



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 620**

51 Int. Cl.:

C12P 25/00 (2006.01)	C12P 13/24 (2006.01)
C12P 17/12 (2006.01)	C12P 17/16 (2006.01)
C12P 19/30 (2006.01)	C12P 19/32 (2006.01)
C12P 19/38 (2006.01)	C12P 19/40 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99112854 .7**

96 Fecha de presentación : **02.07.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **0969096**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2000**

54

Título: **Procedimiento para producir metabolitos sintetizados biológicamente mediante pirofosfato de fosforribosilo.**

30

Prioridad: **03.07.1998 JP 10-187992**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.01.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.01.2011

73

Titular/es: **KYOWA HAKKO BIO Co., Ltd.**
1-6-1, Ohtemachi
Chiyoda-ku, Tokyo, 100-8185, JP

72

Inventor/es: **Nakano, Tetsuo;**
Okamoto, Kazuyuki;
Ikeda, Masato y
Kamada, Nozomu

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 349 620 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 producir metabolitos sintetizados biológicamente mediante pirofosfato de fosforribosilo.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de sustancias útiles que se sintetizan por un procedimiento de fermentación en la serie de reacciones de biosíntesis a partir de pirofosfato de fosforribosilo (denominado "PRPP" en adelante) utilizando una cepa modificada en el metabolismo, que es completamente carente de actividad de transcetolasa o que presenta actividad de transcetolasa reducida en comparación con la cepa original.

10 Los ejemplos de sustancias útiles sintetizadas a partir de PRPP en la serie de reacciones metabólicas microbianas incluyen sustancias relacionadas con ácidos nucleicos tales como nucleótidos púricos, nucleótidos pirimidínicos, nucleósidos púricos, nucleósidos pirimidínicos, bases púricas, bases pirimidínicas y nucleótidos de flavina, así como L-histidina y riboflavina.

15 Estas sustancias relacionadas con los ácidos nucleicos, L-histidina, riboflavina y similares se han producido industrialmente por un procedimiento de fermentación o por una combinación de un procedimiento de fermentación con un procedimiento de síntesis. Véase Applied Microbiology, editado por Soichi Takao *et al.*, Buneido Shuppan (1996); Amino Acid Fermentation, editado por Hiroshi Aida *et al.*, Gakkai Shuppan Center (1986); documento JP-A-6-225776 ("JP-A" tal como se utiliza en la presente memoria significa una solicitud de patente japonesa publicada sin examinar").

20 En los microorganismos, PRPP es sintetizado biológicamente por una PRPP sintetasa a partir de ribosa 5-fosfato que es un compuesto intermedio en la serie de reacciones de pentosa fosfato.

25 En cuanto a las series de reacciones de biosíntesis de ribosa 5-fosfato, se conoce una serie de reacción oxidativa de pentosa fosfato a través de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, y es de esperar que una serie de reacciones de pentosa fosfato no oxidativa esté también implicada en su biosíntesis porque todas las enzimas en la serie de reacciones no oxidativa de pentosa fosfato a través de la reacción de transcetolasa son reversibles (véase la figura 1).

30 Se ha determinado mediante un estudio del metabolismo de la glucosa marcada que ambas de estas series de reacciones se refieren a la biosíntesis de ribosa 5-fosfato *Escherichia coli*, véase *Biochemistry*, 12, 10, 1969 (1973). Además, se ha demostrado mediante estudios genéticos, que la ribosa 5-fosfato es suministrada por la serie de reacciones de pentosa fosfato no oxidativa a través de la reacción de transcetolasa, porque las cepas carentes de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de *Escherichia coli* y *Corynebacterium glutamicum* no presentan auxotrofia de la ribosa, véase D.G. Fraenkel y R.T. Vinopal, *Ann. Rev. Microbiol.*, 27, 69-100 (1973); E.D. Ihnen y A.L. Demain, *J. Bacteriol.*, 98, 1151-1158 (1969).

35 Esta información sugiere que el aumento en la actividad de la transcetolasa permite un aumento del aporte de ribosa 5-fosfato y de PRPP procedente de la serie de reacciones no oxidativa y por consiguiente aumenta la cantidad de sustancias biológicamente sintetizadas a partir de PRPP.

40 Además, se ha publicado que una cepa carente de actividad de transcetolasa en las cepas que producen inosina que pertenecen al género *Bacillus* tal como *Bacillus subtilis* acumula una cantidad considerable de ribosa en el medio de cultivo de modo que el rendimiento de la producción de nucleótidos púricos se reduce, véase K. Sasajima y M. Yoneda, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 2, 175-213 (1984).

45 Esta información sugiere también que la actividad de la transcetolasa es necesaria para la producción de sustancias biológicamente sintetizadas a partir de PRPP. Sin embargo, hasta la fecha, con respecto a todos los microorganismos, no se ha sabido que el rendimiento de la producción de metabolitos que han de sintetizarse biológicamente a partir de PRPP mejore por pérdida o reducción de la actividad de la transcetolasa.

50 Dado que la demanda de metabolitos sintetizados biológicamente ha aumentado a partir de PRPP, las sustancias relacionadas con el ácido nucleico específicamente, L-histidina, riboflavina y similares, es muy deseable el desarrollo de un procedimiento industrialmente ventajoso para su producción.

55 El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento industrialmente ventajoso para la producción de metabolitos sintetizados biológicamente a partir de PRPP.

60 En los estudios convencionales sobre el cultivo de microorganismos, se han alcanzado grandes logros por la mejora del metabolismo de la serie de reacciones de biosíntesis terminal afectadas en la biosíntesis de cada metabolito de interés.

65 En la presente invención se ha considerado que otra modificación aparte de la mejora metabólica de la serie de reacciones de biosíntesis terminal, es decir de la modificación del metabolismo central capaz de modificar el aporte y la mezcla del sustrato de partida, sería necesaria para mejorar más la productividad de los metabolitos y realizar estudios exhaustivos sobre la influencia del flujo del carbono en varios metabolitos manipulando la serie de reacciones metabólica central en los microorganismos.

Como resultado, se ha observado que la eficacia de la producción de metabolitos biológicamente sintetizados a partir de PRPP en la serie de reacciones de biosíntesis puede mejorarse haciendo que la actividad de la transcetolasa sea insuficiente o reducida en comparación con la de una cepa original de la misma, dando como resultado de este modo la realización de la presente invención.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar:

- (1) un procedimiento para el aumento de producción de metabolitos biológicamente sintetizados a partir de pirofosfato de fosforribosilo en la serie de reacciones metabólicas en un microorganismo, comparado con el de una cepa original del mismo, según la reivindicación 1.
- (2) procedimiento según el apartado (1) anterior, en el que el metabolito se selecciona de entre el grupo constituido por nucleótidos púricos, nucleótidos pirimidínicos, nucleósidos púricos, nucleósidos pirimidínicos, bases púricas, bases pirimidínicas, nucleótidos de flavina, L-histidina y riboflavina;
- (3) procedimiento según el apartado (1) o (2) anterior, en el que dicho microorganismo se selecciona de entre el grupo constituido por TKT6 de *Corynebacterium glutamicum*, TKT6/pPH8 de *Corynebacterium glutamicum*, TKT6/pFM41 de *Corynebacterium glutamicum* y AI80/pFM201 de *Escherichia coli*;
- (4) un microorganismo, en el que dicho microorganismo se selecciona de entre el grupo constituido por TKT6 de *Corynebacterium glutamicum*, TKT6/pPH8 de *Corynebacterium glutamicum* y TKT6/pFM41 de *Corynebacterium glutamicum*.

La figura 1 es un gráfico que presenta la serie de reacciones metabólicas desde glucosa hasta PRPP. En la figura 1, las flechas grises muestran las reacciones mediante transcetolasa.

A continuación se describe con detalle la presente invención.

La frase “microorganismo en el que la actividad de transcetolasa es reducida en comparación con una cepa original de la misma” tal como se utiliza en la presente memoria incluye todas las cepas que presentan cualquier grado de actividad de transcetolasa reducida en comparación con una cepa original determinada en las condiciones descritas en los ejemplos a continuación. La reducción en la actividad de transcetolasa es del 30% o más, preferentemente 50% o más. Los ejemplos de cepas en las que la actividad de transcetolasa es insuficiente o reducida incluyen las cepas con una o más modificaciones de nucleótidos que producen carencia o reducción en la actividad de transcetolasa, modificaciones que se seleccionan de entre sustituciones, eliminaciones, inserciones, adiciones e inversiones de nucleótidos en la secuencia nucleotídica del gen estructural de transcetolasa o del gen que participa en la transcripción o traducción del gen estructural de transcetolasa.

El microorganismo que debe utilizarse en la presente invención es cualquiera de las cepas naturales, cepas mutantes, cepas de fusión celular, cepas transducidas o cepas recombinantes construidas mediante técnicas de ADN recombinante, siempre que pertenezcan al género *Corynebacterium*, *Brevibacterium* o *Escherichia*, y siempre que la actividad de transcetolasa del microorganismo sea insuficiente o reducida en comparación con la cepa original del mismo.

Los ejemplos de los microorganismos incluyen *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium melassecola*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium thiogenitalis* y *Escherichia coli*, en los que la actividad de transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con una cepa original de los mismos.

Los ejemplos preferidos de los microorganismos que han de utilizarse como originales en la presente invención incluyen las denominadas cepas productoras de ácido glutámico de tipo coryne y *Escherichia coli* que se utilizan en la fermentación de aminoácidos y *Corynebacterium ammoniagenes* que se utiliza en la fermentación de ácidos nucleicos y en la fermentación de riboflavina.

El microorganismo de la presente invención puede obtenerse a partir de un microorganismo conocido que pertenece al género *Corynebacterium*, *Brevibacterium* o *Escherichia*, provocando la mutación que produce carencia o reducción de la actividad de transcetolasa en microorganismos conocidos por un procedimiento de tratamiento por mutación habitual, un procedimiento de sustitución génica por técnicas de ADN recombinante, un procedimiento de transducción o un procedimiento de fusión celular.

Como ejemplos ilustrativos, la cepa de la presente invención se obtiene por selección utilizando auxotrofia del ácido shikímico y la propiedad no asimiladora de la ribosa como marcadores.

Después de someter a un microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium*, *Brevibacterium* o *Escherichia*, al tratamiento por mutación habitual, tal como irradiación de rayos ultravioletas o tratamiento químico con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o ácido nitroso, se obtienen mutantes auxótrofos con ácido shikímico aislando las colonias que no pueden crecer o que presentan escaso crecimiento en un medio mínimo que contiene glucosa como

única fuente de carbono, en el que la muestra original puede crecer, pero presenta buen crecimiento en dicho medio mínimo enriquecido con ácido shikímico.

5 Cada mutante auxótrofo con ácido shikímico se extiende en un medio mínimo que contiene ácido shikímico y glucosa o ribosa como única fuente de carbono, y se selecciona la cepa mutante que puede desarrollarse en el medio con glucosa pero no puede desarrollarse o presenta poco desarrollo en el medio de ribosa. Esta cepa es un mutante en el que la actividad de la transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con la cepa original de la misma.

10 Mediante este procedimiento, puede obtenerse fácilmente un mutante que tiene auxotrofia con ácido shikímico y la propiedad no asimilante de ribosa, en la que la actividad de la transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con una cepa original de la misma. Además, una cepa mutante con actividad de transcetolasa insuficiente o reducida puede obtenerse mediante el procedimiento de sustitución génica habitual utilizando un gen de transcetolasa en el que un gen que codifica a la transcetolasa se destruye *in vitro*.

15 Como gen que codifica a la transcetolasa, pueden utilizarse genes conocidos, véase G.A. Sprenger, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1216, 307 (1993); A. Iida *et al.*, *J. Bacteriol.*, 175, 5375-5383 (1993); documento JP-A-6-169785. La secuencia de ADN del gen de la transcetolasa de *Corynebacterium glutamicum* ha sido sometida a DDBJ/GenBank/EMBL en el contexto de la presente invención y se le ha asignado el número de registro AB023377.

20 Aunque la cepa de la presente invención puede obtenerse por selección utilizando auxotrofia del ácido shikímico y la propiedad no asimilante de la ribosa como marcadores, determinadas cepas con actividad de transcetolasa ligeramente reducida comparadas con la cepa original no siempre presentan la auxotrofia del ácido shikímico y la propiedad no asimilante de ribosa. Dichas cepas, sin embargo, se desea también que sean ilustrativas como microorganismos adecuados para su utilización en la presente invención. Es decir, el microorganismo de la presente invención, es un microorganismo con aumento de la actividad de metabolitos biológicamente sintetizados a partir de PRPP en la serie de reacciones metabólicas.

25 Dichos microorganismos pueden obtenerse a partir de una cepa mutante de transcetolasa que presenta auxotrofia del ácido shikímico produciendo una mutación inversa en la que la auxotrofia del ácido shikímico desaparece completamente, una mutación inversa en la que la auxotrofia del ácido shikímico resulta defectuosa o una mutación inversa en la que la propiedad de asimilación de la ribosa se restablece parcial o completamente.

30 Ejemplos ilustrativos de dicho microorganismo incluyen TKT6 de *Corynebacterium glutamicum*.

35 Además, una cepa capaz de producir el metabolito de interés de manera más eficaz puede obtenerse a partir del microorganismo obtenido de este modo en el que la actividad de la transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con la de una cepa original del mismo, utilizando además un procedimiento conocido para mejorar la productividad de un metabolito de interés seleccionado de entre metabolitos biológicamente sintetizados a partir de PRPP, tal como el procedimiento en el que una serie de reacciones de degradación o una serie de reacciones de ramificación está bloqueada o el procedimiento en el que se libera el control de retroalimentación de una enzima clave en la serie de reacciones de biosíntesis o la actividad de la enzima aumenta, haciendo uso de técnicas de mutación o de ADN recombinante.

40 Utilizando las técnicas del ADN recombinante, una cepa con productividad mejorada de un metabolito de interés puede obtenerse transformando un hospedador con un plásmido recombinante que contiene un gen para la biosíntesis de dicho metabolito.

45 A título ilustrativo, puede obtenerse una cepa capaz de producir histidina en una cantidad considerable introduciendo un plásmido recombinante que contiene un gen para biosíntesis de histidina, tal como pPH8, en *Corynebacterium glutamicum* en el que la actividad de transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con una cepa original del mismo. Los ejemplos ilustrativos de dichas cepas incluyen TKT6/pPH8 de *Corynebacterium glutamicum*.

50 Puede obtenerse una cepa capaz de producir riboflavina en una cantidad considerable introduciendo un plásmido recombinante que contiene un gen para la biosíntesis de riboflavina, tal como pFM41, en *Corynebacterium glutamicum* en el que la actividad de transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con una cepa original del mismo. Los ejemplos ilustrativos de dichas cepas incluyen TKT6/pFM41 de *Corynebacterium glutamicum*.

55 Puede obtenerse también una cepa capaz de producir riboflavina en una cantidad considerable introduciendo un plásmido recombinante que contiene un gen para la biosíntesis de riboflavina, tal como pFM201, en *Escherichia coli* en el que la actividad de transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con una cepa original del mismo. Los ejemplos ilustrativos de dichas cepas incluyen AI80/pFM201 de *Corynebacterium glutamicum*.

60 Una cepa con productividad mejorada de un metabolito de interés puede obtenerse también utilizando los procedimientos de mutación siguientes.

65 Es decir, el procedimiento para producir inosina en el que se crean la auxotrofia de la adenina y la resistencia al análogo púrico [*Hakko to Kogyo* (Fermentation and Industry), 36, 12, 1036-1048 (1978)], el procedimiento para

ES 2 349 620 T3

producir ácido inosínico en el que se crean la auxotrofia de adenina y guanina y la propiedad insensible al manganeso [Applied Microbiology, editado por Shoichi Takao *et al.*, Buneido Shuppan (1996)], el procedimiento para producir guanosina en el que se crean la auxotrofia de la adenina y la histidina y la resistencia contra el sulfóxido de metionina, la psicofuranina y la deconina [Applied Microbiology, editado por Shoichi Takao *et al.*, Buneido Shuppan (1996)], el procedimiento para producir nucleósidos pirimidínicos tales como la uridina y la citidina en los que se crea la resistencia contra un análogo pirimidínico [Bioindustry, 12, 6, 36-43 (1995)], el procedimiento para producir bases tales como adenina y uracilo, en el que se crea la resistencia contra un análogo púrico tal como 2-fluoroadenina [Nippon Nogei Kagaku Kaishi (Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan) 48, 1, 63-68 (1974) el mismo diario, 52, 3, 129-133 (1978)], y el procedimiento para producir L-histidina en el que se crea la resistencia contra un análogo de histidina tal como 2-tiazolalanina o 1,2,4-triazolalanina [Amino Acid Fermentation, editado por Hiroshi Aida *et al.*, Gakkai Shuppan Center (1986)].

Mejorando un microorganismo en el que la actividad de transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación a una cepa original del mismo, haciendo uso de estos procedimientos conocidos, puede obtenerse una cepa con productividad mejorada de un metabolito de interés.

Uno o diversos metabolitos seleccionados de entre metabolitos biológicamente sintetizados a partir de PRPP en la serie de reacciones metabólicas puede producirse cultivando el microorganismo de la presente invención en un medio, efectuando de este modo la formación y acumulación de dichos metabolitos en el caldo de cultivo, y posteriormente recuperando dichos metabolitos del mismo.

El cultivo del microorganismo de la presente invención puede realizarse según un procedimiento de cultivo utilizado generalmente.

El medio que ha de utilizarse puede ser un medio sintético o un medio natural, con la condición de que contenga cantidades apropiadas de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sustancias inorgánicas, aminoácidos y vitaminas necesarias, así como cantidades insignificantes de sustancias nutrientes requeridas por la cepa que ha de utilizarse. Cuando la cepa que ha de utilizarse necesita ácido shikímico para su desarrollo en el medio que ha de utilizarse, se añade una pequeña cantidad de ácido shikímico al medio. El mismo objetivo puede conseguirse añadiendo pequeñas cantidades de los tres aminoácidos aromáticos en lugar de ácido shikímico.

Los ejemplos de la fuente de carbono que debe utilizarse incluyen carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, glicerol, almidón, hidrolizado de almidón y molasas, polialcoholes y varios ácidos orgánicos tales como ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido láctico y ácido acético. Dependiendo de la capacidad de asimilación del microorganismo, pueden utilizarse también hidrocarburos y alcoholes.

Los ejemplos de fuente de nitrógeno incluyen amoniaco o varias sales de amonio inorgánico y orgánico, tal como cloruro de amonio, sulfato de amonio, carbonato de amonio y acetato de amonio, urea y otras sustancias que contienen nitrógeno, y sustancias orgánicas que contienen nitrógeno tales como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, jarabe de maíz fermentado, hidrolizado de caseína y pescado o un extracto de los mismos.

Los ejemplos de sustancia inorgánica incluyen fosfato dibásico de potasio, fosfato monobásico dipotásico, sulfato de amonio, cloruro de amonio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso y carbonato de calcio.

Pueden añadirse aminoácidos y vitaminas al medio según requiera la ocasión dependiendo de la fuente de carbono, de la fuente de nitrógeno y de otras sustancias utilizadas en la presente.

El cultivo se lleva a cabo en condiciones aeróbicas tal como cultivo en agitación o cultivo en agitación por aireación. En general, el cultivo se lleva a cabo a una temperatura preferentemente entre 20 y 40°C, es deseable mantener el pH del medio aproximadamente neutro. El cultivo se lleva a cabo generalmente en un período de 1 a 5 días.

El metabolito de interés formado y acumulado en el medio de cultivo puede recuperarse por el procedimiento siguiente.

Las células se retiran después de la finalización del cultivo, y el metabolito de interés se recupera por un procedimiento conocido tal como un procedimiento de cristalización por concentración, un procedimiento de tratamiento en carbón activado o un procedimiento con resina de intercambio iónico, véase "Bioseparation Process Manual", Isao Endo *et al.*, The Society of Chemical Engineers (editado) Kyoritsu Shuppan (1996).

A continuación se proporcionan ejemplos de la presente invención a título ilustrativo y no limitativo.

Ejemplo 1

Preparación de un mutante de *Corynebacterium glutamicum* carente de transcetolasa

Se inoculó L22 de *Corynebacterium glutamicum* [un mutante sensible a la lisozima procedente de una cepa ATCC 31833; R. Katsumata *et al.*, Proc. 4th Eur. Congr. Biotechnol., 4, 767 (1987)] se inoculó en 3 ml de medio NB (medio

ES 2 349 620 T3

preparado disolviendo 20 g de caldo en polvo y 5 g de extracto de levadura en 1 l de agua y ajustando el pH del medio a 7,2) y cultivado a 30°C hasta que la DO₆₆₀ sea aproximadamente 0,6.

5 Después del cultivo se recogieron las células por centrifugación, se lavaron una vez con tampón de ácido Tris-maleico 50 mM (pH 6,0) y a continuación se sometieron a 20 minutos de tratamiento de mutación a temperatura ambiente en 3 ml del mismo tampón que contenía 400 mg/l de NTG.

10 Las células tratadas se lavaron dos veces por centrifugación utilizando el mismo tampón y a continuación se cultivaron a 30°C durante 1 hora en 3 ml del medio NB.

10 El caldo de cultivo obtenido de este modo se diluyó por un factor de 10⁻⁵ a 10⁻⁶ con solución salina fisiológica y 0,1 ml del caldo de cultivo diluido se extendió en un medio NB de agar-agar (medio NB que contenía 1,4% de agar-agar, pH 7,2) y se cultivó a 30°C durante 2 días.

15 Cada una de las colonias cultivada en el medio de agar-agar se extendió y se cultivó en un medio M1 mínimo de agar-agar [medio preparado disolviendo 10 g de glucosa, 1 g de (NH₄)H₂PO₄, 0,2 g de KCl, 0,2 g de MgSO₄·7H₂O, 10 mg de FeSO₄·7H₂O, 0,2 mg de MnSO₄·4-6H₂O, 0,9 mg de ZnSO₄·7H₂O, 0,4 mg de CuSO₄·5H₂O, 0,09 mg de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,04 mg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 50 mg de biotina, 2,5 mg de ácido p-aminobenzoico, 1 mg de hidrocloreuro de tiamina y 16 g de agar-agar en 1 l de agua y ajustando el pH del medio a 7,2] y el medio M1 con agar-agar se enriqueció con 50 mg/l de ácido shikímico.

20 Las cepas que no pudieron desarrollarse en el medio M1 mínimo con agar-agar pudieron desarrollarse en el medio M1 con agar-agar que contenía 50 mg/l de ácido shikímico se aislaron como mutantes auxótrofos de ácido shikímico.

25 Cada mutante auxótrofo de ácido shikímico aislado de este modo se extendió y se cultivó en un medio M1 con agar-agar que contenía 50 mg/l de ácido shikímico y un medio en el que la glucosa en dicho medio fue sustituida por ribosa.

30 Las cepas pudieron desarrollarse en el medio M1 de agar-agar que contenía 50 mg/l de ácido shikímico pero que no pudieron desarrollarse en el medio en el que la glucosa en dicho medio estaba sustituida por ribosa se aislaron como mutantes auxótrofo por ácido shikímico y no asimilantes de ribosa.

35 Cada mutante auxótrofo por ácido shikímico y no asimilante de ribosa obtenido de este modo se cultivó en el medio M1 que contenía 50 mg/l de ácido shikímico, y las células cultivadas se recuperaron por centrifugación y se sometieron a un procedimiento de disgregación ultrasónica conocido para preparar una solución enzimática en bruto [M. Ikeda y R. Katsumata, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 781-785 (1992)].

40 Utilizando la solución enzimática en bruto preparada de este modo se midió la actividad de la transcetolasa de la siguiente manera.

45 La solución enzimática en bruto se añadió a una solución de reacción que contenía 50 mM de Tris (pH 7,5), 0,2 mM de NADH, 0,01 mM de pirofosfato de tiamina, 1 mM de MgCl₂, 0,5 mM de xilosa 5-fosfato, 0,5 mM de ribulosa 5-fosfato y 20 mg de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa/triosa-fosfato isomerasa y 20 mg de una solución mixta de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa/triosa-fosfato isomerasa (producida por Boehringer-Mannheim) y la mezcla resultante en un volumen total de 1,5 ml se sometió a la reacción a 30°C.

La cantidad de gliceraldeído-3-fosfato formado se determinó midiendo la absorbancia disminuida de NADH a 340 nm.

50 Mediante este ensayo enzimático, se seleccionó un mutante TKT6 con insuficiente actividad de transcetolasa incapaz de formar gliceraldeído 3-fosfato a partir de las cepas mutantes que presentan auxotrofia de ácidos shikímico y sin capacidad de asimilación de ribosa.

55 TKT6 de *Corynebacterium glutamicum* se depositó el 30 de junio de 1998, en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Higashi 1-1-3, Tsukuba, Ibaraki, Japón (Código Postal: 305-0046) bajo el Tratado de Budapest como FERM BP-6399.

60 Ejemplo 2

Aislamiento de transcriptores no auxótrofos del ácido shikímico

65 La cepa TKT6 se cultivó a 30°C durante 24 horas en 3 ml de medio NB. Después, del cultivo, se recogieron las células por centrifugación. Se lavaron las células tres veces por centrifugación utilizando solución salina fisiológica y a continuación se pusieron en suspensión en solución salina fisiológica hasta una densidad celular de aproximadamente 10⁹/ml.

ES 2 349 620 T3

Una parte de 0,1 ml de la suspensión celular se extendió en el medio M1 de agar-agar y se cultivó a 30°C durante 3 días. Las cepas capaces de desarrollarse en el medio M1 de agar-agar se aislaron como transcriptores no auxótrofos del ácido shikímico.

5 Se observó que las propiedades de cada transcriptor no auxótrofo con ácido shikímico, incluyendo la propiedad de asimilación de ribosa y la actividad de transcetolasa, se restablecieron para los de tipo natural.

Este resultado indica que tanto los caracteres de auxotrofia del ácido shikímico como la propiedad de no asimilación de ribosa se producen debido a la carencia de actividad de la transcetolasa.

10 Uno de los transcriptores no auxótrofos con ácido shikímico obtenido de este modo (cepas transcritas de mutación por eliminación de transcetolasa) se denominó REV3.

15 Ejemplo 3

Producción de adenina por el mutante carente de transcetolasa de Corynebacterium glutamicum

20 La producción de adenina por L22, TKT6 y REV3 de *Corynebacterium glutamicum* se llevó a cabo de la siguiente manera.

Cada una de las aproximadamente tres cepas se inoculó en 3 ml de medio NB enriquecido con 10 g/l de glucosa y se cultivó a 30°C durante 20 horas.

25 Una parte de 0,1 ml de cada caldo de cultivo obtenido de este modo se inoculó en un tubo de ensayo grande que contenía 5 ml de medio M1 enriquecido con 100 mg/l de ácido shikímico y se cultivó en un vibrador a 30°C durante 24 horas.

30 Cada caldo de cultivo obtenido de este modo se filtró, y la cantidad de adenina formada en el filtrado resultante se determinó midiendo la absorbancia a 254 nm utilizando una columna HPLC de intercambio iónico (Shodex Asahipak GS-320 7E, producida por Asahi Chemical Industry).

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

35

TABLA 1

Cepa	Adenina (mg/l)
L22	0
TKT6	117
REV3	0

45

Solamente la cepa TKT6 carente de actividad de transcetolasa segregó y acumuló adenina en el medio de cultivo.

50 Debido a que el REV3 transcrito de transcetolasa obtenido a partir de TKT6 de nuevo pierde la capacidad para producir adenina, es obvio que la formación de adenina por TKT6 se atribuye a la carencia de transcetolasa.

Ejemplo 4

Producción de L-histidina por el mutante con carencia de transcetolasa de Corynebacterium glutamicum

55 Con el fin de examinar el efecto de la carencia de transcetolasa en la producción de histidina por *Corynebacterium glutamicum*, se introdujo un plásmido recombinante pPH8 que contenía el gen de biosíntesis de histidina en las cepas L22, TKT6 y REV3 para mejorar su productividad de histidina, y se compararon las cantidades de histidina producidas por las tres cepas.

60

El plásmido pPH8, es un plásmido con un marcador con resistencia a la espectinomicina, en el que un fragmento de ADN de aproximadamente 10,6 kb que tiene un gen que tiene que ver con la biosíntesis de histidina en *Corynebacterium glutamicum* se inserta en la secuencia *Bgl*II del vector plásmido pCG11 de *Corynebacterium glutamicum*.

65

La cepa de *Corynebacterium glutamicum* que lleva pPH8 se ha depositado en American Type Culture Collection, USA: como K32 de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 39281).

ES 2 349 620 T3

El plásmido pPH8 puede aislarse de la cepa ATCC 39281 por un procedimiento convencional de lisis con álcali [J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)].

5 La introducción pPH8 en las cepas L22, TKT6 y REV3 puede llevarse a cabo por un procedimiento con protoplastos generalmente utilizados en bacterias corineformes [R. Katsumata *et al.*, *J. Bacteriol.*; 159, 306-311 (1984)] o por un procedimiento de electroporación (voltaje 2,5 kV, capacidad eléctrica 25 mF, resistencia 200 W) [J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] utilizando un aparato pulsador de genes (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) y se utilizó el procedimiento con protoplastos en esta prueba.

10 La producción de histidina por las cepas L22, TKT6 y REV3 que tienen pPH8 se realizó de la manera siguiente.

15 Cada una de estas tres cepas se inoculó en 3 ml de un medio de cultivo con semillas S5 (medio preparado disolviendo 20 g de glucosa, 15 g de polipeptona, 15 g de extracto de levadura, 2,5 g de NaCl y 1 g de urea en 1 l de agua y ajustando la solución a pH 7,2) enriquecido con 100 mg/l de espectinomicina y la misma cantidad de ácido shikímico y se cultivó en un vibrador a 30°C durante 24 horas.

20 Una fracción de 0,5 ml de cada cultivo obtenido de este modo se inoculó en un tubo de ensayo grande que contenía 5 ml de un medio de producción P1 (medio preparado disolviendo 60 g de glucosa, 1 g de KH₂PO₄, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 20 g de (NH₄)₂SO₄, 5 g de jarabe de maíz fermentado, 10 mg de MnSO₄, 30 mg de biotina y 20 g de CaCO₃ en 1 l de agua y ajustando la solución a pH 7,2) que se ha enriquecido con 100 mg/l de espectinomicina y 200 mg/l de ácido shikímico y cultivado en un vibrador a 30°C durante 72 horas.

25 Cada caldo de cultivo obtenido de este modo se filtró, y la cantidad de L-histidina formada en el filtrado resultante se determinó por el método de formación de derivados en la columna OPA post [*Anal. Chem.*, 51, 1338 (1979)] utilizando HPLC.

Los resultados se presentan en la Tabla 2.

30 TABLA 2

Cepa	L-Histidina (g/l)
L22/pPH8	1,6
TKT6/pPH8	3,1
REV3/pPH8	1,6

35 La cantidad de L-histidina producida por TKT6/pPH8 es aproximadamente dos veces superior que la de L22/pPH8. Por otra parte, la cantidad L-histidina producida por REV3/pPH8 está al mismo nivel que la de L22/pPH8, así que es evidente que la mejora de productividad de L-histidina en TKT6/pPH8 se atribuye a la carencia de transcetolasa.

Ejemplo 5

45 Producción de rivo flavina por el mutante con carencia de transcetolasa de *Corynebacterium glutamicum*

50 Con el fin de examinar el efecto de la carencia de transcetolasa en la producción de riboflavina por *Corynebacterium glutamicum*, se introdujo un plásmido recombinante pFM41 que contenía el gen de biosíntesis de riboflavina en las cepas L22, TKT6 y REV3 para mejorar su productividad de riboflavina, y se compararon las cantidades de riboflavina producidas por las tres cepas.

55 El plásmido pFM41, es un plásmido con un marcador con resistencia a la espectinomicina, en el que un fragmento de ADN de aproximadamente 4,2 kb que tiene un gen que tiene que ver con la biosíntesis de riboflavina en *Corynebacterium ammoniagenes* se inserta en la secuencia BgIII del vector plásmido pCG11 de *Corynebacterium glutamicum*.

60 La *Corynebacterium ammoniagenes* con pFM41 se ha depositado en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, como FM41 de *Corynebacterium ammoniagenes* (FERM BP-4003).

65 El aislamiento del plásmido pFM41 de la cepa FM41 y la introducción del pFM41 en las cepas L22, TKT6 y REV3 se llevó a cabo según los procedimientos descritos en el Ejemplo 4.

ES 2 349 620 T3

La producción de riboflavina por las cepas L22, TKT6 y REV3 que tienen pFM41 se realizó de la manera siguiente.

Cada una de las tres cepas se inoculó en 3 ml de un medio de cultivo con semillas S5 que se ha enriquecido con 100 mg/l de espectinomicina y la misma cantidad de ácido shikímico y se cultivó en un vibrador a 30°C durante 24 horas.

Una fracción de 0,5 ml de cada cultivo obtenido de este modo se inoculó en un tubo de ensayo grande que contenía 5 ml del medio de producción P1 enriquecido con 100 mg/l de espectinomicina y 200 mg/l de ácido shikímico y cultivado en un vibrador a 30°C durante 72 horas.

Cada caldo de cultivo obtenido de este modo se filtró, y la cantidad de riboflavina formada en el filtrado resultante se determinó midiendo las intensidades de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 530 nm y una longitud de onda de excitación de 450 nm utilizando una columna de HPLC en fase inversa (RP-18, producida por Merck).

Los resultados se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3

Cepa	Riboflavina (mg/l)
L22/pFM41	42
TKT6/pFM41	108
REV3/pFM41	40

La cantidad de riboflavina producida por TKT6/pFM41 es aproximadamente dos veces superior que la de L22/pFM41. Por otra parte, la cantidad de riboflavina producida por REV3/pFM41 está al mismo nivel que la de L22/pFM41, así que es evidente que la mejora de productividad de riboflavina en TKT6/pFM41 se atribuye a la carencia de transcetolasa.

Ejemplo 6

*Producción de riboflavina por el mutante de *Escherichia coli* con actividad reducida de transcetolasa*

Para examinar el efecto de la carencia de transcetolasa sobre la producción de riboflavina por *Escherichia coli*, se introdujo un plásmido pFM201 recombinante que contiene el gen de la biosíntesis de riboflavina en una cepa EJ500 de *Escherichia coli* y su cepa AI80 con carencia de transcetolasa para proporcionar las cepas con productividad de riboflavina, y se compararon las cantidades de riboflavina producida por ambas cepas recombinantes.

La cepa AI80 es una cepa con carencia de transcetolasa obtenida a partir de la cepa EJ500 (W3100 *cfs*) por inserción de Tn10, en la que su actividad de transcetolasa se redujo hasta aproximadamente 30% de la cepa original debido a la destrucción de uno de los dos genes de transcetolasa, el gen *tktA*, mediante la inserción de Tn10 [A. Iida *et al.*, *J. Bacteriol.*, **175**, 5375-5383 (1993)].

El plásmido pFM201 es un plásmido que tiene un marcador con resistencia a la ampicilina, en el que un fragmento de ADN que tiene un gen que tiene que ver con la biosíntesis de la riboflavina en *Corynebacterium ammoniagenes* se inserta en la secuencia corriente abajo del activador *lac* de pUC19 y se preparó según el procedimiento descrito en el documento JP-A-6-225776.

La introducción de pFM201 en las cepas EJ500 y AI80 se realizó por un procedimiento de electroporación habitual o por un procedimiento con calcio [J. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] y el procedimiento con calcio se utilizó en esta prueba.

La producción de riboflavina por las cepas EJ500 y AI80 que tienen pFM201 se realizó de la manera siguiente.

Cada una de las dos cepas se inoculó en 3 ml de un medio LB (medio preparado disolviendo 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en 1 l de agua y ajustando la solución a pH 7,2) que se ha enriquecido con 100 mg/l de ampicilina y se cultivó en un vibrador a 30°C durante 16 horas.

Una fracción de 0,1 ml de cada caldo de cultivo obtenido de este modo se inoculó en un tubo de ensayo grande que contenía 5 ml de un medio de producción P6 (medio preparado disolviendo 5 g de glucosa, 3 g de KH₂PO₄, 0,25 g de MgSO₄·7H₂O, 5 g de NaCl, 1 g de NH₄Cl 6 g de NaH₂PO₄ y 4 mg de hidrocloreuro de tiamina en 1 l de agua

ES 2 349 620 T3

y ajustando la solución a pH 7,2) que se ha enriquecido con 100 mg/l de ampicilina y la misma cantidad de ácido shikímico y cultivado en un vibrador a 37°C durante 24 horas.

5 La cantidad de riboflavina formada en los filtrados resultantes se determinó utilizando HPLC según el procedimiento descrito en el Ejemplo 5.

Los resultados se presentan en la Tabla 4.

10 TABLA 4

Cepa	Riboflavina (mg/l)
EJ500/pFM201	14
AI80/pFM201	25

15

20

La cantidad de riboflavina producida por AI80/pFM201 es aproximadamente 1,8 veces mayor que la de EJ500/pFM201, lo que demuestra que la productividad de la riboflavina se mejora al reducir la actividad de la transcetolasa.

25

Según la presente invención, se proporciona un procedimiento industrialmente más ventajoso para la producción de metabolitos biológicamente sintetizados a partir de PRPP, haciendo uso de cepas biológicamente modificadas en las que la actividad de la transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con la cepa original según las reivindicaciones 1 a 3.

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente japonesa n° Hei. 10-187992, presentada el 3 de julio de 1998.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la producción aumentada de metabolitos biológicamente sintetizados mediante pirofosfato de fosforribosilo en la serie de reacciones metabólicas en un microorganismo, comparada con la de una cepa original del mismo, que comprende

- 10 (a) aislar un microorganismo que es un ácido shikímico auxótrofo y no puede asimilar ribosa, y en el que la actividad de la transcetolasa es insuficiente o reducida 30% o más en comparación con la de una cepa original del mismo, en el que el microorganismo pertenece al género *Corynebacterium*, *Brevibacterium* o *Escherichia*;
- 15 (b) cultivar en un medio dicho microorganismo hasta que se forme y se acumule en el cultivo uno o una pluralidad de metabolitos seleccionados de entre los metabolitos biológicamente sintetizados a partir del pirofosfato de fosforribosilo en la serie de reacciones metabólicas; y
- (c) recuperar dichos metabolitos del mismo.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el metabolito es un nucleótido púrico, nucleótido pirimidínico, nucleósido púrico, nucleósido pirimidínico, base púrica, base pirimidínica, nucleótido de flavina, L-histidina y riboflavina.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho microorganismo es TKT6 de *Corynebacterium glutamicum*, TKT6/pPH8 de *Corynebacterium glutamicum*, TKT6/pFM41 de *Corynebacterium glutamicum* o AI80/pFM201 de *Escherichia coli*.

30 4. Microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium* o *Brevibacterium*, en el que la actividad de transcetolasa es insuficiente o reducida en comparación con una cepa original del mismo, en el que dicho microorganismo es TKT6 de *Corynebacterium glutamicum*, TKT6/pPH8 de *Corynebacterium glutamicum* o TKT6/pFM41 de *Corynebacterium glutamicum*.

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1

