragmentos de ADN tratados se fraccionan mediante electroforesis en gel de agarosa, y a continuación se extraen y se purifican mediante el sistema DNA prep.

El fragmento de ADN de 2,7 kb y el fragmento pBluescript SK(+) se ligan utilizando el sistema Ligation Kit versión 1, y a continuación se transforma *Escherichia coli* NM522 utilizando el ADN ligado según el procedimiento convencional. La cepa se cultiva en un medio de agar LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de X-Gal (5 bromo-4-cloro-3-indoil-β-D-galactósido) y 1 mmol/l de IPTG (isopropiltio-β-D-galactósido) para seleccionar transformantes. Los transformantes se cultivan durante toda la noche en un medio LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina, y se preparan plásmidos a partir del cultivo obtenido mediante el procedimiento de lisis alcalina con SDS. Según el procedimiento convencional, se prepara un mapa de restricción de cada uno de los plásmidos obtenidos. A un plásmido capaz de formar un fragmento de ADN de 3,4 kb y un fragmento de ADN de 2 kb mediante digestión con EcoRI, se le denomina pCSSK21.

Se sintetizan fragmentos de ADN que presentan las secuencias de ADN representadas por SEC ID n°:7 y 8, y se realiza la PCR utilizando los fragmentos de ADN como cebadores y el ADN pHSG299 como molde, y utilizando la polimerasa Taq de ADN (fabricada por Takara Shuzo) según las condiciones de reacción asociadas a ésta. El producto de la reacción se precipita con etanol según el procedimiento convencional y a continuación se digiere con las enzimas de restricción *Pst*I y *Xho*I (fabricadas por Takara Shuzo). Los fragmentos de ADN digeridos se fraccionan mediante

ES 2 341 432 T3

electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de ADN de alrededor de 1,3 Kb obtenido se extrae y purifica mediante el sistema DNA prep.

Se sintetizan fragmentos de ADN que presentan las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID n°:9 y 10, y se realiza la reacción PCR utilizando la polimerasa Taq de ADN según las condiciones de reacción asociadas a esta, en la que los fragmentos de ADN se utilizan como cebadores y el ADN pHSG299 se usa como molde. El producto de la reacción se precipita con etanol según el procedimiento convencional y a continuación se digiere con las enzimas de restricción *Pst*I y *Bgl*II. Los fragmentos de ADN digeridos se fraccionan mediante electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de ADN de alrededor de 1,3 kb obtenido se extrae y purifica mediante el sistema ADN prep.

El plásmido pCSSK21 obtenido se digiere con *Sal*I (fabricada por Takara Shuzo) y *Bam*HI. Los fragmentos de ADN digeridos se fraccionan mediante electroforesis en gel de agarosa, y el fragmento de ADN de alrededor de 2,7 kb obtenido se extrae y purifica mediante el sistema DNA prep. Los tres fragmentos de ADN extraídos y purificados anteriores se mezclan y ligan mediante el sistema Ligation Kit versión 1.

Escherichia coli NM522 se transforma con el fragmento de ADN ligado según el procedimiento convencional. La cepa se cultiva en un medio de agar LB que contiene 20 µg/ml de kanamicina, 50 µg/ml de X-Gal y 1 mmol/l de IPTG para seleccionar transformantes.

Los transformantes se cultivan durante toda la noche en un medio de LB que contiene 20 µg/ml de kanamicina, y se preparan plásmidos a partir del medio de cultivo obtenido de esta forma mediante el procedimiento de lisis alcalina con SDS. Según el procedimiento convencional, se prepara un mapa de restricción de cada uno de los plásmidos obtenidos, y al plásmido que presenta la estructura descrita en la figura 1 se le denomina pCS299P.

Los plásmidos pCS299P y pHSG299L se digieren con las enzimas *Xba*I y *Pst*I (ambas fabricadas por Takara Shuzo) y, a continuación, se someten a electroforesis en gel de agarosa. Tanto el fragmento de 2,5 kb que contiene una zona de iniciación de replicación derivada del vector pCS299P (*Ori*C) en la bacteria del género *Corynebacterium* como el fragmento pHSG299L se extraen y purifican mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por QUIAGEN). El fragmento de ADN de 2,5 kb y el fragmento pHSG299L se ligan utilizando el sistema Ligation Kit versión 2 (fabricado por Takara Shuzo) y se utilizan para la transformación en *Escherichia coli* DHα según el procedimiento convencional. Se prepara un plásmido a partir del transformante obtenido de la misma manera que con el procedimiento. Al plásmido obtenido, se le denomina pHSG299OC.

Los plásmidos pMOB3 (ATCC 77282) y pHSG299OC se digieren con *Pst*I (fabricada por Takara Shuzo) y a continuación se someten a electroforesis en gel de agarosa. Tanto el fragmento de 2,6 kb que contiene un gen de la levan-sacarasa (*Sac*B) de *Bacillus subtilis* obtenido a partir de pMOB3 como el fragmento pHSG299OC se extraen y purifican mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por QUIAGEN).

El fragmento de ADN de 2,6 kb y el fragmento pHSG299OC se ligan mediante el sistema Ligation Kit versión 2 (fabricado por Takara Shuzo) y se transforman en *Escherichia coli* DHα según el procedimiento convencional. La cepa se cultiva en un medio de agar LB que contiene 50 µg/ml de kanamicina para seleccionar un transformante. Se prepara un plásmido a partir del transformante obtenido de la misma manera que con el procedimiento anterior. Al plásmido se le denomina pHSG299OCSB.

Un fragmento de ADN de 5,1 kb obtenido digiriendo el plásmido pHSG299OCSB con *Not*I se somete a electroforesis en gel de agarosa y a continuación se extrae y purifica mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por QUIAGEN). El plásmido pCRBzwfM preparado en el Ejemplo 1 se digiere con *Not*I, se somete a electroforesis en gel de agarosa y a continuación se extrae y purifica mediante el sistema QIAquick Gel Extraction Kit (fabricado por QUIAGEN). Un fragmento de *Not*I que contiene *Ori*C y el gen de la *Sac*B se conecta al sitio *Not*I del plásmido pCRBzwfM mediante el sistema Ligation Kit versión 2 (fabricado por Takara Shuzo) y se transforma en *Escherichia coli* DH5α según el procedimiento convencional. La cepa se cultiva en un medio de agar LB que contiene 50 µg/ml de kanamicina para seleccionar un transformante. Se prepara un plásmido a partir del transformante obtenido de la misma manera que con el procedimiento anterior. Al plásmido se le denomina pCRBOSzwfM, y este se utiliza como un vector recombinante para el gen de la G6PD.

(3) Sustitución del gen de la G6PD de la cepa n.º 58

El gen de la G6PD mutante que contiene el plásmido pCRBOSzwfM se introduce en la cepa n.º 58 y a continuación se integra en el ADN cromosómico mediante recombinación homóloga, utilizando el procedimiento de Ikeda *et al.* [Microbiology, 144, 1863 (1998)].

Las cepas en las que tiene lugar la segunda recombinación se seleccionan mediante el procedimiento de selección que aprovecha la propiedad de la levan-sacarasa de *Bacillus subtilis* codificada por pCRBOSzwfM para producir un sustrato suicida [Journal of Bacteriology, 174, 5462 (1992)], y una cepa en la que el gen de la G6PD (tipo natural) contenido originalmente en la cepa n.º 58 se sustituye con el gen de la G6PD mutante se aísla a partir de las cepas seleccionadas anteriores mediante el procedimiento indicado a continuación.

El pCRBOSzwfM se introduce en la cepa n.º 58 mediante electroporación [FEMS Microbiology Letters, 65, 299 (1989)], y se obtienen transformantes cultivando la cepa a 30°C durante 2 horas en un medio de agar KM163 [un medio que contiene 10 g de glucosa, 10 g de peptona (fabricada por Kyokuto Pharmaceutical), 5g de extracto de carne Ehrlich (fabricado por Kyokuto Pharmaceutical), 2 g de urea, 2,5 g de cloruro de sodio y 18 g de Bacto-agar (fabricado por Difco) en 1 litro de agua y ajustado a un pH 7,2] que contiene 50 µg/ml de kanamicina. Se selecciona una cepa Tf1 de los transformantes, y la cepa se cultiva en un medio KM163 que contiene 20 µg/ml de kanamicina y se somete a electroporación para introducir el vector pCG11 (solicitud de patente japonesa n.º 91827/1994). Tras la operación de introducción, la cepa se cultiva en un medio de agar KM163 que contiene 50 µg/ml de kanamicina y 200 µg/ml de espectomicina a 30°C durante 2 días, para obtener transformantes. Se examina el cromosoma de una cepa de los transformantes mediante hibridación Southern blot, de conformidad con el procedimiento de Ikeda *et al.* [Microbiology, 144, 1863 (1998)]. Por consiguiente se confirma que el plásmido pCRBOSzwfM se ha integrado en el cromosoma mediante una recombinación homóloga tipo Campbell. Puesto que los genes natural y mutante de la G6PD están situados muy próximos entre sí en el cromosoma de dichas cepas, ambos genes son propensos a una segunda recombinación mutua.

El transformante (recombinante único) se siembra en un medio Suc [medio que contiene 100 g de sacarosa, 7 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 3 g de cloruro de sodio, 5 g de extracto de levadura (fabricado por Difco) y 18 g de Bacto-agar (fabricado por Difco) en 1 litro de agua y ajustado a un pH 7,2] y se cultiva a 30°C durante 1 día, y se seleccionan las colonias supervivientes. Una cepa que presenta el gen de la SacB no puede crecer en este medio, porque convierte la sacarosa en un sustrato suicida. Por otro lado, una cepa en la que el gen de la SacB se ha eliminado mediante la segunda recombinación homóloga entre el gen natural y el mutante de la G6PD puede crecer en este medio, ya que no se forma el sustrato suicida. Durante la recombinación homóloga, el gen natural o mutante de la G6PD se elimina junto con el de la SacB. En este caso, la sustitución del gen en el gen mutante de la G6PD se produce en una cepa en la que el gen natural de la G6PD se suprime conjuntamente con el gen de la SacB.

Se prepara un ADN cromosómico del recombinante secundario obtenido anteriormente, mediante el procedimiento de Saito *et al.* [Biochimica et Biophysica Acta, 72, 619 (1963)], y se realiza la reacción PCR utilizando la ADN polimerasa Pfu turbo (fabricada por Stratagene) y el tampón añadido, empleándose como cebadores los fragmentos de ADN que presentan las secuencias de nucleótidos representadas por SEC ID n.º:3 y 4. La tipificación del gen de la G6PD del doble recombinante como natural o mutante se realiza determinando las secuencias de nucleótidos de estos productos de la PCR de la forma habitual. En los resultados, se confirma que se obtienen cepas que contienen sólo el gen natural de la G6PD (cepa n.º 58W, por ejemplo) y cepas que contienen sólo el gen mutante de la G6PD (cepa n.º 58M, por ejemplo).

(4) Prueba de producción de L-lisina

Se evalúa la productividad de la lisina en las cepas con sustitución génica de G6PD obtenidas (n.º 58W y n.º 58M) y la cepa n.º 58, que es la cepa progenitora, mediante el cultivo de estas en un frasco de fermentación de 5 litros.

Cada cepa se inocula en 100 ml de un primer medio de siembra [un medio preparado disolviendo 50 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura (fabricado por Nihon Pharmaceutical), 10 g de peptona (fabricada por Kyokuto Pharmaceutical Industry), 5 g de agua de maceración de maíz, 2,5 g de cloruro de sodio, 3 g de urea y 50 µg de biotina en 1 litro de agua, ajustando la solución a un pH 7,2 y añadiendo además 10 g de carbonato cálcico], y se cultiva a 30°C durante 24 horas en un matraz de Erlenmeyer con deflectores de 1 litro de capacidad. A continuación, se inoculan 40 ml del primer caldo de cultivo en 2.000 ml de un segundo medio de siembra (medio preparado disolviendo 50 g de glucosa, 10 g de agua de maceración de maíz, 0,5 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 5 mg de ácido nicotínico, 1 mg de hidrocloreuro de tiamina, 100 µg de biotina, 10 mg de pantotenato de calcio, 2 g de dihidrogenofosfato de potasio, 3 g de urea, 10 mg de sulfato ferroso heptahidratado, 1 mg de sulfato de zinc heptahidratado, 8 g de sulfato de amonio, 20 g de peptona y 2 g de bicarbonato de sodio en 1 litro de agua), y se cultivan a 30°C durante 12 horas en un frasco de fermentación de 5 litros. A continuación, se inoculan 230 ml del segundo caldo de cultivo en 1.675 ml de un medio de cultivo principal [medio preparado disolviendo 93 g de melaza residual (la cantidad de azúcar equivalente), 0,5 g de potasio dihidrogenofostato, 10 mg de sulfato ferroso heptahidratado, 100 µg de hidrocloreuro de tiamina, 2 g de peptona de soja, 0,5 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 5 mg de ácido nicotínico y 15 g de sulfato de amonio en 1 litro de agua, y ajustando el pH a 7,4], y se cultivan a 35°C durante 42 horas en un frasco de fermentación de 5 litros.

La cantidad de L lisina acumulada en el cultivo principal se cuantifica mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La tabla 1 representa los resultados de la medición de la cantidad de L-lisina producida por la cepa n.º 58, la cepa n.º 58W y la cepa n.º 58M. Los resultados demuestran que la productividad de L-lisina aumenta con la nueva G8PD mutante.

TABLA 1

Cepa	Productividad de L-lisina (g/l)
N.º 58	49,7
N.º 58W	53,5
N.º 58M	63,3

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, se obtiene una G6PD modificada y un ADN que codifica la G6PD, y la productividad de L-aminoácidos por un microorganismo puede aumentar mediante la G6PD modificada.

Texto libre de la lista de secuencias

SEC ID N°:3: Descripción de la secuencia artificial - ADN sintético

SEC ID N°:4: Descripción de la secuencia artificial - ADN sintético

SEC ID N°:5: Descripción de la secuencia artificial - ADN sintético

SEC ID N°:6: Descripción de la secuencia artificial - ADN sintético

SEC ID N°:7: Descripción de la secuencia artificial - ADN sintético

SEC ID N°:8: Descripción de la secuencia artificial - ADN sintético

SEC ID N°:9: Descripción de la secuencia artificial - ADN sintético

SEC ID N°:10: Descripción de la secuencia artificial - ADN sintético

REIVINDICACIONES

1. ADN que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre el grupo constituido por:

- (a) una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID n°:11;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n°:12 o
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que presenta una homología del 95% o superior con la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID n°:2, y que presenta actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, en el que está presente una treonina en la posición 213.

2. Polipéptido que está codificado por el ADN según la reivindicación 1 y que presenta actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

3. ADN recombinante que puede obtenerse insertando el ADN según la reivindicación 1 en un vector.

4. ADN recombinante según la reivindicación 3, en el que el ADN recombinante puede replicarse en un microorganismo perteneciente al género *Escherichia* o el género *Corynebacterium*.

5. Plásmido pCRBzwfM comprendido en *Escherichia coli* TOP10 (FERM BP-7135).

6. Transformante que se puede obtener introduciendo el plásmido recombinante o el ADN recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en una célula huésped.

7. Transformante según la reivindicación 6, en el que la célula huésped es un microorganismo que puede producir un L-aminoácido.

8. Transformante según la reivindicación 7, en el que la célula huésped es un microorganismo perteneciente al género *Escherichia* o el género *Corynebacterium*.

9. Transformante perteneciente al género *Escherichia* o el género *Corynebacterium*, que comprende un cromosoma en el cual se integra de manera artificial el ADN según la reivindicación 1.

10. Transformante según la reivindicación 8 ó 9, en el que el microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium* es el *Corynebacterium glutamicum*.

11. Procedimiento para producir un polipéptido según la reivindicación 2, que comprende el cultivo del transformante según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 en un medio para formar y acumular el polipéptido en un cultivo, y la recuperación del polipéptido del cultivo.

12. Procedimiento para producir un L-aminoácido, que comprende el cultivo del transformante según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 en un medio para formar y acumular el L-aminoácido que se biosintetiza utilizando NADPH en el cultivo, y la recuperación del L-aminoácido del cultivo.

13. Procedimiento para producir un L-aminoácido según la reivindicación 12, en el que el L-aminoácido que se biosintetiza utilizando NADPH se selecciona de entre L-lisina, L-treonina, L-isoleucina, L-triptófano, L-fenilalanina, L-tirosina, L-histidina y L-cisteína.

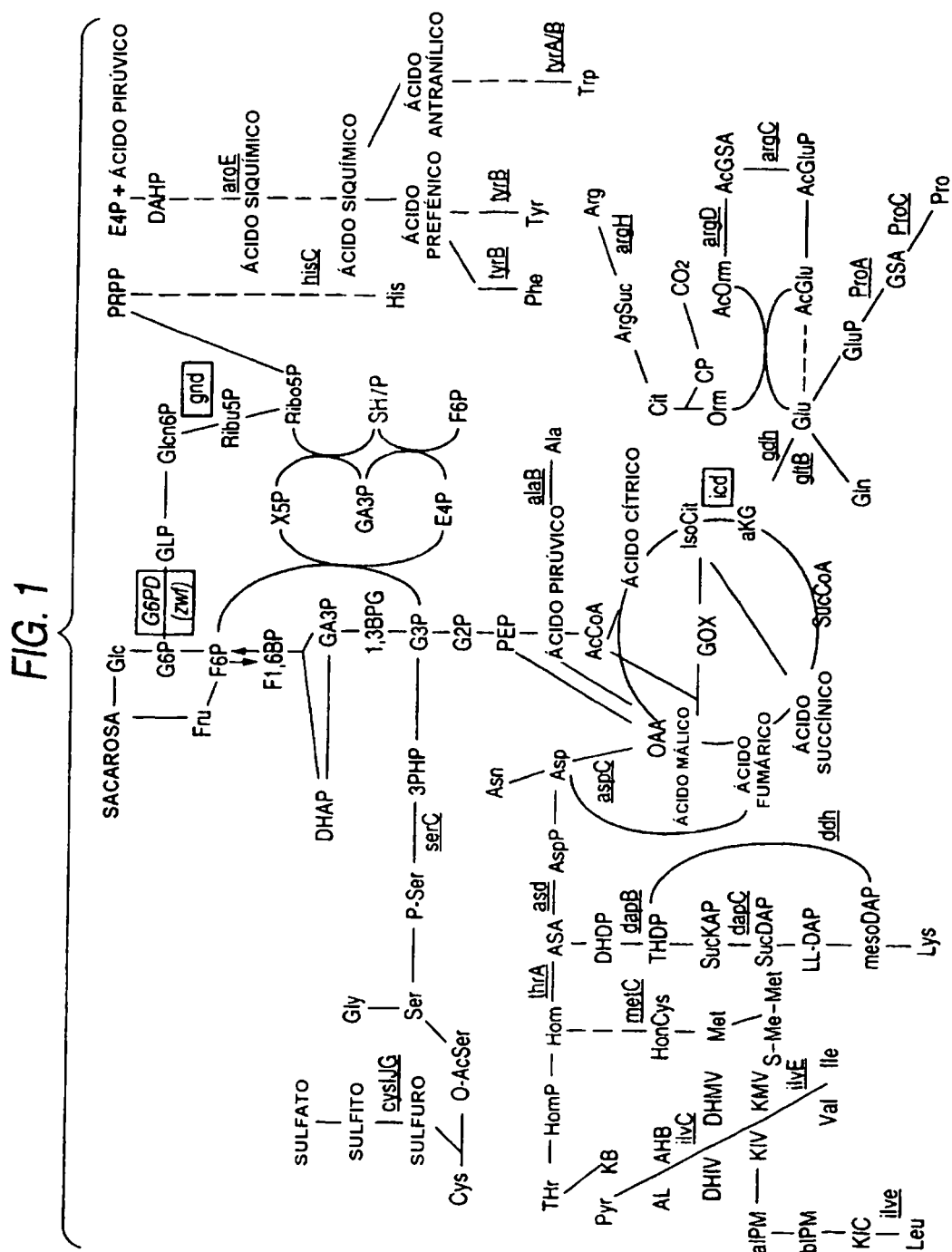
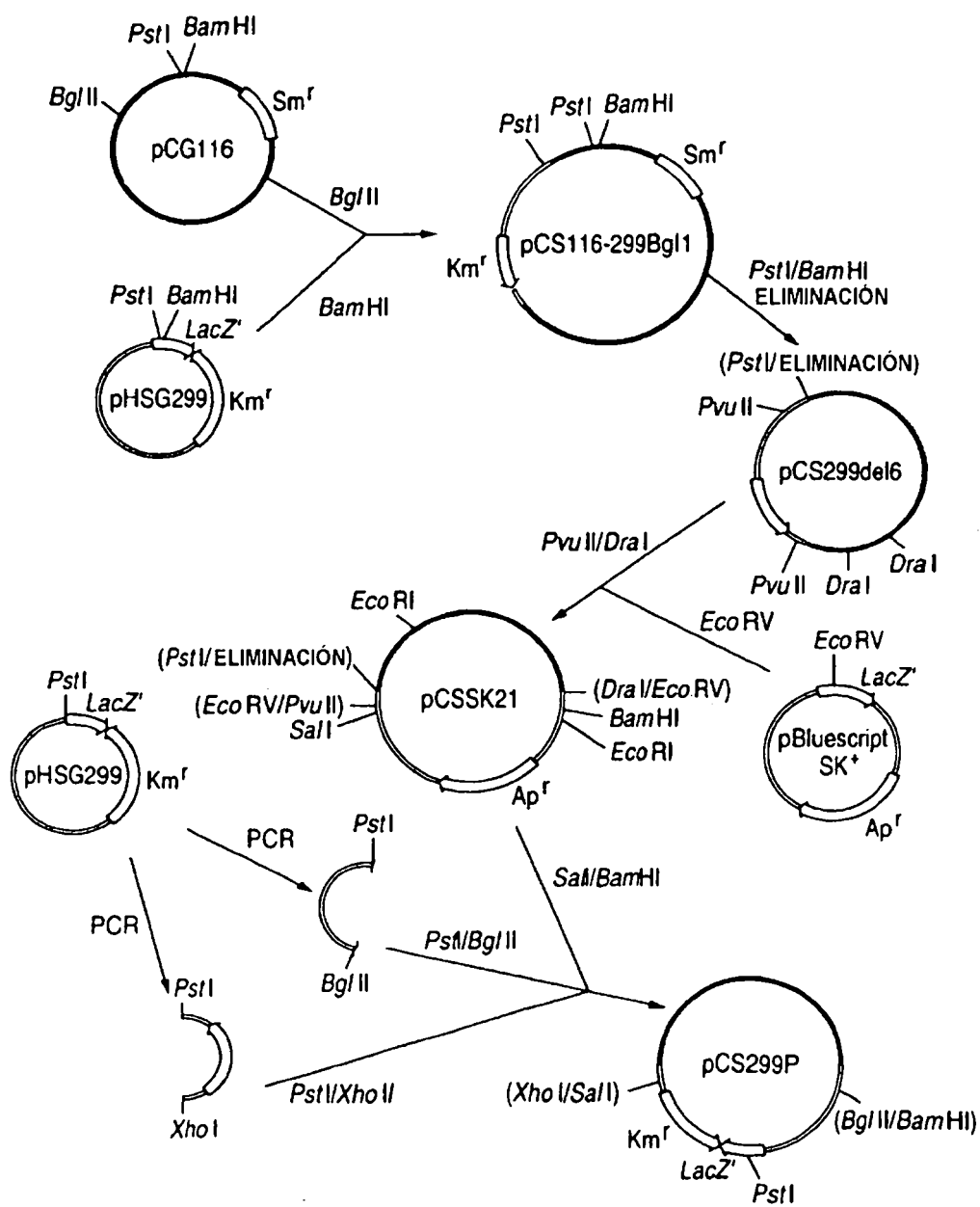


FIG. 2



ES 2 341 432 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Kyowa Hakko Kogyo, Co., LTD

5 <120> Nueva glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

<130> 11308W01

10 <150> JP 2000/185789

<151> 2000-06-21

<160> 12

15 <170> Patente en Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1452

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1452)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 341 432 T3

<400> 1

5	atg gtg atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctc	48
	Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu	
	1 5 10 15	
10	ccc gcc att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc	96
	Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe	
	20 25 30	
15	tgc ttg gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa	144
	Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu	
	35 40 45	
20	aaa tac gta cgc gat gcc gca agt gct ggt gct cgt acg gaa ttc cgt	192
	Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg	
	50 55 60	
25	gaa aat gtt tgg gag cgc ctc gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc ggc	240
	Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly	
30	65 70 75 80	
	aac ttt gat gat gat gca gct ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag	288
	Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys	
35	85 90 95	
	cgc atc gac aaa acc cgc ggc acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg	336
	Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu	
40	100 105 110	
	tcc att cca cca gat tcc ttc aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt	384
	Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg	
45	115 120 125	
	tcc ggc atg gct gaa tcc acc gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc	432
	Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile	
50	130 135 140	

55

60

65

ES 2 341 432 T3

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

ES 2 341 432 T3

5	aac cct gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile 305 310 315 320	960
10	acg tct cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys 325 330 335	1008
15	cgt ctt ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala 340 345 350	1056
20	cca cac cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn 355 360 365	1104
25	gcc atc gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe 370 375 380	1152
30	ggt tcc aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met 385 390 395 400	1200
35	gac ttc tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr 405 410 415	1248
40	gag cgc ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro 420 425 430	1296
45	acc aac gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu 435 440 445	1344
50	gaa gca tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr 450 455 460	1392
55	tgg ggt cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr 465 470 475 480	1440
60	tgg cgc agg cca Trp Arg Arg Pro	1452
65		

ES 2 341 432 T3

<210> 2

<211> 484

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

```

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

```

60

65

ES 2 341 432 T3

[illegible]

55 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
60 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético
65 <400> 3

gatccgatga ggctttggct ctgcgtggc

ES 2 341 432 T3

	<210> 4	
	<211> 29	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético	
10	<400> 4	
	cttcattggt ggactcggta actgcagcg	29
15	<210> 5	
	<211> 37	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético	
25	<400> 5	
	aattcgcggc cgctctagac tgcagcggcc gcgcatg	37
30	<210> 6	
	<211> 29	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligómero sintético	
40	<400> 6	
	cgcgcccgct gcagtctaga gcggccgcg	29
45	<210> 7	
	<211> 28	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
55	<400> 7	
	aaaaagatct cgacggatcg ttccactg	28
60	<210> 8	
	<211> 17	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 341 432 T3

	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
5	<400> 8	
	gtaaaacgac ggccatg	17
10	<210> 9	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
20	<400> 9	
	cgagtcgact cgcgaagtag cacctgtcac ttttg	35
25	<210> 10	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
35	<400> 10	
	tggggatccg caccaacaac tgcgatggtg gtc	33
40	<210> 11	
	<211> 1452	
	<212> ADN	
	<213> <i>Corynebacterium glutamicum</i>	
45	<220>	
	<221> CDS	
50	<222> (1)..(1452)	
55		
60		
65		

ES 2 341 432 T3

<400> 11

5	aig gtg atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctc	48
	Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu	
	1 5 10 15	
10	ccc gcc att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc	96
	Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe	
	20 25 30	
15	tgc ttg gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa	144
	Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu	
	35 40 45	
20	aaa tac gta cgc gat gcc gca agt gct ggt gct cgt acg gaa ttc cgt	192
	Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg	
	50 55 60	
25	gaa aat gtt tgg gag cgc ctc gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc ggc	240
	Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly	
	65 70 75 80	
30		
35	aac ttt gat gat gat gca gct ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag	288
	Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys	
	85 90 95	
40	cgc atc gac aaa acc cgc ggc acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg	336
	Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu	
	100 105 110	
45	tcc att cca cca gat tcc ttc aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt	384
	Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg	
	115 120 125	
50	tcc ggc atg gct gaa tcc acc gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc	432
	Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile	
	130 135 140	
55	gag aag cct ttc ggc cac aac ctc gaa tcc gca cac gag ctc aac cag	480
	Glu Lys Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln	
	145 150 155 160	
60	ctg gtc aac gca gtc ttc cca gaa tct tct gtg ttc cgc atc gac cac	528
	Leu Val Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His	
	165 170 175	
65		

ES 2 341 432 T3

5	tat ttg ggc aag gaa aca gtt caa aac atc ctg gct ctg cgt ttt gct Tyr Leu Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala 180 185 190	576
10	aac cag ctg ttt gag cca ctg tgg aac tcc aac tac gtt gac cac gtc Asn Gln Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val 195 200 205	624
15	cag atc acc atg act gaa gat att ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac Gln Ile Thr Met Thr Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr 210 215 220	672
20	tac gac ggc atc ggc gca gcc cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc Tyr Asp Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile 225 230 235 240	720
25	cag ctc ttg gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro 245 250 255	768
30	gcg cag ctg cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag ccg Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro 260 265 270	816
35	tgc tac cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly 275 280 285	864
40	tgg cag ggc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe 290 295 300	912
45	aac cct gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile 305 310 315 320	960
50	acg tct cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys 325 330 335	1008

ES 2 341 432 T3

5	cgt ctt ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg .ttt aaa gac gca Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala 340 345 350	1056
10	cca cac cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc .caa aac Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn 355 360 365	1104
15	gcc atc gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe 370 375 380	1152
20	ggt tcc aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt .gac gtc aac atg Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met 385 390 395 400	1200
25	gac ttc tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr 405 410 415	1248
30	gag cgc ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct	1296
35	Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro 420 425 430	
40	acc aac gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu 435 440 445	1344
45	gaa gca tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr 450 455 460	1392
50	tgg ggt cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr 465 470 475 480	1440
55	tgg cgc agg cca Trp Arg Arg Pro	1452

<210> 12

<211> 484

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

ES 2 341 432 T3

<400> 12

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

ES 2 341 432 T3

5 Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro
 245 250 255
 Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro
 260 265 270
 10 Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly
 275 280 285
 Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe
 290 295 300
 15 Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile
 305 310 315 320
 Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys
 325 330 335
 20 Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala
 340 345 350
 Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn
 355 360 365
 25 Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe
 370 375 380
 30 Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met
 385 390 395 400
 Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr
 405 410 415
 35 Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro
 420 425 430
 40 Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu
 435 440 445
 45 Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr
 450 455 460
 50 Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr
 465 470 475 480
 Trp Arg Arg Pro