



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 205**

51 Int. Cl.:

C12P 7/00 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99956926 .2**

96 Fecha de presentación : **04.11.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1151126**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2001**

54 Título: **Síntesis biocatalítica del ácido shikímico.**

30 Prioridad: **29.01.1999 US 240440**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.09.2011

73 Titular/es: **The Board of Trustees of the Michigan State University
238 Administration Building
East Lansing, Michigan 48824-1046, US**

72 Inventor/es: **Frost, John, W.;**
Frost, Karen, M. y
Knop, David, R.

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 365 205 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

Síntesis biocatalítica del ácido shikímico

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a la producción de ácido shikímico y más específicamente, a métodos de producir ácido shikímico de la bioconversión de una fuente de carbono.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] El ácido shikímico es un sintón quiral atractivo con su altamente funcionalizado anillo carbocíclico de seis eslabones y múltiples centros asimétricos. Un intermediario metabólico de biosíntesis de amino ácido aromático, el ácido shikímico se ha convertido en un material de partida quiral esencial en la síntesis de los inhibidores de la neuraminidasa efectivo en el tratamiento de la gripe. Kim, C.U. y otros, J. Am. Chem. Soc. 119:681 (1997); Rohloff, J.C. y otros, J. Org. Chem 63:4545 (1998). El quiral, así como los químicos aromáticos, pueden también ser sintetizados del ácido shikímico. Por ejemplo, el ácido catalizado de la deshidratación del ácido shikímico proporciona ácido p-hidroxibenzoico (Ekymann, J.F., Ver. Dtch. Chem. Ges. 24:1278 (1891)). El ácido p-hidroxibenzoico, que tiene una producción anual de 7×10^6 kg, es el precursor clave de los parabenos y un monómero utilizado en la síntesis de polímeros de cristal líquido. El ácido shikímico también ha sido utilizado recientemente como el punto de partida para la síntesis de un gran catálogo combinacional de moléculas. Tan, D.S. y otros, J. Am. Chem. Soc. 120:8565 (1998).

20 [0003] El ácido shikímico es obtenido por procesos de aislamiento multi-paso tediosos de plantas. Desafortunadamente, el aislamiento actual del ácido shikímico de la fruta de las plantas *Illicium* (Haslem, E., Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites, Wiley & Sons, New York, pp. 40-42 (1993)) imposibilita su uso en síntesis a nivel de kilogramo.

[0004] Por lo tanto, sería deseable proporcionar un método para producir grandes cantidades de ácido shikímico. También sería deseable si tal método fuese rentable, utilizando materiales de partida baratos. Sería además deseable que el método emplease compuestos no tóxicos y que fuese medioambientalmente benigno.

25 [0005] La WO 96/34961 describe métodos para mejorar el flujo de carbono en un sistema de una célula huésped para mejorar la producción biosintética de compuestos de la misma, siendo las células huésped seleccionadas en base a ser fenotípicamente Pts^- /glucosa⁺. Tales células huésped son capaces de transportar glucosa sin consumir fosfoenolpiruvato, resultando en la conservación del fosfoenolpiruvato que puede ser redirigido al sistema para mejorar la producción de los compuestos deseados a lo largo del sistema. Se ha demostrado que los mutantes Pts^- /glucosa⁺ son ventajosos para la producción mejorada de amino ácidos aromáticos.

35 [0006] La WO 94/14955 revela una eficiencia de producción mejorada de compuestos aromáticos por el sistema común de una célula huésped. Es realizada aumentando la expresión de las especies de enzimas que actúan en intermediarios de sustrato en pasos de reacción limitadores de la velocidad identificados en el sistema. Los transformantes de células procariontas son descritos comprendiendo secuencias de ADN exógeno codificando las especies de enzimas, 3-deshidroquinata sintasa, shikimato kinasa, 5-enolpiruvato-shikimato-3-fosfato sintasa y corismato sintasa. Estos transformantes pueden ser además transformados con secuencias de ADN exógeno codificando las especies de enzimas transcetolasa y DAHP sintasa. En una realización, una o más de las secuencias de ADN que codifican las especies de enzimas son incorporadas en el genoma del transformante.

40 [0007] La US-A-5798236 revela métodos para la síntesis de compuestos orgánicos quinoideos de una fuente de energía renovable, como la glucosa. El método comprende mejorar la cantidad de equivalentes de glucosa introducidos en el sistema, bloqueando el sistema común para acumular deshidroquinata y convirtiendo la deshidroquinata en ácido quínico.

45 [0008] La publicación de Kikuchi y otros.: Mutational analysis of the feedback sites of phenylalanine-sensitive 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase of Escherichia coli." Appl. Environ. Microbiol. Vol. 63, nº 2, Febrero 1997, páginas 791-762, XP002927102 revela que en la Escherichia coli, el aroF, aroG, y aroH codifican isoenzimas 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa que son inhibidos por retroalimentación por la tirosina, fenilalanina, y triptófano, respectivamente. La mutagénesis química in vitro de los genes aroG clonados es usada para identificar residuos y regiones de polipéptidos esenciales para la inhibición por retroalimentación de la fenilalanina.

50 [0009] La publicación de Whipp et al.: "A reassessment of the relations between aroK- and aroL-encoded shikimate kinase enzymes of Escherichia coli", Journal of Bacteriology, vol. 177, nº 6, Marzo 1995, páginas 1627-1629, XP002927103 revela que en el transcurso de la secuenciación de los genes aroK, se encontraron un número de errores en la secuencia publicada. LA secuencia corregida altera la longitud de la región codificante del aroK de tal forma que las proteínas aroK y aroL son ahora de una longitud comparable y la homología entre ellas aumenta la longitud total de los dos enzimas.

55

RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] Se proporciona un esquema de síntesis de bioingeniería para la producción de ácido shikímico de una fuente de carbono. Los métodos de bioconversión de la presente invención comprenden la conversión por catalizado de microbios de una fuente de carbono a ácido shikímico. Como se muestra en el esquema de síntesis de la Figura 1, el paso de conversión por catalizado de microbios de la presente invención requiere cuatro enzimas que pueden ser proporcionados por un microbio recombinante. El microbio recombinante es la *Escherichia coli* diseñada para causar la reducción de la 3-deshidroshikimato a ácido shikímico y para inhibir cualquier conversión adicional de ácido shikímico a lo largo del sistema biosintético de amino ácido aromático.

[0011] El método de síntesis biocatalítica para el ácido shikímico proporcionado en la presente, se cree que es medioambientalmente benigno, económicamente atractivo, y utiliza abundantes fuentes renovables como material de partida.

[0012] Se harán evidentes objetos, ventajas, y características adicionales de la presente invención de la siguiente descripción y las reivindicaciones añadidas, tomadas en conjunción con los dibujos acompañantes.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0013] Las ventajas varias de la presente invención se harán evidentes para alguien experto en la materia leyendo la especificación siguiente y las reivindicaciones adjuntas haciendo referencia a los siguientes dibujos en los que:

La Figura 1 es una ilustración esquemática del esquema de síntesis de bioingeniería de la presente invención para producir ácido shikímico; y

La Figura 2 es un gráfico que muestra el equilibrio de los ácidos shikímico y quínico catalizado por SP1.1/pKD12.112.

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

[0014] Se proporciona en la presente un esquema de síntesis de bioingeniería para la producción de ácido shikímico de una fuente de carbono. También se proporcionan los métodos para producir ácido shikímico de una fuente de carbono en base al esquema de síntesis.

[0015] Se proporciona un método en donde la fuente de carbono es convertida en ácido shikímico por un microbio recombinante. La manipulación del sistema biosintético del amino ácido aromático común del microbio resulta en una producción significativa de ácido shikímico cuando el microbio recombinante es cultivado en presencia de una fuente de carbono. La fuente de carbono es convertida en 3-desoxi-D-arabino-heptulosanato-7-fosfato (DAHP) que es posteriormente convertido por 3-deshidroquinata sintasa en 3-deshidroquinata (DHQ) que es después deshidratada en 3-deshidroshikimato (DHS) por 3-deshidroquinata deshidratasa (c, Figura 1). El 3-deshidroshikimato es convertido en ácido shikímico por deshidrogenasa de shikimato (d, Figura 1). El metabolismo del ácido shikímico puede ser impedido bloqueando o impidiendo la actividad quinasa del shikimato (e, f, Figura 1), permitiendo por tanto la acumulación de cantidades significativas de ácido shikímico. En una realización preferida, el microbio será incapaz de reabsorber el ácido shikímico del medio debido a una mutación en la captación de shikimato (shiA). Por lo tanto, una vez formado, el ácido shikímico no puede ser convertido en ácido quínico o cualquier otra molécula en el sistema.

[0016] Los métodos de bioconversión de la presente invención son llevados a cabo bajo condiciones de tiempo, temperatura, pH, tipo de nutriente y concentración, condiciones de aireación, y concentraciones de glucosa controladas, para proporcionar la máxima conversión de la fuente de carbono en ácido shikímico. Como se describe en detalle en los Ejemplos Específicos, en una realización preferida, se usa un fermentador alimentado por lotes para convertir la fuente de carbono en ácido shikímico, seguido por el aislamiento del ácido shikímico del caldo de fermentación por cromatografía de intercambio iónico. El proceso del fermentador por lotes y los métodos de cromatografía son conocidos por aquellos expertos en la materia.

[0017] Como se usa en la presente, la frase "fuente de carbono" se entiende que incluye fuentes de carbono derivadas de biomasa incluyendo, pero no limitado a, xilosa, arabinosa, glicerol, glucosa y los intermediarios en el ciclo de Krebs (por ejemplo, ácidos dicarboxílicos), ya sea por sí solos o en combinación. En una realización preferida, la fuente de carbono es glucosa. La fuente de carbono puede ser derivada de fuentes renovables como, sin limitación, maíz, remolachas azucareras, caña de azúcar.

[0018] El microbio recombinante empleado en los métodos de la presente invención es el *E. coli*. En una realización preferida el *E. coli* comprende un casete de aroB insertado en el locus serA y la disrupción de los loci aroL y aroK (e y f, Figura 1). Este *E. coli* recombinante puede además comprender un inserto de genes aro^{FBR}, aroE y serA transportando plásmido. El ácido shikímico se acumula debido a la ausencia de los isoenzimas codificados aroL- y aroK de la kinasa de shikimato mientras la segunda copia del aroB aumenta la actividad catalítica de la 3-deshidroquinata sintasa. Dell, K.A. y otros, J. Am. Chem. Soc. 115:11581 (1993). Se apreciará, sin embargo, que las

mutaciones de los loci *aroL* y *aroK* no son esenciales y son empleadas para proporcionar mayor producción de ácido shikímico.

5 **[0019]** En una realización preferida, el *E. coli* recombinante comprende pKD12.112 plásmido transportando insertos *aro*^{FBR}, *serA* y *aroE*. El inserto de genes *aro*^{FBR}, codifica un isoenzima mutante 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa (a, Figura 1) insensible a la inhibición por retroalimentación por amino ácidos aromáticos u otras moléculas aromáticas que aumentan el flujo de carbono en el sistema biosintético de amino ácido aromático común. La deshidrogenasa de shikimato amplificada resultante de la expresión de *aroE* compensa la inhibición por retroalimentación del enzima por el ácido shikímico. Pittard, J. y otros, *J. Bacteriol.*, 92:1070 (1966); Brown, K.D. y otros, *Biochim. Biophys. Acta.* 428:550 (1976). Debido a una mutación en el Locus *serA* genómico del *E. coli* requerido para la biosíntesis de L-serina, el crecimiento en un medio de sales mínimo y el mantenimiento plásmido sigue de la expresión del *serA* plásmido-localizado. El inserto *serA* plásmido por lo tanto permite el crecimiento microbiano en el medio de sales mínimo, distingüendo los microbios.

10 **[0020]** En otra realización, el *E. coli* comprende el pKD12.138 plásmido. Este plásmido se deriva de y lleva los mismos insertos de genes que el pKD12.112 así como un inserto de genes *tktA* codificados de transcetolasa. La transcetolasa cataliza la formación de D-eritrosa 4-fosfato, un fosfato aldosa inestable mantenido típicamente en concentraciones prácticamente nulas en la célula. La expresión elevada de transcetolasa proporciona D-eritrosa 4-fosfato adicional para la condensación posterior con el fosfoenolpiruvato para formar 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato el primer intermediario comprometido de la biosíntesis de amino ácidos aromáticos.

15 **[0021]** En otra realización, los genes *aro*^{FBR}, *serA*, y/o *aroE* son insertados directamente en el genoma de la célula huésped. De esta forma no se requerirá un plásmido para la producción de ácido shikímico del tal microbio recombinante.

20 **[0022]** Ejemplos de los anteriormente descritos microbios recombinantes preferidos de la presente invención, *E. coli*, SP1.1/pKD12.112, SP2.1/pKD12.112, SP1.1/pKD12.138 y SP2.1/pKD12.138 son descritos en el Ejemplo Específico 1 y han sido depositados en la American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20582, bajo los términos del Tratado de Budapest, y se les otorgaron los números de designación ATCC 98905, 98903, 207055 y 207054, respectivamente. El depósito se mantendrá en el depósito de la ATCC, que es un depósito público, durante un periodo de 20 años, o 5 años tras la solicitud más reciente, o durante la vida efectiva de la patente, lo que sea más largo, y será reemplazado si el depósito se agota o se vuelve no viable durante ese periodo. Las muestras del depósito estarán disponibles al público y se retirarán todas las restricciones impuestas sobre el acceso al depósito tras la concesión de una patente en esta solicitud.

25 **[0023]** La tabla siguiente expone los cuatro enzimas requeridos para la conversión de glucosa en ácido shikímico, los genes codificando el mismo y el origen de los genes en los microbios recombinantes ejemplares de la presente invención.

35

TABLA 1

Enzima ⁺	Genes (origen)
a) 3-desoxi-D-arabino-ácido heptulosónico 7-fosfato sintasa	<i>aro</i> ^{FBR} (plásmido)
b) 3-deshidroquinata sintasa	<i>aroB</i> (copia adicional insertada en el genoma)
c) 3-deshidroquinata deshidratasa	<i>aroD</i> (genoma)
d) 3-deshidroshikimato deshidrogenasa	<i>aroE</i> (plásmido)
⁺ Los enzimas a)-d) corresponden a a-d de la Figura 1.	

40 **[0024]** A pesar de que el *E. coli* es descrito específicamente en la presente como el microbio para llevar a cabo los métodos de la presente invención, se apreciará que cualquier microorganismo como los de los tipos comunes citados en la bibliografía y conocidos por aquellos expertos en la materia, pueden ser empleados, siempre que el microorganismo pueda ser alterado para efectuar la conversión deseada, por ejemplo, fuente de carbono a ácido shikímico. Por lo tanto, está previsto que muchos tipos de hongos, bacterias y levaduras funcionarán en los métodos de la presente invención. Tales microorganismos pueden ser desarrollados, por ejemplo, a través de procesos de selección, mutación y/o transformación genética con la capacidad característica y necesaria de convertir un constituyente del esquema de síntesis de la presente invención en otro. Los métodos para tal desarrollo son bien conocidos para los profesionales expertos.

45 **[0025]** Para llevar a cabo los métodos de bioconversión de la presente invención, se pone en contacto una solución conteniendo una fuente de carbono con el microbio recombinante para formar una mezcla de bioconversión que es mantenida bajo las condiciones apropiadas para promover la conversión de la fuente de carbono en el constituyente deseado, por ejemplo, ácido shikímico. En una realización preferida, la mezcla de bioconversión es mantenida a una temperatura de 30° C a 37° C y a un pH de 6,5 a 7,5. Se prefiere que la mezcla de bioconversión también contenga otras sustancias necesarias para promover la vitalidad de los microbios recombinantes como sales minerales, reguladores, cofactores, sustancias nutrientes y similares. La mezcla de bioconversión es mantenida preferiblemente

50

55

bajo condiciones de glucosa limitada. En una realización preferida, la tasa de adición de glucosa es determinada por el nivel de concentración de oxígeno disuelto. Un estado estable preferido sobre el curso de fermentación es de 100 a 200 μmol de glucosa o una concentración de oxígeno disuelto del 5% al 35% de saturación de aire.

5 **[0026]** Los requisitos más generales para el mantenimiento de la vitalidad de los microorganismos son bien conocidos y los requisitos para mantener la vitalidad de los microorganismos específicos también son bien conocidos tal como se documenta en la bibliografía, o son por otra parte fácilmente determinados por aquellos expertos en la materia. El ácido shikímico puede entonces ser recuperado de la mezcla de bioconversión por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico) y además purificados por recristalización.

10 **[0027]** El cultivo de los microbios recombinantes de la presente invención no sólo produce ácido shikímico, si no también produce ácido quínico en el caldo de fermentación. Si la concentración de ácido quínico es demasiado alta, es difícil purificar el ácido shikímico fuera del ácido quínico. En una realización preferida, la proporción molar del ácido shikímico al ácido quínico en el caldo fermentador es tal que el ácido shikímico puede ser purificado fuera del ácido quínico. Preferiblemente la proporción molar será mayor que alrededor de 9. Más preferiblemente, la proporción molar será mayor que alrededor de 20 y más preferiblemente, será mayor que alrededor de 40.

15 **[0028]** En una realización, las proporciones molares del ácido shikímico al ácido quínico en el caldo fermentador son controladas controlando la concentración de la fuente de carbono durante la fermentación. Aunque no se desea estar atado por la teoría, se piensa que a menores concentraciones de la fuente de carbono; el ácido shikímico en el caldo del fermentador es recuperado por las células como una fuente de carbono alternativa y convertido en ácido quínico que es después secretado de vuelta en el caldo de fermentación. Aumentar la concentración de la fuente de carbono durante la fermentación inhibe esta recuperación de ácido shikímico y desciende o elimina el ácido quínico contaminante. Como un ejemplo no limitativo, aumentar la concentración de glucosa aumentando el K_c de 0,1 a 0,8 y así aumentando la tasa de adición de una solución de glucosa al 65% (w/v) durante la fermentación de SP1.1/pKD12.112, resultó en un aumento de la proporción molar de ácido shikímico a ácido quínico de 3,0 a 12, 0. T

20 **[0029]** La proporción molar de ácido shikímico a ácido quínico es controlada por la adición de análogos de glucosa no metabolizables (no hidrolizables) al medio de fermentación. Preferiblemente, el análogo de glucosa es glucopiranosido de metilo, preferiblemente presente en una concentración de entre alrededor de 0,1 mM y alrededor de 10mM. Más preferiblemente, está presente en una concentración de 0,5 a 1,0 mM. El glucopiranosido de metilo puede ser metil- α -glucopiranosido, metil- β -glucopiranosido, o una mezcla de los mismos. Como estos análogos son no hidrolizables, pueden ser añadidos solamente al principio de la fermentación.

25 **[0030]** Para demostrar más completamente las ventajas que surgen de la presente invención, se expone el siguiente ejemplo. Se debe entender que lo siguiente es a modo de ejemplo solamente y no pretende ser una limitación del ámbito de la invención.

EJEMPLO ESPECÍFICO 1

Creación De Plásmidos Y Cepas Huésped

35 **[0031]** Se originaron dos cepas huésped creadas de la biosíntesis de ácido shikímico de dos cepas de *E. coli* diferentes. El *E. coli* SP1.1 fue creado del RB791, una cepa que difiere del tipo salvaje W3110 por sólo una única mutación. Se creó un segundo productor de shikimato, *E. coli* SP2.1, de una cepa que poseía mutaciones caracterizadas y un número desconocido de mutaciones no caracterizadas. La SP2.1 fue creada del AB2848, un aislado de varias vueltas de mutagenesis química originalmente seleccionado para una mutación en el gen *aroD* codificante de deshidroquinata deshidratasa. La reacción de los dos organismos para la biosíntesis del ácido shikímico permitió la evaluación del efecto de varios parámetros de cultivo en diferentes antecedentes genómicos.

40 **[0032]** La creación del SP1.1 empezó con la inserción del *aroB* en el locus *serA* del RB791 por recombinación homóloga. Este suceso llevó a un *E. coli* con expresión de deshidroquinata sintasa aumentada mientras inactivaba la expresión de fosfoglicerato deshidrogenasa, un enzima necesario para la biosíntesis serina novo. La posterior transducción mediada por P1 de *aroL478::Tn10* y *aroK17::Cm^R* del *E. coli* AL0807 proporcionó SP1.1 en el que ambos isoenzimas de kinasa de shikimato están inactivos. La creación del SP2.1 procedió de manera similar pero requirió el paso adicional de la reintroducción de actividad de deshidroquinata deshidratasa al organismo. Tras la inserción del *aroB* en el locus *serA* de AB2848, la transducción mediado por P1 de una copia funcional del *aroD* en el genoma proporcionó un organismo capaz de la biosíntesis de amino ácido aromático pero no de la biosíntesis de serina. La posterior transducción mediada por P1 del *aroL478::Tn 10* y del *aroK17::Cm^R* del *E. coli* AL0807 proporcionó SP2.1.

45 **[0033]** El pKD12.112 plásmido es un vector basado en pSU-18 (aproximadamente de 15 a 20 copias por célula) que contiene genes codificando un isoenzima insensible de retroalimentación de 3-desoxi-D-Arabino-heptulosanato-7 fosfato sintasa (*aroF^{FBR}*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), fosfoglicerato deshidrogenasa (*serA*), y β -lactamasa (*Ap^R*). La expresión del *aroF^{FBR}*, *serA*, y β -lactamasa procede de sus respectivos promotores nativos mientras la expresión del *aroE* sucede de tanto su promotor nativo (designado *P_{aroE}*) como de su tac promotor híbrido fuerte (*P_{tac}*). La expresión aumentada de un isoenzima insensible de retroalimentación de 3-desoxi-D-arabino-heptulosanato-7-fosfato sintasa aumenta el porcentaje de metabolitos dirigidos en la biosíntesis de shikimato

mientras la expresión de deshidrogenasa de shikamato aumentada reduce el impacto de la inhibición de este enzima por el ácido shikímico, reduciendo de este modo la formación de subproducto de deshidroshikimato. La inclusión del serA en el pKD12.112 fuerza a las cepas huéspedes SP1.1 y SP2.1 a mantener el plásmido en el medio de cultivo careciendo del suplemento de serina. Finalmente, la inclusión del gen de β -lactamasa proporciona medios adicionales de presión selectiva para el mantenimiento plásmido en el SP1.1 y el SP2.1. La resistencia a la ampicilina, sin embargo, fue utilizada solo como una presión selectiva secundaria durante la preparación de los inoculantes de la fermentación. La ampicilina nunca fue añadida a los cultivos de fermentación.

[0034] El pKD12.138 plásmido fue preparado del pKD12.112 por la inserción de tktA codificante de transcetolasa. La transcetolasa cataliza la formación de D-eritrosa 4-fosfato, un fosfato aldosa inestable típicamente mantenido en concentraciones prácticamente nulas en la célula. La expresión elevada de la transcetolasa proporciona D-eritrosa 4-fosfato adicional para la posterior condensación con fosfoenolpiruvato para formar 3-desoxi-D-arabinoheptuloseonato-7-fosfato, el primer intermediario comprometido de la biosíntesis de amino ácido aromático. La expresión de transcetolasa aumentada aumenta tanto la tasa de formación como el título final del ácido shikímico.

EJEMPLO ESPECÍFICO 2

15 Síntesis Del Acido Shikímico De la Glucosa

I. Resultados

[0035] Cultivar SP1.1/pKD12.112 durante 42 h con $K_c = 0,1$ resultó en la síntesis de 27,2 g/L de ácido shikímico, 12,6 g/L de ácido quínico, y 4,4 g/L de ácido 3-deshidroshikimico (DHS). La acumulación de DHS reflejó la inhibición de retroalimentación del shikimato deshidrogenasa por el ácido shikímico. Draths, K.M. y otros, J. Am. Chem. Soc. 114:9725 (1992). En contraste, la biosíntesis del ácido quínico fue sorprendente dada la ausencia en el *E. coli* de deshidrogenasa de ácido quínico que cataliza 3-deshidroquinata y la interconversión del ácido quínico. El DHS fue fácilmente retirado calentando el caldo del fermentador para convertir el DHS en un ácido protocatóico que fue absorbido por carbono activo durante la decoloración. Desafortunadamente, la contaminación de ácido quínico fue superior a la que podía ser purificada del ácido shikímico por cristalización.

[0036] Minimizar la concentración citosólica del ácido 3-deshidroquinico pareció ser una estrategia razonable para reducir la contaminación por ácido quínico del ácido shikímico sintetizado por el *E. coli* SP1.1/pKD12.112. El gen aroD codificando la 3-deshidrouinate deshidratasa fue consecuentemente localizado en el pKD12.152A plásmido junto con el aroE, el aroF^{FBR}, y el serA. Sin embargo, la expresión amplificada acompañante de 3-deshidroquinata deshidratasa no redujo los niveles de contaminación del ácido quínico en el ácido shikímico sintetizado por el SP1.1/pKD12.152A bajo las condiciones del fermentador alimentado por lotes idénticas a las empleadas para el SP1.1/pKD12.112. Aunque no se desea estar atado por la teoría, estos resultados sugieren que la formación de ácido quínico puede no resultar de la biosíntesis de novo sino del equilibrio del ácido shikímico sintetizado inicialmente.

[0037] El equilibrio de los ácidos quínico y shikímico ha sido examinado anteriormente en extractos libres de células de *Klebsiella pneumoniae*. Mitsuhashi, S. y otros, Biochim. Biophys. Acta 15:268 (1954). Para ser relevante para la formación del ácido quínico en el *E. coli* SP1.1/pKD12.112, el sistema común debe ser capaz de operar *in vivo* al contrario de su dirección biosintética normal. Para probar esta posibilidad, se lavaron células SP1.1/pKD12.112 recogidas del fermentador tras 24 h, se resuspendieron en un medio de sales mínimo fresco conteniendo ácido shikímico, y después se agitaron. La formación del ácido quínico (barras sólidas, Figura 2) y ácido 3-deshidroshikimico (barras rayadas, Figura 2) junto con una disminución correspondiente en la concentración de ácido shikímico (barras transparentes, Figura 2) indicó que el SP1.1/pKD12.112 puede catalizar la formación del ácido quínico del ácido shikímico sintetizado inicialmente.

[0038] El posible papel del transporte del ácido shikímico del medio de cultivo al citoplasma microbiano durante el equilibrio observado señaló a una estrategia para minimizar la contaminación de ácido quínico. El transporte del ácido shikímico (Pittard, J. y otros, J. Bacteriol. 92:1070 (1966); Brown, K.D. y otros, Biochim. Biophys. Acta 428:550 (1976)) en el *E. coli* puede ser un vestigio evolutivo de una capacidad anterior para catabolizar los ácidos quínico y shikímico como fuentes únicas de carbono para el crecimiento y el metabolismo. Como la utilización de fuentes de carbono no de glucosa está a menudo sujeta a represión catabólica, aumentar la disponibilidad de D-glucosa puede reprimir el transporte del ácido shikímico minimizando de este modo la formación del ácido quínico.

[0039] La tasa de adición de D-glucosa, y por lo tanto la disponibilidad de D-glucosa, en todas las series de fermentación fue controlada por un ajuste derivado integral proporcional (PIS) ajustando la ganancia (K_c). Por ejemplo, la síntesis por *E. coli* SP1.1/pKD12.112 de la mezcla de los ácidos shikímico y quínico (Tabla 2) empleó un ajuste PID de $K_c = 0,1$. Aumentar la disponibilidad de glucosa aumentando el ajuste PID a $K_c = 0,8$ resultó (Tabla 2) en una drástica reducción en la formación del ácido quínico en toda la fermentación. Tras 42 h de cultivo, el *E. coli* SP1.1/pKD12.112 sintetizó 20,2 g/L de ácido shikímico, 4,6 g/L de DHS, y sólo 1,9 g/L de ácido quínico. Bajo condiciones idénticas el SP2.1/pKD12.112 sintetizó 37 g/L de ácido shikímico, 2,1 g/L de ácido quínico y 4,2 g/L de DHS. La disminución en los títulos sintetizados de ácido shikímico es consistente con el impacto conocido de disponibilidad aumentada de D-glucosa en la concentración y el rendimiento de la L-fenilalanina sintetizadas por el

E.coli. Konstantinov, K.B. y otros, J. Ferment. Bioeng. 70:253 (1990); Konstantinov, K.B. y otros, J. Ferment. Bioeng. 71:350 (1991). Más importante, la mejora de la proporción molar shikímico:quinato de 2,4:1 ($K_c = 0,1$) a 11,8:1 ($K_c = 0,8$) permitió que el ácido quínico fuese completamente retirado durante la cristalización del ácido shikímico.

TABLA 2

Productos sintetizados Por el Sp1.1/pKD12.112 *E.coli* Como Una Función de Parámetros de Tiempo y Adición de D-glucosa

	$K_c = 0,1$			$K_c = 0,8$		
	SA ^a	QA	DHS	SA	QA	DHS
12 h	1,1	0,0	0,3	1,0	0,0	0,2
18 h	5,3	2,5	1,2	3,1	0,0	0,6
24 h	11,4	5,7	2,2	6,4	0,8	1,2
30 h	17,1	8,3	2,7	10,9	1,3	2,2
36 h	23,1	10,8	4,2	15,7	1,8	3,5
42 h	27,2	12,6	4,4	20,2	1,9	4,6

^a Concentraciones en g/L de ácido shikímico, ácido quínico (QA), y ácido 3-deshidrosikímico (DHS),

[0040] Series de fermentación adicionales resultaron en rendimientos similares de ácido shikímico y proporciones de ácido shikímico a ácido quínico. Cuando la ganancia (K_c) para el control derivado integral proporcional para la alimentación de glucosa fue establecida en 0,1, tanto el SP1.1/pKD12.112 como el SP2.1/pKD12.112 sintetizaron mezclas no esperables de ácido shikímico y ácido quínico. El SP1.1/pKD12.112 consiguió una proporción molar de ácido shikímico a ácido quínico de 3,0 mientras el SP2.1/pKD12.112 consiguió una proporción molar de 5,0 (Tabla 3). Los intentos de obtener ácido shikímico puro de los caldos de cultivo con proporciones molares en este intervalo no fueron exitosos. A pesar de que la síntesis de subproducto DHS representa una pérdida en títulos del ácido shikímico, el DHS es fácilmente separado del ácido shikímico durante la purificación. La formación de DHS no fue un obstáculo para obtener ácido shikímico puro.

TABLA 3

Resumen de los resultados de Fermentación

Cepa	Modificación	K_c	SA ^a (g/L)	QA ^a (g/L)	DHS ^a (g/L)	Proporción Molar SA:QA
SP1.1/pKD12.112	---	0,1	38,2	12,4	6,5	3,0
SP1.1/pKD12.112	--	0,1	33,2	7,8	5,4	5,0
SP1.1/pKD12.112	K_c aumentado	0,8	20,2 ^b	1,9	4,6	12
SP2.1/pKD12.112	K_c aumentado	0,8	36,6 ^b	2,2	4,4	18
SP1.1/pKD12.112	Añadido M α DG (1mM)	0,1	40,3	0	5,3	>40
SP2.1/pKD12.112	Añadido M α DG (0,5 mM)	0,1	39,6	4,1	4,8	11
SP1.1/pKD12.138	Añadido M α DG (1mM); tktA	0,1	51,1	4,3	8,8	13
SP2.1/pKD12.138	Añadido M α DG (0,5 mM); tktA	0,1	No cambia la fase			

^a 48 h de cultivo excepto como anotado diferentemente

^b tras 42 h de cultivo

[0041] Cuando el control de ganancia la alimentación de glucosa fue aumentada de 0,1 a 0,8, se observó una mejora significativa en la proporción molar de ácido shikímico a ácido quínico. Aumentar el K_c a 0,8 resultó en una respuesta más fuerte por la bomba de glucosa cuando el nivel de oxígeno disuelto se desvía de su punto de referencia. Valores aumentados de K_c resultaron por lo tanto en mayores concentraciones de glucosa en estado de equilibrio en el medio de cultivo. Tras 42 h de cultivo con el K_c establecido a 0,8, el SP1.1/pKD12.112 sintetizó 20,2 g/L de ácido shikímico y sólo 1,9 g/L de ácido quínico para conseguir una proporción molar de 12 (Tabla 3). Una mejora comparable fue observada con el SP2.1/pKD12.112 que alcanzó una proporción molar de 18 sintetizando 36,6 g/L de ácido shikímico y 2,2 g/L de ácido quínico tras 42 h (Tabla 3). El ácido shikímico se purificó fácilmente del ácido quínico de los caldos de cultivo en los que la proporción molar excede de aproximadamente 9.

5 **[0042]** A pesar de que aumentar el K_c elimina efectivamente la formación de ácido quínico, estas series son extremadamente difíciles de controlar. Los niveles de oxígeno disuelto oscilan como un resultado directo de las oscilaciones en las tasas de alimentación de glucosa. Estas series deben ser monitorizadas estrechamente tras aproximadamente 36 h de la serie para evitar adiciones mayores, innecesarias de glucosa. Como las series pueden ser rutinariamente atendidas a lo largo de 42 h pero raramente por 48 h sin una pérdida de control, las series fueron terminadas tras 42 h. Aumentar la concentración de glucosa en estado de equilibrio en el caldo de cultivo también tuvo un impacto significativo en la tasa de producción de ácido shikímico para el SP1.1/pKD12.112. En la mayor ganancia, el SP1.1/pKD12.112 sintetizó 20,2 g/L de ácido shikímico tras 42 h, comparado con los 33 g/L en el mismo tiempo cuando la ganancia fue establecida en el valor más bajo. El efecto en la tasa de producción, sin embargo, no fue observado para el SP2.1/pKD12.112.

15 **[0043]** Una alternativa para aumentar el K_c para eliminar la formación de ácido quínico fue la adición de un análogo de glucosa no hidrolizable al caldo de fermentación. Se añadió Metil α -D-glucopiranosida (MaDG) al medio de fermentación al tiempo de la inoculación y la fermentación fue después llevada a cabo sin ningún ajuste adicional. La adición de 1 mM de MaDG a la fermentación de SP1.1/pKD12.112 resultó en la síntesis de 40,3 g/L de ácido shikímico (Tabla 3). El ácido quínico no fue detectado. A pesar de que se examinaron varias concentraciones, 1 mM de MaDG fue la concentración mínima que permitió la eliminación completa de la formación de ácido quínico. La adición de MaDG a cultivos de SP2.1/pKD12.112 también resultó en la eliminación del ácido quínico. Tras 48 h de cultivo en presencia de 0,5 mM de MaDG, el SP2.1/pKD12.112 (Tabla 3) sintetizó 39,6 g/L de ácido shikímico y 4,1 g/L de ácido quínico, resultando en una proporción molar de 11. Mayores concentraciones de MaDG no mostraron ninguna mejora adicional en la eliminación del ácido quínico.

25 **[0044]** Con las condiciones establecidas que eliminan adecuadamente la formación de ácido quínico sin comprometer significativamente el control, la atención se volvió a aumentar los títulos del ácido shikímico utilizando la sobreexpresión de transcetolasa. Cuando se cultivó en presencia de 1 mM de MaDG, el SP1.1/pKD12.138 sintetizó 51,1 g/L de ácido shikímico y 4,4 g/L de ácido quínico, permitiendo una proporción molar excediendo de 13 (Tabla 3). La expresión de transcetolasa resultó en un aumento del 25% en los títulos de ácido shikímico mientras mantuvo una proporción molar de ácido shikímico a ácido quínico que permite el aislamiento del ácido shikímico. La concentración del subproducto DHS también aumentó a 8,8 g/L, proporcionando un incentivo añadido para obtener una deshidrogenasa de shikimato insensible a la inhibición del ácido shikímico. Cuando el SP2.1/pKD12.138 fue cultivado bajo condiciones estándares, la fermentación nunca alcanzó el punto de cambio de fase. A 33° C el crecimiento del SP2.1/pKD12.138 fue lento y resultó en una producción significativa de acetato. Un pequeño aumento en la temperatura de cultivo aumentaría probablemente la tasa de crecimiento para evitar esta situación.

35 **[0045]** La síntesis microbiana del ácido shikímico como se describe en la presente puede reemplazar el aislamiento de su hidroaromático de las fuentes vegetales que tienen una utilidad sintética del ácido shikímico limitada. Al mismo tiempo la disponibilidad aumentada del ácido shikímico puede presagiar la utilización más amplia de este hidroaromático. El rendimiento máximo teórico de la síntesis microbiana del ácido shikímico es del 43% de la D-glucosa. Draths, K.M. y otros, J. Am. Chem. Soc. 117:2395 (1995). La comparación con los rendimientos obtenidos hasta ahora para la síntesis microbiana del ácido shikímico (14-22%) junto con la aparente falta de toxicidad de este hidroaromático con respecto a la biocatalización microbiana sugiere que los aumentos considerables en las tasas y los títulos son posibles. Tales mejoras junto con las economías de escala asociadas con grandes escalas de fermentación pueden incluso extender la utilización del ácido shikímico del sintón quiral a quiralidades desechables utilizables en la fabricación de químicos aromáticos de gran volumen.

II. Métodos

45 **[0046] General.** Para la cuantificación ^1H NMR de concentraciones de soluto, las soluciones fueron concentradas hasta la sequedad bajo presión reducida, concentradas hasta la sequedad una vez adicional de D_2O , y después redisueltas en D_2O conteniendo una concentración conocida de la sal de sodio de ácido 3-(trimetilsililo)propionico-2,2,3,3- d_4 (TSP) conseguido de Lancaster Synthesis Inc. Las concentraciones fueron determinadas por la comparación de las integrales correspondientes a cada compuesto con la integral correspondiente al TSP ($\delta=0,00$ ppm) en el ^1H NMR. Todos los espectros del ^1H NMR fueron recogidos en un Espectrometro Varian VXR-300 FT-NMR (300 MHz).

50 **[0047] Medio de cultivo.** Todo el medio fue preparado en agua destilada, desionizada. Las sales M9 (1 L) contenían Na_2Hd -glucosa (20 g), MgSO_4 (6 g), KH_2PO_4 (3 g), NaCl (0,5 g) y NH_4Cl (1 g). El medio mínimo M9 (1 L) consistió de 1 L de sales M9 conteniendo D-glucosa (10 g), MgSO_4 (0,12 g), hidrocloreto de tiamina (0,001 g), L-fenilalanina (0,040 g), L-tirosina (0,040 g), L-triptofano (0,040 g), ácido p-hidroxibenzoico (0,010 g), p-aminobenzoato de potasio (0,010 g), y ácido 2,3-dihidroxibenzoico (0,010 g). Se añadió ampicilina (0,05 g/L) donde se indicó. Las soluciones de sales M9, MgSO_4 y la glucosa fueron autoclavados individualmente y después mezcladas. Los amino ácidos aromáticos, las vitaminas aromáticas, y la ampicilina fueron esterilizadas a través de membranas 0,22- μm .

60 **[0048]** El medio de fermentación (1 L) contenía K_2HPO_4 (7,5 g), citrato de hierro amoniacal (III) (0,3 g), monohidrato de ácido cítrico (2,1 g); L-fenilalanina (0,7 g), L-tirosina (0,7 g), L-triptofano (0,35 g), y H_2SO_4 concentrado (1,2 mL). El medio de fermentación fue ajustado a un pH de 7,0 por la adición de NH_4OH concentrado antes del autoclave. Los siguientes suplementos fueron añadidos inmediatamente antes del inicio de la

5 fermentación: D-glucosa (20 g), MgSO₄ (0,24 g), ácido *p*-hidroxibenzoico (0,010 g), *p*-aminobenzoato de potasio (0,010 g), ácido 2,3-dihidroxibenzoico (0,010 g), y oligoelementos incluyendo (NH₄)₆(Mo₇O₂₄)₅·4H₂O (0,0037 g), ZnSO₄·7H₂O (0,0029 g), H₃BO₃ (0,0247 g), CuSO₄·5H₂O (0,0025 g), y MnCl₂·4H₂O (0,0158 g). La D-Glucosa y el MgSO₄ fueron autoclavados separadamente mientras las vitaminas aromáticas y los oligoelementos fueron esterilizados a través de membranas 0,22- μ m.

10 **[0049] Fermentaciones.** Las fermentaciones emplearon un recipiente de cultivo B. Braun M2 de capacidad de trabajo de 2,0 L. Las utilidades fueron suministradas por un MD Biostat B. Braun que fue controlado por un DCU-1. La adquisición de datos utilizó un ordenador personal Dell Optiplex Gs+ 5166M equipado con software B. Braun MFCS/Win. La temperatura, el pH, y la alimentación de glucosa fueron controlados con bucles de control PID. La temperatura fue mantenida a 33° C. El pH fue mantenido a 7,0 por la adición de HN₄OH concentrado o N H₂SO₄. El oxígeno disuelto (D. O.) fue medido utilizando un sensor de O₂ esterilizable de 12 mm Mettler-Toledo equipado con una membrana permeables de O₂ de tipo A Ingold. El D.O. fue mantenido a una saturación de aire del 10%.

15 **[0050]** Los inoculantes fueron iniciados por la introducción de una única colonia en 5 mL de medio M9 conteniendo ampicilina. El cultivo fue aumentado a 37° C con agitación a 250 rpm durante 24 h y posteriormente transferido a 100 mL de medio M9 conteniendo ampicilina. Tras el aumento a 37° C, 250 rpm durante 12 h adicionales, el inoculante estaba listo para la transferencia en el recipiente de fermentación. La concentración inicial de glucosa en el medio de fermentación de 20 g/L. Se utilizaron tres métodos preparados para mantener los niveles de D.O. a una saturación de aire del 10% durante la duración de la serie. Con el flujo de aire a un ajuste inicial de 0,06 L/L/min, la concentración de D.O. fue mantenida aumentando la velocidad del impulsor de su punto de ajuste de inicio de 50 rpm a su máximo prefijado de 940 rpm. Con el impulsor constante a 940 rpm, el controlador de flujo de masa después mantuvo los niveles de D.O. aumentando la tasa de flujo de aire de 0,06 L/L/min al máximo prefijado de 1,9 L/L/min. A una velocidad del impulsor constante y una tasa de flujo de aire constante, los niveles de D.O. fueron finalmente mantenidos a una saturación de aire del 10% para el resto de la fermentación por la alimentación de glucosa controlada por el sensor de oxígeno. Al principio de esta etapa, los niveles de D.O. cayeron por debajo de la saturación de aire del 10% debido a la glucosa inicial residual en el medio. Esto duró aproximadamente durante 1 h antes de que comenzase la alimentación de glucosa (65% w/v). Los parámetros de control PID fueron establecidos a 0,0 (apagado) para el control derivado (T_D) y 999,9 s (acción mínima de control) para el control integral (T_I). El X_p fue establecido a un 950% para conseguir un K_c de 0,1 y 125% para conseguir un K_c de 0,8.

20 **[0051]** Las muestras (10 mL) del caldo de fermentación fueron tomadas en intervalos de 6 h. Las densidades de las células fueron determinadas por la disolución del caldo de fermentación con agua (1:100) seguido por la medición de la absorción a 600 nm (OP₆₀₀). El peso de la célula seca (g/L) fue obtenido utilizando un coeficiente de conversión de 0,43 g/L/OD₆₀₀. El caldo de fermentación restante fue centrifugado durante 4 min utilizando un microcentrifugo Beckam para obtener caldo libre de células. Las concentraciones de soluto en el caldo libre de células fueron determinadas por ¹H NMR.

25 **[0052] Purificación del Acido Shikímico del Caldo de Fermentación.** El caldo de fermentación (1100-1200 mL) fue centrifugado a 14000 g durante 30 min y las células fueron descartadas. El sobrenadante resultante fue reflujo durante 4 h, enfriado a temperatura ambiente, y el pH ajustado a 2,5 por la adición de H₂SO₄ concentrado. Tras la centrifugación a 14000 g durante 20 min, una solución amarilla clara fue colada del resto celular y ajustada a un pH de 6,9 por la adición de HN₄OH concentrado. La solución fue combinada con 5 g de carbono activo Darco KB-B, y arremolinada a 50 rpm durante 1-2 h, y después filtrada a través de papel de filtrado Whatman 5. El material filtrado fue lavado con 250 mL adicionales de agua. Los filtrados combinados fueron después tratados de la misma forma con un segundo grupo de carbono activo.

30 **[0053]** Siguiendo al tratamiento de la solución con carbono, el color oscuro era menos intenso que antes del tratamiento, pero la solución no estaba decolorada. La adición de ácido acético glacial a una concentración final del 15% proporcionó una solución amarilla, clara que fue después eluida a través de una columna de AG1-x8 (forma de acetato, 5 cm x 20 cm) a 4° C. Siguiendo la elución de la columna con 400 mL de 15% de ácido acético acuoso adicionales, los eluyentes combinados fueron pasados a través de una columna de Dowex 50 (forma de H⁺, 5 cm x 20 cm) a 4° C que fueron después lavados con 400 mL de 15% de ácido acético acuoso. Los eluyentes de la columna de intercambio de cationes fueron combinados y concentrados a aproximadamente 150 mL hirviendo y después secando por evaporación rotatoria, dejando un sólido blanco duro (83% de recuperación a través de este paso). La recristalización de una mezcla de metanol y acetato de etilo proporciono ácido shikímico como un polvo blanco fino (61% de recuperación en base al ácido shikímico cuantificado en el caldo de fermentación bruto).

35 **[0054]** La discusión precedente revela y describe meramente realizaciones ejemplares de la presente invención. Alguien experto en la materia reconocerá fácilmente de tal discusión, y de los dibujos y reivindicaciones acompañantes, que varios cambios, modificaciones y variaciones se pueden hacer en la presente sin salirse del espíritu y ámbito de la invención como se define en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de sintetizar ácido shikímico de una fuente de carbono comprendiendo convertir la fuente de carbono en ácido shikímico con un E. coli recombinante que comprende el gen $aroF^{FBR}$ codificando un isoenzima de 3-desoxi-D-arabino-heptuloso-7 fosfato sintasa insensible a la inhibición por retroalimentación por amino ácidos aromáticos u otras moléculas aromáticas, el gen codificando 3-deshidroquinata sintasa, el gen codificando 3-deshidroquinata deshidratasa, y el gen codificando shikimato deshidrogenasa, en un medio de fermentación y controlando la proporción molar de ácido shikímico a ácido quínico reduciendo o eliminando el equilibrio de ácido shikímico a ácido quínico añadiendo de un análogo de glucosa no hidrolizable que es metil glucopiranosida al medio de fermentación, en donde el gen codificando la kinasa de shikimato en el E. coli recombinante es eliminado
- 10 totalmente o en parte, o es mutado, por lo tanto, eliminando, inhibiendo o reduciendo la actividad de la quinasa de shikimato.
2. El método de la Reivindicación 1, en donde el gen codificando la deshidrogenasa de shikimato es el gen $aroE$.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el gen $aroE$ es introducido en el E. coli en un plásmido.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en donde el plásmido es pKD12.112, obtenible del E. coli SP1/pKD12.112 identificado por el número de designación de la ATCC 98905.
5. El método de la Reivindicación 3, en donde el plásmido es pKD12.138, obtenible del E. coli Sp1.1/pKD12.138 identificado por el número de designación de la ATCC 207055.
6. El método de la Reivindicación 1, en donde el gen codificando la sintasa de 3-deshidroquinata es el gen $aroB$.
- 20 7. El método de la Reivindicación 6, en donde el gen $aroB$ es introducido en el E. coli por inserción en el locus $serA$ del E. coli.
8. El método de la Reivindicación 1, en donde el gen $aroFFBR$ es introducido en el E. coli en un plásmido.
9. El método de la Reivindicación 8, en donde el plásmido es pKD12.112, obtenible del E. coli SP1.1/pKD12.112 identificado por el número de designación de la ATCC 98905.
- 25 10. El método de la Reivindicación 8, en donde el plásmido es pKD12.138, obtenible del E. coli Sp1.1/pKD12.138 identificado por el número de designación de la ATCC 207055.
11. El método de la Reivindicación 1, en donde la proporción molar de ácido shikímico a ácido quínico es mayor que 9.
12. El método de la Reivindicación 1, en donde la metil glucopiranosida es metil- α -glucopiranosida, metil- β -glucopiranosida o una mezcla de las mismas.
- 30 13. El método de la Reivindicación 1, comprendiendo además eliminar, mutar o disminuir los niveles de expresión de los genes $aroL$ y $aroK$.
14. El método de la Reivindicación 1, en donde el E. coli recombinante comprende:
- a) un casete $aroB$ insertado en el locus $serA$;
- b) locus $aroL$ y $aroK$ mutados; y
- 35 c) un plásmido comprendiendo insertos de genes $aroE$, $aroFFBR$ y $serA$.
15. El método de la Reivindicación 14, en donde el plásmido es pKD12.112, obtenible del E. coli SP1.1/pKD12.112 identificado por el número de designación de la ATCC 98905.
16. El método de la Reivindicación 1, en donde el E. coli recombinante es E. coli Sp1.1/pKD12.112 identificado por el número de designación de la ATCC 98905.
- 40 17. El método de la Reivindicación 1, en donde la concentración de metil glucopiranosida en el medio de fermentación es de 0,5 mM a 1,0 mM.

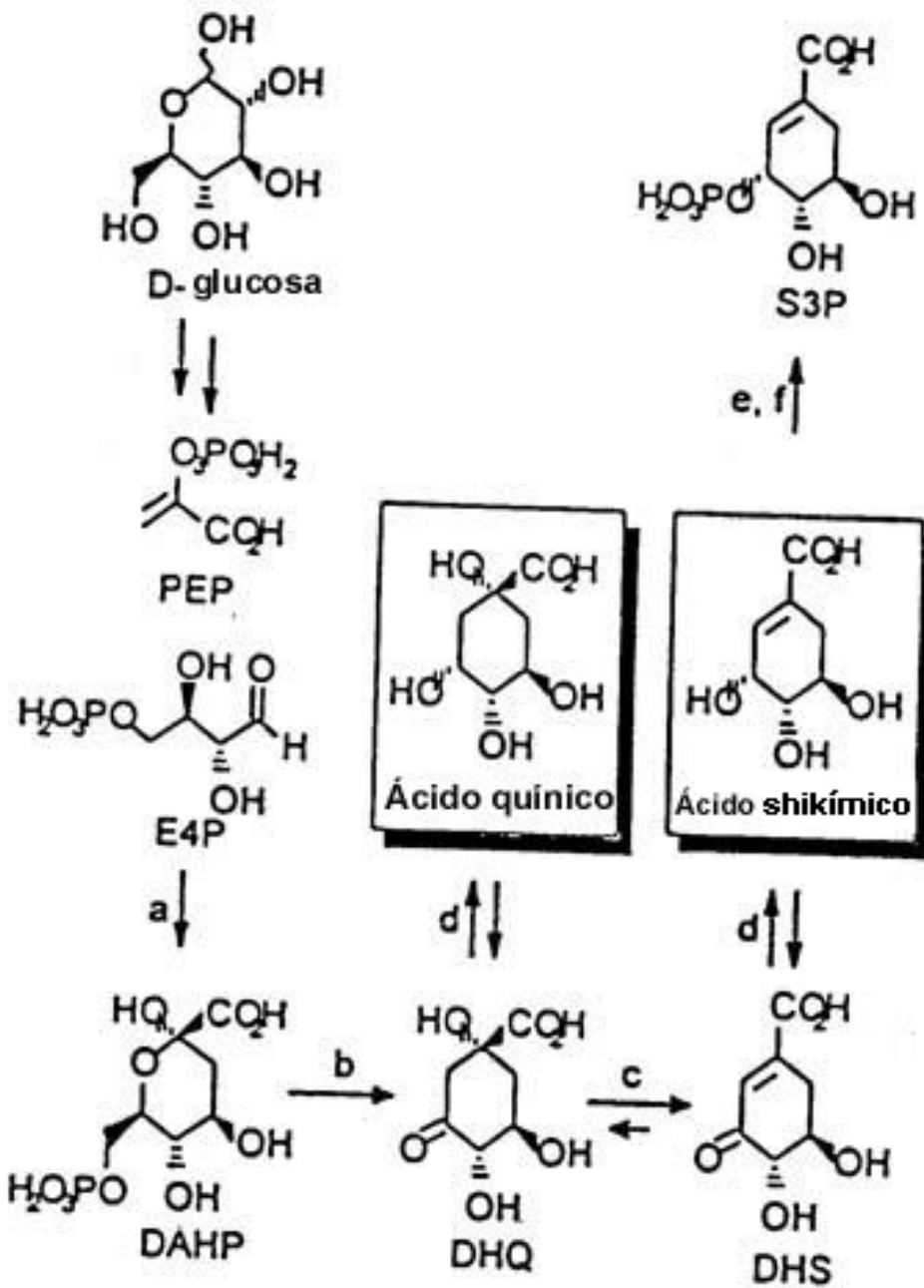


FIGURA 1

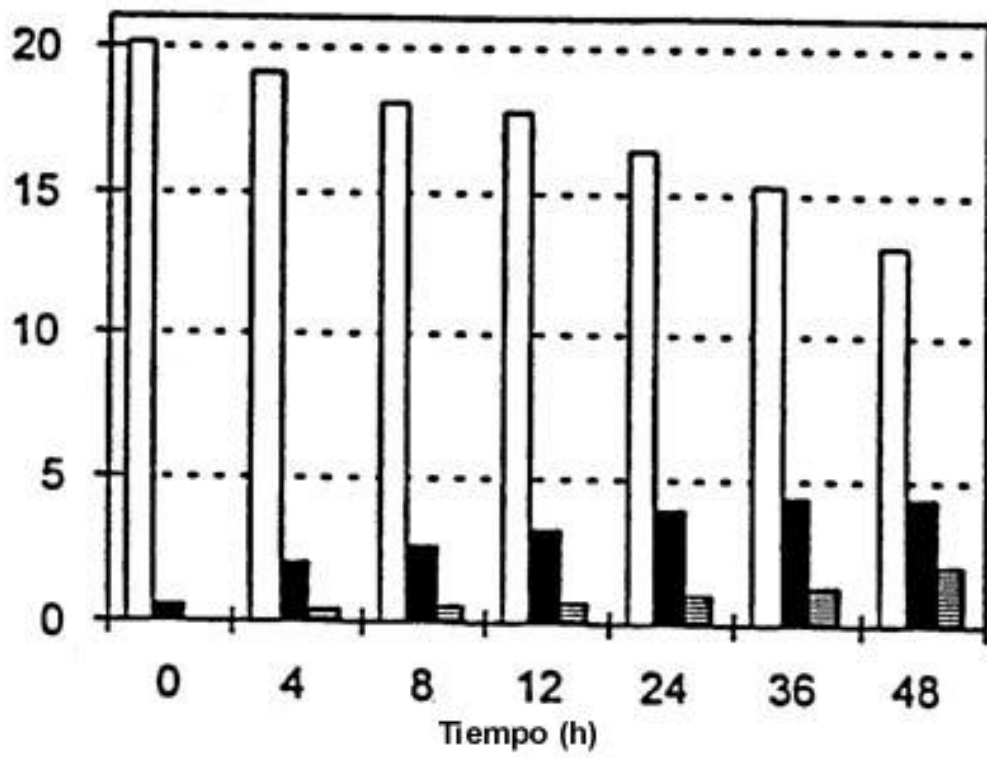


FIGURA 2