

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 756**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2006 E 06806525 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1957640**

54 Título: **Transcetolasa modificada y uso de la misma**

30 Prioridad:

02.11.2005 EP 05023813

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.10.2013

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**LEHMANN, MARTIN;
HOHMANN, HANS-PETER;
LAUDERT, DIETMAR y
HANS, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 425 756 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

Transcetolasa modificada y uso de la misma

La presente invención proporciona enzimas transcetolasas modificadas. Los microorganismos que sintetizan una de las transcetolasas modificadas en lugar de la transcetolasa de tipo salvaje son prototrofos para aminoácidos aromáticos y no pueden usar fuentes de carbono que son asimiladas vía la ruta de fosfato de pentosa. Las enzimas modificadas y polinucleótidos que las codifican se pueden usar en el proceso de fermentación para sustancias que usan ribosa-5-fosfato, ribulosa-5-fosfato, o xilulosa-5-fosfato como sustrato para la biosíntesis, tal como, por ejemplo, riboflavina, precursores de riboflavina, mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavina y adenina (FAD), y sus derivados. También se pueden usar para la producción de fosfato de piridoxal (vitamina B₆), guanosina y adenosina, y derivados de estos nucleótidos.

La riboflavina (vitamina B₂) es sintetizada por todas las plantas y muchos microorganismos, pero no es producida por animales superiores. Debido a que es un precursor de coenzimas tales como el dinucleótido de flavina y adenina y el mononucleótido de flavina, que son necesarios en la oxidación enzimática de hidratos de carbono, la riboflavina es esencial para el metabolismo básico. En animales superiores, una insuficiencia de riboflavina puede provocar pérdida del cabello, inflamación de la piel, deterioro de la visión, e insuficiencia del crecimiento.

Las enzimas requeridas que catalizan la biosíntesis de riboflavina a partir de trifosfato de guanosina (GTP) y ribulosa-5-fosfato están codificadas por cuatro genes (*ribG*, *ribB*, *ribA*, y *ribH*) en *B. subtilis*. Estos genes están situados en un operón, cuyo orden génico difiere del orden de las reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas. Por ejemplo, GTP ciclohidrolasa II, que cataliza la primera etapa en la biosíntesis de riboflavina, es codificada por el tercer gen en el operón, *ribA*. El gen *ribA* también codifica una segunda actividad enzimática, es decir, 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintasa (DHBPS), que cataliza la conversión de ribulosa-5-fosfato a la unidad de cuatro carbonos 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato (DHBP). La desaminasa y la reductasa son codificadas por el primer gen del operón, *ribG*. La penúltima etapa en la biosíntesis de la riboflavina está catalizada por lumazina sintasa, el producto del último gen *rib*, *ribH*. La riboflavina sintasa, que controla la última etapa de la ruta, es codificada por el segundo gen del operón, *ribB*. La función del gen situado en el extremo 3' del operón *rib* es actualmente incierta; sin embargo, su producto génico no es necesario para la síntesis de riboflavina.

La transcripción del operón de riboflavina a partir del promotor *ribP1* está controlada por un mecanismo de atenuación que implica una región líder reguladora situada entre *ribP1* y *ribG*. Las mutaciones *ribO* en esta región líder dan como resultado la expresión desregulada del operón de riboflavina. La expresión desregulada también se observa en cepas que contienen mutaciones con cambio de sentido en el gen *ribC*. Se ha demostrado que el gen *ribC* codifica la flavina cinasa/FAD sintasa de *B. subtilis* (Mack, M., et al., J. Bacteriol., 180:950-955, 1998). Las mutaciones desregulantes reducen la actividad de flavocinasa del producto del gen *ribC* dando como resultado concentraciones intracelulares reducidas de mononucleótido de flavina (FMN), la molécula efectora del sistema regulador de riboflavina.

La manipulación mediante ingeniería de cepas de producción de riboflavina con mayores velocidades y rendimientos de producción de riboflavina se ha logrado en el pasado de muchas maneras diferentes. Por ejemplo, (1) se usó mutagénesis clásica para generar variantes con mutaciones aleatorias en el genoma del organismo de elección, seguido de la selección por mayor resistencia a análogos de purina y/o identificando una mayor producción de riboflavina. (2) Como alternativa, las enzimas terminales de la biosíntesis de riboflavina, es decir, las enzimas que catalizan la conversión de trifosfato de guanosina (GTP) y ribulosa-5-fosfato en riboflavina, estaban sobreexpresadas, dando como resultado también un mayor flujo hacia el producto diana. El flujo metabólico hacia y a través de una ruta biosintética, por ejemplo la ruta biosintética de riboflavina, está determinado por las actividades específicas de las enzimas limitantes de la velocidad de esta ruta particular, y por las concentraciones intracelulares de los sustratos para estas enzimas. Una enzima puede operar a su actividad máxima sólo a o por encima de las concentraciones de sustrato saturantes. La concentración de sustrato saturante es un rasgo característico para cada enzima. Por ejemplo, el flujo metabólico hacia la ruta de riboflavina se puede incrementar o se puede mantener en un nivel elevado manteniendo las concentraciones intracelulares de ribulosa-5-fosfato por encima o tan próximo como sea posible a la concentración de sustrato saturante de la 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintasa, una enzima limitante de la velocidad supuesta para la ruta biosintética de riboflavina. Se pueden alcanzar concentraciones intracelulares elevadas de ribulosa-5-fosfato, por ejemplo, evitando o interfiriendo con el drenaje de ribulosa-5-fosfato en el metabolismo central vía la parte no oxidativa de la ruta de fosfato de pentosa.

Una enzima clave en la parte no oxidativa de la ruta de fosfato de pentosa es la enzima transcetolasa, que cataliza la conversión reversible de ribulosa-5-fosfato y xilulosa-5-fosfato a seduheptulosa-7-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. Además, transcetolasa cataliza también la conversión de fructosa-6-fosfato y gliceraldehído-3-fosfato en xilulosa-5-fosfato y eritrosa-4-fosfato (Kochetov, G. A. 1982, Transketolase from yeast, rat liver, and pig liver, Methods Enzymol., 90:209-23).

Se ha dado a conocer previamente que cepas de *Bacillus subtilis* deficientes en transcetolasa, que poseen mutaciones de supresión génica en el gen que codifica transcetolasa, producen ribosa, que se acumula en el caldo de fermentación (De Wulf, P., y E. J. Vandamme. 1997. Production of D-ribose by fermentation, Appl. Microbiol.

Biotechnol. 48:141-148; Sasajima, K., y Yoneda, M. 1984, Production of pentoses by microorganisms. Biotechnol. and Genet. Eng. Rev. 2: 175-213). Obviamente, se pueden alcanzar mayores conjuntos de azúcares intracelulares de C5 carbonos en mutantes a los que se les ha suprimido el gen de transcetolasa hasta un nivel que supera las necesidades fisiológicas de las bacterias y conduce a la secreción de ribosa en exceso.

5 Como se mencionó anteriormente, las reacciones catalizadas por transcetolasa también son necesarias para producir eritrosa-4-fosfato, a partir del cual derivan tres aminoácidos aromáticos proteinogénicos. Por lo tanto, los microorganismos deficientes en transcetolasa son auxotrofos para estos aminoácidos. Sólo pueden crecer si estos aminoácidos o sus precursores biosintéticos, por ejemplo ácido shikímico, son suministrados vía el medio de cultivo.

10 Además de la auxotrofia desfavorable para aminoácidos aromáticos o ácido shikímico, los mutantes de *B. subtilis* deficientes en transcetolasa muestran un número de graves efectos pleiotrópicos, como crecimiento muy lento en glucosa, un sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato defectuoso, represión de catabolito de carbono desregulada, y composición de la membrana celular y de la pared celular alterada (De Wulf, P., y E. J. Vandamme. 1997).

15 Otra cepa de *B. subtilis* que segrega riboflavina deficiente en transcetolasa fue descrita por Gershanovich et al. (Gershanovich VN, Kukanova Ala, Galushkina ZM, Stepanov AI (2000) Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 3:3-7).

20 Además, el documento US 6.258.554 B1 describe una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que sobreproduce riboflavina, en la que la actividad de transcetolasa es deficiente. Se puede observar a partir de la descripción del documento US 6.258.554 B1 que la deficiencia en la actividad de transcetolasa y la auxotrofia de aminoácidos resultante fue esencial para la mejor productividad de riboflavina, puesto que un revertiente prototrófico produjo riboflavina en cantidades similares a una cepa de *C. glutamicum* con un antecedente de transcetolasa de tipo salvaje.

Estas desventajas, es decir, auxotrofia para aminoácidos aromáticos y otros efectos pleiotrópicos explicados anteriormente, hacen a un mutante deficiente en transcetolasa una cepa de producción menos preferible para procesos industriales estables, tales como, por ejemplo, la producción industrial de riboflavina con tal cepa.

25 En general, es un objeto de la presente invención proporcionar una cepa mutante de transcetolasa que está modificada de tal manera que las propiedades catalíticas de la transcetolasa modificada permiten concentraciones intracelulares de ribulosa-5-fosfato y de ribosa-5-fosfato mayores que aquellas de la transcetolasa sin modificar, pero que no tiene las desventajas de las cepas deficientes en transcetolasa mencionadas anteriormente.

30 Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que alterando genéticamente un microorganismo tal como por ejemplo *B. subtilis*, sustituyendo el gen de tipo salvaje por un gen mutado que codifica una transcetolasa modificada que permite cierto flujo residual a través de la ruta de fosfato de pentosa al tener actividades específicas moduladas, se puede mejorar significativamente la producción de un producto de fermentación tal como, por ejemplo, riboflavina sin perder las propiedades prototróficas.

La presente invención se refiere a un a [página 4a]

35 Como una primera etapa para aislar mutantes, en los que la transcetolasa de tipo salvaje se sustituye por una de tales transcetolasas modificadas, se puede generar un mutante de supresión que es auxotrofo para los aminoácidos aromáticos proteinogénicos y que no puede crecer con fuentes de carbono asimiladas vía la ruta de fosfato de pentosa, por ejemplo gluconato. El mutante de supresión de transcetolasa se puede transformar entonces con una mezcla de fragmentos de ADN que codifican diversos mutantes de transcetolasa. Se pueden aislar transformantes prototróficos, a partir de los cuales se seleccionan aquellos que muestran una velocidad de crecimiento reducida en gluconato. Los mutantes aislados según este método pueden sintetizar enzimas transcetolasas modificadas que permiten una biosíntesis suficiente de eritrosa-4-fosfato para prevenir el crecimiento auxotrófico, pero actúan como un cuello de botella para la asimilación de gluconato. Además, se pueden evitar los efectos pleiotrópicos indeseados, observados típicamente con mutantes de supresión de transcetolasa de *B. subtilis*. El documento US 45 6.258.554 B1 indica que, junto con el restablecimiento del crecimiento auxotrófico al crecimiento prototrófico, los mutantes de transcetolasa de *C. glutamicum* que segregan riboflavina pierden su capacidad para producir más riboflavina que una cepa similar que contiene un gen de transcetolasa de tipo salvaje. Como se muestra en los ejemplos de la presente invención, los mutantes de transcetolasa de *B. subtilis* prototróficos aislados como se esquematiza anteriormente produjeron inesperadamente más riboflavina que la cepa progenitora de tipo salvaje de 50 transcetolasa, mientras que un mutante de supresión de transcetolasa había perdido parcialmente sus capacidades de producción de riboflavina.

Los métodos para la producción de mutaciones en fragmentos de ADN son bien conocidos en la técnica. Los mutantes de transcetolasa se pueden generar, por ejemplo, mediante manipulación de proteínas por ingeniería genética usando una de las estructuras tridimensionales disponibles de, por ejemplo, la transcetolasa de levadura 55 (Lindqvist, Y., G. Schneider, U. Ermler, y M. Sundstrom. 1992. Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. Embo. J. 11:2373-9) para seleccionar posiciones adecuadas de la secuencia de aminoácidos, o mediante mutagénesis al azar. El proceso de selección en ambos casos se puede realizar como se describe anteriormente. La transcetolasa modificada - cuando se usa como

sustitución para la transcetolasa de tipo salvaje - muestra propiedades catalíticas, es decir, actividades específicas moduladas, que permiten el crecimiento de la célula hospedante en una fuente de carbono que es metabolizada exclusivamente por la ruta de fosfato de pentosa (por ejemplo gluconato) con una velocidad de crecimiento reducida en comparación con una célula hospedante que contiene la transcetolasa de tipo salvaje. Estas propiedades dan como resultado mayores concentraciones intracelulares de ribulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato y un flujo residual a través de la ruta de fosfato de pentosa, de manera que se puede producir suficiente eritrosa-4-fosfato para evitar el crecimiento auxotrófico.

“Enzima de tipo salvaje” o “transcetolasa de tipo salvaje”, que se puede usar para la presente invención, puede incluir cualquier transcetolasa como se define anteriormente que se usa como punto de partida para diseñar mutantes según la presente invención. La transcetolasa de tipo salvaje puede ser de origen eucariota o procariota, preferiblemente fúngico o bacteriano, seleccionada en particular de *Bacillus* o *Corynebacterium*, preferiblemente de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. halodurans*. Lo más preferible, la transcetolasa es de *B. subtilis*. “Homóloga” se refiere a una transcetolasa que es al menos alrededor de 50% idéntica, preferiblemente al menos alrededor de 60% idéntica, más preferiblemente al menos alrededor de 70%, 80%, 85%, 90%, 95% idéntica, y lo más preferible al menos alrededor de 98% idéntica a una o más de las secuencias de aminoácidos como se muestra en la Figura 1. “Tipo salvaje”, en el contexto de la presente invención, puede incluir tanto secuencias de transcetolasa derivables de la naturaleza así como variantes de enzimas transcetolasas sintéticas (en tanto que sean homólogas a una cualquiera de las secuencias mostradas en la Figura 1). Las expresiones “transcetolasa de tipo salvaje” y “transcetolasa no modificada” se usan aquí de forma intercambiable.

La expresión “% de identidad”, como se conoce en la técnica, significa el grado de relatividad entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, según sea el caso, como se determina mediante el emparejamiento entre cadenas de tales secuencias. “Identidad” se puede determinar fácilmente mediante métodos conocidos, por ejemplo con el programa BESTFIT (GCG Wisconsin Package, versión 10.2, Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, USA) usando los siguientes parámetros: penalización de creación de salto 8, penalización de extensión de salto 2 (parámetros por defecto).

Un “mutante”, “enzima mutante”, “enzima mutada” o “transcetolasa mutante” o una “transcetolasa modificada”, como se usa aquí, significa cualquier variante derivable de una enzima/transcetolasa de tipo salvaje dada (según la definición anterior) de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, y, cuando se usa para sustituir el gen de tipo salvaje de un organismo/célula hospedante, debería tener un efecto sobre el crecimiento en, por ejemplo, gluconato y/o ribosa. Para el alcance de la presente invención, no es relevante cómo se obtiene el mutante o mutantes; tales mutantes se pueden obtener, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis de saturación, mutagénesis al azar/evolución dirigida, mutagénesis química o por UV de todas las células/organismos, etc. Estos mutantes también se pueden generar, por ejemplo, diseñando genes sintéticos, y/o se pueden producir mediante traducción *in vitro* (libre de células). Para ensayar la actividad específica, los mutantes se pueden (sobre)expresar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las expresiones “transcetolasa mutante”, “transcetolasa modificada” o “transcetolasa mutada” se usan aquí de forma intercambiable.

“Célula hospedante” es una célula capaz de producir un producto de fermentación dado y que contiene la transcetolasa de tipo salvaje, o un ácido nucleico que codifica la transcetolasa modificada según la invención. Las células hospedantes adecuadas incluyen células de microorganismos.

Como se usa aquí, la expresión “actividad específica” representa la velocidad de reacción de las enzimas transcetolasas de tipo salvaje y mutantes en condiciones de reacción apropiadamente definidas como se describe en Kochetov (Kochetov, G. A. 1982. Transketolase from yeast, rat liver, and pig liver. *Methods Enzymol* 90:209-23). La “actividad específica” define la cantidad de un sustrato consumido y/o producto producido en un período de tiempo dado y por cantidad definida de proteína a una temperatura definida. Típicamente, la “actividad específica” se expresa en μmoles de sustrato consumido o producto formado por min. por mg de proteína. Típicamente, $\mu\text{mol/min.}$ se abrevia mediante U (= unidad). Por lo tanto, las definiciones de unidad para actividad específica de $\mu\text{mol/min.}/(\text{mg de proteína})$ o $\text{U}/(\text{mg de proteína})$ se usan de forma intercambiable a lo largo de este documento. Se entiende que en el contexto de la presente invención, la actividad específica se debe de comparar en base a una longitud similar, o preferiblemente idéntica, de la cadena polipeptídica.

Muchas mutaciones pueden cambiar una transcetolasa de tipo salvaje de tal manera que el crecimiento en gluconato se vea afectado como se describe anteriormente.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para la producción de sustancias para las que ribosa-5-fosfato, ribulosa-5-fosfato, o xilulosa-5-fosfato es un precursor biosintético, que comprende cultivar un microorganismo en un medio adecuado en condiciones que permiten la expresión de una transcetolasa modificada, y separar el producto de fermentación del medio, seleccionándose dicho microorganismo de un microorganismo productor de riboflavina seleccionado de *Bacillus* o *Corynebacterium* genéticamente modificado mediante ingeniería con un polinucleótido que codifica dicha transcetolasa modificada que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición 357 como se muestra en SEC ID No.: 2, y en el que la velocidad de crecimiento de dicho microorganismo en una fuente de carbono que es metabolizada exclusivamente vía la ruta de fosfato de pentosa se reduce entre 10 a 90% en comparación con una

célula hospedante que contiene una transcetolasa no modificada, y en el que el microorganismo permanece prototrófico para aminoácidos aromáticos.

La al menos una mutación puede ser una adición, supresión y/o sustitución.

5 Preferiblemente, la al menos una mutación es al menos una sustitución de aminoácido, en la que un aminoácido dado presente en la secuencia de aminoácidos de la transcetolasa no modificada se sustituye por un aminoácido diferente en la secuencia de aminoácidos de la transcetolasa modificada de la invención. La secuencia de aminoácidos de la transcetolasa modificada puede contener al menos una sustitución de aminoácido cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la transcetolasa no modificada correspondiente. La transcetolasa modificada de la presente invención contiene al menos una mutación en una posición de aminoácido que
10 corresponde a la posición de aminoácido 357 de la secuencia de aminoácidos de transcetolasa de *B. subtilis* como se representa en SEC ID NO:2.

15 En otras realizaciones, la transcetolasa modificada contiene al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco sustituciones cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la transcetolasa correspondiente. Por ejemplo, la transcetolasa modificada contiene una a diez, una a siete, una a cinco, una a cuatro, dos a diez, dos a siete, dos a cinco, dos a cuatro, tres a diez, tres a siete, tres a cinco o tres a cuatro sustituciones de aminoácidos cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la transcetolasa no modificada correspondiente.

20 En una realización, la transcetolasa no modificada se puede obtener de *Bacillus*, preferiblemente *B. subtilis*, como se representa en SEC ID NO:2. La secuencia de ADN correspondiente se muestra en SEC ID NO:1. La transcetolasa modificada contiene al menos una mutación en la posición 357 de SEC ID NO:2, conduciendo a una transcetolasa modificada que tiene las propiedades descritas anteriormente.

La al menos una sustitución de aminoácidos en la transcetolasa no modificada situada en una posición que corresponde al aminoácido 357 como se muestra en SEC ID NO:2 se puede seleccionar de la sustitución R357H, R357A, R357S, R357N, R357T, R357K, R357I, R357V, R357G, y R357L.

25 En una realización particularmente preferida, la transcetolasa mutada consiste en una sustitución que afecta a la posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 357 de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID NO:2, y que se puede seleccionar de la sustitución R357H, R357A, R357S, R357N, R357T, R357K, R357I, R357V, R357G, y R357L.

30 En otra realización preferida, la transcetolasa modificada contiene al menos dos sustituciones de aminoácidos cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la transcetolasa no modificada correspondiente, en la que al menos una mutación corresponde a la posición de aminoácido 357 de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID NO:2, y que se puede seleccionar de la sustitución R357H, R357A, R357S, R357N, R357T, R357K, R357I, R357V, R357G, y R357L.

35 El aminoácido presente en la transcetolasa no modificada es preferiblemente arginina en la posición 357. El aminoácido en la secuencia de la transcetolasa no modificada se puede cambiar a histidina, alanina, serina, asparagina, lisina, treonina, leucina, glicina, isoleucina o valina en la posición 357. Preferiblemente, la sustitución en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 357 de la secuencia como se muestra en SEC ID NO:2 consiste en la sustitución de arginina por histidina, arginina por alanina, arginina por serina, arginina por leucina, arginina por lisina, arginina por asparagina, arginina por treonina, arginina por glicina, arginina por isoleucina,
40 arginina por valina.

La transcetolasa modificada de la invención puede comprender aminoácidos extraños, preferiblemente en su término N o C. "Aminoácidos extraños" significa aminoácidos que no están presentes en una transcetolasa nativa (que aparece en la naturaleza), preferiblemente un tramo de al menos alrededor de 3, al menos alrededor de 5 o al menos alrededor de 7 aminoácidos contiguos que no están presentes en una transcetolasa nativa. Los tramos preferidos de aminoácidos extraños incluyen, pero no se limitan a, "etiquetas" que facilitan la purificación de la transcetolasa modificada producida recombinantemente. Los ejemplos de tales etiquetas incluyen, pero no se limitan a, una etiqueta "His₆", una etiqueta FLAG, una etiqueta myc, y similar. Para el cálculo de la actividad específica, es necesario que los valores sean corregidos para estos aminoácidos adicionales (véase también anteriormente).

50 En otra realización, la transcetolasa modificada puede contener una o más, por ejemplo dos, supresiones cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la transcetolasa no modificada correspondiente. Preferiblemente, las supresiones afectan a los aminoácidos N o C-terminales de la transcetolasa no modificada correspondiente, y no reducen significativamente las propiedades funcionales, por ejemplo la actividad específica, de la enzima.

La invención se refiere además a un polinucleótido que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una transcetolasa modificada usada para la invención. "Polinucleótido", como se usa aquí, se refiere a un polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido que puede ser ARN o ADN sin modificar, o ARN o ADN modificado. Los polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, ADN mono- o bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias, ARN mono- y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias,

moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarios o, más típicamente, bicatenarios, o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias. El término "polinucleótido" incluye ADN o ARN que comprende una o más bases inusuales, por ejemplo inosina, o una o más bases modificadas, por ejemplo bases tritiladas.

5 El polinucleótido puede obtenerse fácilmente modificando una secuencia polinucleotídica que codifica una transcetolasa no modificada. En la Figura 1 se dan ejemplos de secuencias polinucleotídicas que codifican enzimas transcetolasas no modificadas. Preferiblemente, la transcetolasa no modificada se origina de *Bacillus*, en particular *B. subtilis*, más preferiblemente es un polinucleótido que codifica una transcetolasa no modificada como se representa en SEC ID NO:2.

10 Los métodos para introducir mutaciones, por ejemplo adiciones, supresiones y/o sustituciones, en la secuencia nucleotídica que codifica la transcetolasa no modificada incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis dirigida al sitio y métodos a base de PCR.

15 Las secuencias de ADN usadas para la presente invención se pueden construir partiendo de secuencias de ADN genómico o de ADNc que codifican enzimas transcetolasas conocidas en el estado de la técnica, como están disponibles a partir de, por ejemplo, Genbank (Intelligenetics, California, USA), European Bioinformatics Institute (Hinton Hall, Cambridge, GB), NBRF (Georgetown University, Medical Centre, Washington DC, USA) y Vecbase (University of Wisconsin, Biotechnology Centre, Madison, Wisconsin, USA), o a partir de una información de secuencia descrita en la Figura 1 mediante métodos de mutagénesis *in vitro* [véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York]. Otra posibilidad de mutar una secuencia de ADN dada que también puede ser adecuada para la práctica de la presente invención es la mutagénesis usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN como material de partida se puede aislar mediante métodos conocidos en la técnica y descritos, por ejemplo, en Sambrook et al. (Molecular Cloning) a partir de las cepas/organismos respectivos. Sin embargo, se entiende que el ADN que codifica una transcetolasa a construir/mutar según la presente invención también se puede preparar en base a una secuencia de ADN producida, por ejemplo mediante construcción de un gen sintético mediante métodos conocidos en la técnica (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 747483).

20

25

Una vez que se han obtenido secuencias de ADN completas, se pueden integrar en vectores o se pueden introducir directamente en el genoma de un organismo hospedante mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en, por ejemplo, Sambrook et al. (s.a.) para (sobre)expresar en sistemas hospedantes apropiados el polipéptido codificado. Sin embargo, un experto en la técnica sabe que también las propias secuencias de ADN se pueden usar para transformar los sistemas hospedantes adecuados de la invención para obtener la (sobre)expresión del polipéptido codificado.

30

En una realización preferida, la presente invención proporciona el uso de una transcetolasa modificada que posee al menos una mutación como se define anteriormente.

35 Los polipéptidos y polinucleótidos se proporcionan preferiblemente en forma aislada, y preferiblemente purificada hasta homogeneidad.

El término "aislada" significa que el material se retira de su entorno original (*por ejemplo*, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un microorganismo vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de parte o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector, y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición y todavía estar aislados por cuanto tal vector o composición no es parte de su entorno natural.

40

Un polinucleótido o ácido nucleico aislado, como se usa aquí, puede ser un ADN o ARN que no está inmediatamente contiguo con ambas secuencias codificantes con las que está inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del microorganismo a partir del que deriva. De este modo, en una realización, un ácido nucleico incluye algunas o todas las secuencias no codificantes de 5' (*por ejemplo*, promotoras) que están inmediatamente contiguas a la secuencia codificante. La expresión "polinucleótido aislado" incluye por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus que se replica autónomamente, o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota, o que existe como molécula separada (*por ejemplo*, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica un polipéptido adicional que está sustancialmente libre de material celular, material vírico, o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante), o precursores químicos u otros compuestos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además, un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un fragmento de ácido nucleico que no es de origen natural como fragmento y no se encontraría en el estado natural.

45

50

55 Como se usa aquí, la expresión polipéptido aislado se refiere a un polipéptido que está sustancialmente libre de otros polipéptidos. Un polipéptido aislado es preferiblemente mayor que 80% puro, más preferiblemente mayor que 90% puro, incluso más preferiblemente mayor que 95% puro, lo más preferible mayor que 99% puro. La pureza se puede determinar según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo mediante SDS-PAGE y tinción proteica

subsiguiente. Las bandas de proteínas se pueden cuantificar entonces mediante densitometría. Otros métodos para determinar la pureza están dentro del nivel de la pericia normal.

Como se menciona anteriormente, las transcetolasas modificadas y los polinucleótidos correspondientes de la invención se utilizan en la ingeniería genética de una célula hospedante adecuada para hacerla mejor y más eficiente en el proceso de fermentación para sustancias que usan como sustrato ribosa-5-fosfato, ribulosa-5-fosfato, o xilulosa-5-fosfato para la biosíntesis. La presencia de dicha transcetolasa modificada en una célula hospedante adecuada puede dar como resultado mayores concentraciones intracelulares de ribulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato y un flujo residual a través de la ruta de fosfato de pentosa en dicho hospedante recombinante, de manera que se puede producir suficiente eritrosa-4-fosfato para evitar el crecimiento auxotrófico.

Las células hospedantes apropiadas se seleccionan de *Corynebacterium* o *Bacilli*, como por ejemplo, *Bacillus subtilis*.

De este modo, la presente invención se refiere a [página 4]. En general, es posible introducir un mutante de transcetolasa obtenido que se origina a partir de un cierto organismo, por ejemplo *B. subtilis*, en el mismo organismo nuevamente y usarlo ahora como célula hospedante, o introducir cualquier mutante obtenido en cualesquiera otras células hospedantes relevantes.

Como se usa aquí, la expresión "velocidad de crecimiento" representa lo siguiente: Las células bacterianas se reproducen dividiéndose en dos. Si el crecimiento no está limitado, la duplicación continúa a una velocidad constante de manera que tanto el número de células como la velocidad de la población se duplica con cada período de tiempo consecutivo. Para este tipo de crecimiento exponencial, la representación gráfica del logaritmo natural del número de células frente al tiempo (preferiblemente en horas) produce una línea recta. La pendiente de esta línea es la velocidad de crecimiento específica del organismo, que es una medida del número de divisiones por célula por tiempo unitario. En alimento, las bacterias no pueden crecer continuamente puesto que la cantidad de nutriente disponible será finita y se acumularán productos de desecho. En estas condiciones, las curvas de crecimiento tienden a ser sigmoideas.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento en el que la velocidad de crecimiento de dicha célula hospedante recombinante (por ejemplo microorganismo) según la presente invención que posee una transcetolasa modificada en una fuente de carbono que es metabolizada exclusivamente por la ruta de fosfato de pentosa, en particular gluconato, se reduce entre 10 y 90% cuando se compara con el organismo de tipo salvaje. Preferiblemente, la reducción de la velocidad de crecimiento es entre 20% y 80%, todavía más preferiblemente entre 25% y 75%, en comparación con una célula que contiene un gen de transcetolasa de tipo salvaje.

La invención se refiere además a un a [página 4], que comprende:

a) cultivar la célula hospedante manipulada genéticamente/producida recombinantemente en la que el gen de transcetolasa de tipo salvaje se ha sustituido por un gen de transcetolasa modificada que codifica una enzima que permite un crecimiento ligeramente reducido o no reducido en una fuente de carbono que no es metabolizada exclusivamente por la ruta de fosfato de pentosa, pero que muestra una velocidad de crecimiento reducida cuando el organismo crece en una fuente de carbono que es metabolizada exclusivamente por la ruta de fosfato de pentosa, en un medio adecuado en condiciones que permiten la expresión de la transcetolasa modificada; y

b) separar del medio el producto de fermentación.

El "producto de fermentación", como se usa aquí, puede ser cualquier producto producido mediante una célula hospedante adecuada como se define anteriormente, cuya biosíntesis usa como sustrato ribosa-5-fosfato, ribulosa-5-fosfato, o xilulosa-5-fosfato. Los ejemplos de tales productos de fermentación incluyen, pero no se limitan a, riboflavina, precursores de riboflavina, mononucleótido de flavina (FMN), dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y sus derivados, fosfato de piridoxal (vitamina B₆), guanosina, adenosina y derivados de estos nucleótidos.

"Precursor de riboflavina" y "derivados de riboflavina, FMN o FAD", en el contexto de esta invención, debe incluir cualquiera y todos los metabolitos que requieran como intermedio o sustrato ribulosa-5-fosfato o ribulosa-5-fosfato en su (bio)síntesis. En el contexto de esta solicitud de patente, es irrelevante si tales rutas (bio)sintéticas son naturales o no naturales (es decir, rutas que no se producen en la naturaleza, sino que están manipuladas biotecnológicamente mediante ingeniería). Preferiblemente, las rutas sintéticas son de naturaleza bioquímica. Los precursores de riboflavina y derivados de riboflavina, FMN o FAD, incluyen pero no se limitan a: DRAPP; 5-amino-6-ribosilamino-2,4(1H,3H)-pirimidindiona-5'-fosfato; 2,5-diamino-6-ribitilamino-4(3H)-pirimidindiona-5'-fosfato; 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidindiona-5'-fosfato; 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidindiona; 6,7-dimetil-8-ribitilumazina (DMRL); y flavoproteínas. El término "riboflavina" también incluye sus derivados, tales como, por ejemplo, riboflavin-5-fosfato, y sus sales, tales como, por ejemplo, riboflavin-5-fosfato de sodio.

Los polinucleótidos, polipéptidos, células hospedantes recombinantes y métodos descritos aquí se pueden usar para la producción biotecnológica de uno o más de los productos de fermentación como se define anteriormente.

Los métodos de manipulación genética y metabólica mediante ingeniería de células hospedantes adecuadas según la presente invención son conocidos por la persona experta en la técnica. De forma similar, los métodos de purificación (potencialmente) adecuados para por ejemplo riboflavina, un precursor de riboflavina, FMN, FAD, fosfato de piridoxal o uno o más de sus derivados, son bien conocidos en el campo de la biosíntesis química fina y de la producción.

Se entiende que un método para la producción biotecnológica de un producto de fermentación tal como por ejemplo riboflavina, un precursor de riboflavina, FMN, FAD, fosfato de piridoxal o uno o más de sus derivados según la presente invención no está limitado a procedimientos de fermentación de células completas como se describe anteriormente, sino que también puede usar, por ejemplo, células hospedantes permeabilizadas, extractos celulares brutos, extractos celulares aclarados de restos celulares mediante, por ejemplo, centrifugación o filtración, o incluso rutas de reacción reconstituidas con enzimas aisladas. También las combinaciones de tales procedimientos están dentro del alcance de la presente invención. En el caso de la biosíntesis libre de células (tal como con rutas de reacción reconstituidas), es irrelevante si las enzimas aisladas se han preparado mediante y aislado de una célula hospedante, mediante transcripción/traducción *in vitro*, o todavía por otros medios.

Los medios de fermentación deben contener sustratos de carbono adecuados. Los sustratos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, monosacáridos tales como glucosa o fructosa, oligosacáridos tales como lactosa o sacarosa, polisacáridos tales como almidón o celulosa, o sus mezclas, y mezclas sin purificar a partir de materias primas renovables. Se contempla que la fuente de carbono utilizada en la presente invención puede englobar una amplia variedad de sustratos que contienen carbono, y sólo estará limitada por la elección del organismo.

Las diversas realizaciones de la invención descritas aquí se pueden combinar de forma cruzada.

La presente invención se ilustrará ahora con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitantes. Estos ejemplos se describen con referencia a las Figuras:

La Figura 1 muestra - como ya se mencionó anteriormente - ejemplos de secuencias polinucleotídicas que codifican una transcetolasa no modificada, y la Figura 2 muestra un conjunto de cebadores.

En particular, la figura 1 muestra el alineamiento de múltiples secuencias calculado mediante el programa clustalW (1.83) de las secuencias de aminoácidos de transcetolasa de *Escherichia coli* (TKT_ECOLI), *Bacillus subtilis* (TKT_BACSU), *Bacillus licheniformis* (TKT_BACLD), *Bacillus halodurans* (TKT_BACHD), *Corynebacterium glutamicum* (TKT_CORGL), *Saccharomyces cerevisiae* (TKT_YEAST), y *Ashbya gossypii* (TKT_ASHGO). Las posiciones que son homólogas/equivalentes al resto de aminoácido 357 de la transcetolasa de *B. subtilis* que se explican en uno de los siguientes ejemplos están en letra negrita. La numeración usada para esas posiciones se realiza según la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de *B. subtilis*. Este tipo de alineamiento se puede realizar con CLUSTAL o PILEUP usando parámetros estándar. Como se muestra, la secuencia de aminoácidos de las transcetolasas está muy conservada. En particular, en todas las transcetolasas mostradas y en muchas más transcetolasas no mostradas, la arginina 357 (numeración según la transcetolasa de *B. subtilis*) está conservada. Por lo tanto, el tipo de experimento que usa los conceptos y mutaciones dados aquí también se puede realizar con otras transcetolasas que tienen una arginina en una posición homóloga a la posición 357 de la secuencia de aminoácidos de transcetolasa de *B. subtilis*, como *Ashbya gossypii*, para mejorar la producción de riboflavina, derivados de riboflavina o compuestos que tienen como precursor ribosa-5-fosfato, xilulosa-5-fosfato o ribulosa-5-fosfato. También es posible sustituir un gen de transcetolasa original de un organismo por un gen mutante de transcetolasa de *B. subtilis* mutado en la posición 357 con o sin adaptación de la secuencia de ADN al nuevo organismo. No es esencial que los genes mutantes de transcetolasa se originen a partir de un organismo en el que se va a introducir. Las etapas prácticas necesarias para otro organismo hospedante están publicadas y son conocidas para un experto en el campo, y están esquematizadas en alguna otra parte.

Ejemplo 1: Aislamiento de ADN genómico a partir de *Bacillus subtilis*

Se preparó ADN_g usando el kit DNeasy Tissue Kit de Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Alemania) según la descripción del proveedor. Como fuente para las células bacterianas, se usó 1 ml de un cultivo durante toda la noche de 3 ml de *B. subtilis* en medio líquido VY (Becton Dickinson, Sparks, MD 21152, USA) incubado a 37°C (250 rpm). Al final, el ADN_g se eluyó en 200 µl de tampón AE (suministrado con el kit).

Ejemplo 2: Amplificación del gen de transcetolasa a partir de *Bacillus subtilis*

Para la amplificación del gen *tkt*, se usó ADN_g de *B. subtilis* PY79 (P. Youngman, J. Perkins, y R. Losick (1984), Construction of a cloning site near one end of Tn917 into which foreign DNA may be inserted without affecting transposition in *Bacillus subtilis* or expression on the transposon-borne *erm* gene. Plasmid 12:1-9; véase el Ejemplo 1). Según la secuencia de ADN genómico, el gen *tkt* contiene un sitio *Eco* RI dentro de su secuencia codificante (SEC ID NO: 1). Puesto que el sitio de restricción *Eco* RI se usa generalmente para la clonación en vectores de expresión de *E. coli*, tales como pQE80 (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Alemania), el sitio se suprimió sustituyendo C315 por una T, que es una mutación silenciosa que cambia el codón fenilalanínico de TTC a TTT. Para esto, se llevaron a cabo dos PCR distintas A y B. Para la PCR A se usaron las siguientes condiciones de PCR: 2 µM de cebador *tkt* 1S (según SEC ID No: 3, véase también la Figura 2) y *tkt* 2AS (según SEC ID No: 4,

Figura 2), 0,2 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, TTP, CTP), 2,5 U de una ADN polimerasa de corrección (Stratagene, Gebouw California, 1101 CB Amsterdam Zuidoost, Países Bajos), 100 ng de ADN genómico (Ejemplo 1) en el tampón apropiado como se suministra junto con la ADN polimerasa.

La regulación de la temperatura fue como sigue:

- 5 Etapa 1: 3 min. a 95°C
- Etapa 2: 30 s a 95°C
- Etapa 3: 30 s a 52°C
- Etapa 4: 30 s a 72°C
- Etapa 5: 5 min. a 72°C

10 Las etapas 2 a 4 se repitieron 35 veces.

La PCR B se realizó en las siguientes condiciones: 2 µM de cebador tkt 2S (según SEC ID No: 8, Figura 2) y tkt 1AS (según SEC ID No: 13, Figura 2), 0,2 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, TTP, CTP), 2,5 U de una ADN polimerasa de corrección (Stratagene, Gebouw California, 1101 CB Amsterdam Zuidoost, Países Bajos), 100 ng de ADN genómico (Ejemplo 1) en el tampón apropiado como se suministra junto con la ADN polimerasa.

15 La regulación de la temperatura fue como sigue:

- Etapa 1: 3 min. a 95°C
- Etapa 2: 30 s a 95°C
- Etapa 3: 30 s a 52°C
- Etapa 4: 2 min. a 72°C
- 20 Etapa 5: 5 min. a 72°C

Las etapas 2 a 4 se repitieron 35 veces.

Los dos productos de la PCR A y B se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y una extracción subsiguiente fuera del gel usando el kit de extracción en gel MinElute de Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Alemania). Usando la región solapante de los productos de la PCR A y B, fue posible ensamblarlos mediante una tercera PCR: 2 µM del cebador Rpi MutS (según SEC ID No: 5, Figura 2) y tkt 1ASohne (según SEC ID No: 6, Figura 2), 0,2 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, TTP, CTP), 2,5 U de una ADN polimerasa de corrección (Stratagene, Gebouw California, 1101 CB Amsterdam Zuidoost, Países Bajos), 100 ng de producto de la PCR A y producto de la PCR B en el tampón apropiado como se suministra junto con la ADN polimerasa.

- Etapa 1: 3 min. a 95°C
- 30 Etapa 2: 30 s a 95°C
- Etapa 3: 30 s a 53°C
- Etapa 4: 2,5 min. a 72°C
- Etapa 5: 5 min. a 72°C

Las etapas 2 a 4 se repitieron 35 veces.

35 Los productos de la PCR se purificaron con la ayuda del kit de purificación de PCR de Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Alemania) y se eluyeron en 50 µl de tampón de elución. El producto de la PCR se confirmó mediante una digestión con *Eco* RI. Para una confirmación adicional, se secuenció con los cebadores tkt 1S, tkt 2S, tkt 2AS, tkt 3S (según SEC ID No: 9, Figura 2), tkt 4S (según SEC ID No: 10, Figura 2), tkt 5S (según SEC ID No: 11, Figura 2), tkt 6S (según SEC ID No: 12, Figura 2), tkt 1AS.

40 **Ejemplo 3: Construcción de mutantes *tkt***

La estructura tridimensional de la transcetolasa de levadura estaba disponible junto con una selección de mutaciones que mostró influencia sobre la unión al sustrato de la transcetolasa de levadura (Nilsson, U., L. Meshalkina, Y. Lindqvist, y G. Schneider. 1997. En la posición R359 (número 357 en la transcetolasa de *B. subtilis*), la arginina original se sustituyó por casi todos los otros aminoácidos. La construcción de los mutantes se realizó

básicamente como se describe en el ejemplo 1. En la Figura 1 se muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos que comprende las transcetolasas de levadura, de *B. subtilis* y de otros organismos.

Usando como molde el gen *tkl* libre de *Eco* RI (Ejemplo 2), las mutaciones se introdujeron como ya se describió para la supresión del sitio *Eco* RI: Se usaron las siguientes condiciones de PCR para PCR A y B: 2 μ M de cebador Rpi MutS (A) o tkt 357nnn-S (B) y tkt 357AS (A) (según SEC ID No: 14, Figura 2) o tkt 1ASohne (B), 0,2 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, TTP, CTP), 2,5 U de una ADN polimerasa de corrección (Stratagene, Gebouw California, 1101 CB Amsterdam Zuidoost, Países Bajos), 100 ng del gen *tkl* libre de *Eco* RI (Ejemplo 2) en el tampón apropiado como se suministra junto con la ADN polimerasa. En el caso de la PCR B, el cebador sentido se escogió según el aminoácido que se introdujo: tkt 357N-S (según SEC ID No: 15, Figura 2) para asparagina, tkt 357Q-S (según SEC ID No: 16, Figura 2) para glutamina, tkt 357A-S (según SEC ID No: 17, Figura 2) para alanina, tkt 357K-S (según SEC ID No: 18, Figura 2) para lisina, tkt 357S-S (según SEC ID No: 19, Figura 2) para serina, tkt 357T-S (según SEC ID No: 20, Figura 2) para treonina, tkt 357H-S (según SEC ID No: 21, Figura 2) para histidina, tkt 357V-S (según SEC ID No: 22, Figura 2) para valina, tkt 357I-S (según SEC ID No: 23, Figura 2) para isoleucina, tkt 357L-S (según SEC ID No: 24, Figura 2) para leucina, tkt 357M-S (según SEC ID No: 25, Figura 2) para metionina, y tkt 357G-S (según SEC ID No: 26, Figura 2) para la introducción de glicina en la posición 357 de la transcetolasa de *B. subtilis*.

La regulación de la temperatura fue como sigue:

Etapa 1: 3 min. a 95°C

Etapa 2: 30 s a 95°C

Etapa 3: 30 s a 52°C

Etapa 4: 60 s a 72°C

Etapa 5: 5 min. a 72°C

Las etapas 2 a 4 se repitieron 35 veces.

Los dos productos de la PCR A y B se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y una extracción sucesiva fuera del gel usando el kit de extracción en gel MinElute de Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Alemania). El ensamblaje del producto de la PCR A y B se realizó en una tercera PCR: 2 μ M del cebador Rpi MutS y tkt 1ASohne, 0,2 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, TTP, CTP), 2,5 U de una ADN polimerasa de corrección (Stratagene, Gebouw California, 1101 CB Amsterdam Zuidoost, Países Bajos), 100 ng de producto de la PCR A y producto de la PCR B en el tampón apropiado como se suministra junto con la ADN polimerasa.

Etapa 1: 3 min. a 95°C

Etapa 2: 30 s a 95°C

Etapa 3: 30 s a 53°C

Etapa 4: 2,5 min. a 72°C

Etapa 5: 5 min. a 72°C

Las etapas 2 a 4 se repitieron 35 veces.

Los productos de la PCR de la transcetolasa se purificaron con el kit de purificación de PCR de Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Alemania) y se eluyeron en 50 μ l de tampón de elución. Los productos de la PCR se usaron para la transformación de *B. subtilis*.

Ejemplo 4: Construcción de una cepa de *B. subtilis* deficiente en transcetolasa

Para la introducción libre de marcadores de un gen de transcetolasa mutada en el locus *tkl* original del genoma de *B. subtilis*, se construyó una cepa deficiente en transcetolasa. Se combinaron dos fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR, que comprenden el par de bases 452 a 1042 y el par de bases 1562 a 2001 del gen de transcetolasa de *B. subtilis* (SEC ID NO: 2), con el casete génico de resistencia a neomicina (M. Itaya, K. Kondo, y T. Tanaka. 1989. A neomycin resistance gene cassette selectable in a single copy state in the Bacillus subtilis chromosome. Nucleic Acids Res 17:4410). Se usaron las siguientes condiciones de PCR para la PCR A: 2 μ M de cebador tkt Rec1S⁻ (según SEC ID No: 27, Figura 2) y tkt Rec1AS (según SEC ID No: 28, Figura 2), 0,2 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, TTP, CTP), 2,5 U de una ADN polimerasa de corrección (Stratagene, Gebouw California, 1101 CB Amsterdam Zuidoost, Países Bajos), 100 ng del gen *tkl* amplificado del Ejemplo 2 en el tampón apropiado como se suministra junto con la ADN polimerasa.

La regulación de la temperatura fue como sigue:

ES 2 425 756 T3

Etapa 1: 3 min. a 95°C

Etapa 2: 30 s a 95°C

Etapa 3: 30 s a 52°C

Etapa 4: 30 s a 72°C

5 Etapa 5: 5 min. a 72°C

Las etapas 2 a 4 se repitieron 30 veces.

La PCR B se realizó en las siguientes condiciones: 2 µM del cebador tkt Rec 2S (según SEC ID No: 29, Figura 2) y tkt Rec 2AS (según SEC ID No: 30, Figura 2), 0,2 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, TTP, CTP), 2,5 U de una ADN polimerasa de corrección (Stratagene, Gebouw California, 1101 CB Amsterdam Zuidoost, Países Bajos), 100 ng del gen *tkf* amplificado del Ejemplo 2 en el tampón apropiado como se suministra junto con la ADN polimerasa.

La regulación de la temperatura fue como sigue:

Etapa 1: 3 min. a 95°C

Etapa 2: 30 s a 95°C

Etapa 3: 30 s a 52°C

15 Etapa 4: 2 min. a 72°C

Etapa 5: 5 min. a 72°C

Las etapas 2 a 4 se repitieron 30 veces.

Los dos productos de la PCR A y B se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y una extracción subsiguiente fuera del gel usando el kit de extracción en gel MinElute de Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Alemania). Debido a las regiones solapantes de los dos productos de la PCR A y B con la secuencia del casete de resistencia a neomicina, es posible ensamblarlos mediante una tercera PCR: 2 µM de cebador tkt Rec I S y tkt Rec 2AS, 0,2 mM de cada nucleótido (ATP, GTP, TTP, CTP), 2,5 U de una ADN polimerasa de corrección (Stratagene, Gebouw California, 1101 CB Amsterdam Zuidoost, Países Bajos), 100 ng de producto de la PCR A, 100 ng de producto de la PCR B, y 100 ng de casete de resistencia a neomicina en el tampón apropiado como se suministra junto con la ADN polimerasa.

Etapa 1: 3 min. a 95°C

Etapa 2: 30 s a 95°C

Etapa 3: 30 s a 55°C

Etapa 4: 2,5 min. a 72°C

30 Etapa 5: 5 min. a 72°C

Las etapas 2 a 4 se repitieron 35 veces.

Se reunieron cinco PCRs que se ensamblan y se purificaron con el kit de purificación de PCR de Qiagen (QIAGEN GmbH, QIAGEN Str. 1, 40724 Hilden, Alemania) y se eluyeron en 50 µl de tampón de elución. El producto de la PCR correcto se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se usó para la transformación de *B. subtilis* PY79. La preparación de células de *B. subtilis* competentes se realizó según Kunst et al., 1988 (F. Kunst, M. Debarbouille, T. Msadek, M. Young, C. Mauel, D. Karamata, A. Klier, G. Rapoport, y R. Dedonder. 1988. Deduced polypeptides encoded by the Bacillus subtilis sacU locus share homology with two-component sensor-regulator systems. J Bacteriol 170: 5093-101). Se inocularon 2 ml de MNGE+Bacto Casamino Acid (CAA) (9 ml de medio MN (13,6 g/l de K₂HPO₄, 6,0 g/l de KH₂PO₄, 0,88 g/l de citrato de sodio*2H₂O), 1 ml de glucosa (20%), 40 µl de glutamato de potasio (40%), 50 µl de citrato de amonio y hierro(III) (2,2 mg/l, recientemente preparado), 100 µl de triptófano (8 mg/l), 30 µl de MgSO₄ (1 M), +/- 50 µl de Bacto Casamino Acid (20%, Becton Dickinson AG, Postfach, CH-4002 Basilea, Suiza) como una única colonia, y se incubó toda la noche a 37°C y 250 rpm. Este cultivo se usó para inocular 10 ml de MNGE+CAA (OD_{500nm} de partida de 0,1), y se incubó a 37°C con agitación (250 rpm) hasta que alcanzó una OD_{500nm} de 1,3. El cultivo se diluyó con el mismo volumen de MNGE sin CAA, y se incubó durante otra hora. Tras una etapa de centrifugación (10 min., 4000 rpm, 20°C), el sobrenadante se decantó a un tubo estéril. El pelote se resuspendió en 1/8 del sobrenadante conservado. Se diluyeron 300 µl de células en 1,7 ml de MN (1x), 43 µl de glucosa (20%) y 34 µl de MgSO₄ (1 M). Se añadieron 10 y 20 µl del producto de la PCR preparado a 400 µl de las células competentes diluidas, y se agitó durante 30 min. a 37°C. Se añadieron 100 µl de mezcla de expresión (500 µl de

extracto de levadura al 5% (Becton Dickinson AG, Postfach, CH-4002 Basilea, Suiza), 125 µl de CAA (20%), 1/100 de la concentración final de antibióticos (2 µg/ml de neomicina), si se usa para selección, y 750 µl de agua bidestilada estéril), y las células se agitaron durante 1 h a 37°C. Al final, las células se hicieron girar, se suspendieron en 200 µl del sobrenadante y se colocaron en placas TBAB (Becton Dickinson AG, Postfach, CH-4002 Basilea, Suiza) que contienen 2 µg/ml de neomicina.

Se hicieron crecer dos transformantes en medio VY (5 g/l de extracto de levadura (Becton Dickinson AG, Postfach, CH-4002 Basilea, Suiza), 25 g/l de caldo de infusión de ternera lechal (Sigma)). A partir de uno de los transformantes, denominado BS3402, se aisló ADN genómico como se describe en el Ejemplo 1, y la sustitución correcta del fragmento de ADN de transcetolasa del par de bases 1043 a 1561 por el casete del gen de neomicina se confirmó mediante una PCR estándar usando como cebadores tkt Rec 1S y tkt Rec 2AS. Como se esperaba para un mutante de supresión de transcetolasa, la cepa no pudo crecer en ribosa o gluconato como fuente de carbono única, y necesitó los tres aminoácidos aromáticos o ácido shikímico para crecer.

Ejemplo 5: Transformación de la cepa BS3402 de *B. subtilis* deficiente en transcetolasa con los genes de las variantes de transcetolasa

Se usaron 0,5 y 1 µg de ADN del gen de transcetolasa amplificado y sus variantes (Ejemplo 2 y 3) para transformar BS3402 como se describe en el Ejemplo 4. Las colonias positivas se identificaron mediante crecimiento en medio mínimo (2 g/l de glucosa y sorbitol en medio SMS (2 g/l de (NH₄)₂SO₄, 14 g/l de K₂HPO₄, 6 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de citrato trisódico, 0,2 g/l de MgSO₄*7H₂O, agar al 1,5% (Becton Dickinson AG, Postfach, CH-4002 Basilea, Suiza) y oligoelementos (concentrado de 500 veces: 5,0 g/l de MnSO₄*x1 H₂O, 2,0 g/l de CoCl₂*6 H₂O, 0,75 g/l de (NH₄)₆Mo₇O₂₄*4 H₂O, 0,5 g/l de AlCl₃*6 H₂O, 0,375 g/l de CuCl*2 H₂O)). Las colonias fueron visibles después de 24 a 48 h. Todos los transformantes fueron sensibles a neomicina, indicando la sustitución del gen de neomicina por los genes *tkt* de tipo salvaje y mutado introducidos.

Se aisló ADN genómico de los transformantes, y el gen *tkt* se amplificó mediante PCR como se describe en el Ejemplo 1. Las mutaciones introducidas se confirmaron mediante secuenciación. No se observaron intercambios nucleotídicos adicionales. Las cepas de *B. subtilis* generadas se denominaron: R357A - BS3403, R357H - BS3482, R357K - BS3484, R357G - BS3512, R357V - BS3487, R357I - BS3509, R357L - BS3507, R357T - BS3492, R357S - BS3490, R357M - BS3505, R357N - BS3486, R357Q - BS3488.

Ejemplo 6: Transducción de *B. subtilis* RB50::[pRF69] (documento EP 0405370) con lisado de bacteriófago PBS-1 de la cepa de tipo salvaje deficiente en transcetolasa BS3402

El trabajo de transducción con el fago PBS-1 se realizó como se describe en Henkin et al., 1984 (Henkin, T. M., y G. H. Chambliss. 1984. Genetic mapping of a mutation causing an alteration in *Bacillus subtilis* ribosomal protein S4. Mol Gen Genet 193:364-9). Para la preparación del lisado de PBS-1, se hizo crecer la cepa BS3402 en placas TBAB (5 µg/ml de neomicina) a 37°C toda la noche. Las células se usaron para inocular 25 ml de medio LB (Becton Dickinson AG, Postfach, CH-4002 Basilea, Suiza) hasta una OD de Klett 20-30 (usando el filtro verde). Cuando el 50% de las células fue móvil, se añadieron 0,2 ml del lisado del fago PBS-1 (Henkin, T. M., y G. H. Chambliss. 1984. Genetic mapping of a mutation causing an alteration in *Bacillus subtilis* ribosomal protein S4. Mol Gen Genet 193:364-9) a 0,8 ml de caldo de cultivo. Después de incubar durante 30 min. a 37°C con agitación, se añadieron 9 ml de medio LB. A esto le siguió otra etapa de incubación durante 30 min. a 37°C. Entonces se añadieron 4 µg/ml de cloranfenicol, y la incubación se continuó durante otras 2 horas. Finalmente, los tubos se transfirieron a una incubadora seca a 37°C en la que se dejaron toda la noche. A la mañana siguiente, el cultivo se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se almacenó a 4°C o se usó directamente para la transducción.

Para la transducción de la cepa RB50::[pRF69] que sobreproduce riboflavina, se hizo crecer la cepa en una placa TBAB a 37°C toda la noche. Las células de esta placa se usaron para inocular 25 ml de medio LB (Klett 20-30). Cuando el cultivo alcanzó Klett 175, se mezclaron 0,8 ml de las células con 0,2 ml de un lisado del fago PBS-1 de la cepa BS3402 preparado como se describe anteriormente. Después de incubar durante 30 min. a 37°C con agitación, las células se hicieron girar y se suspendieron en 1 ml de medio VY. A esto le siguió una incubación durante 1 h en las condiciones idénticas. Se colocaron 200 a 1000 µl de las células transducidas sobre una placa de selección que contiene 2 µg/ml de neomicina. Las colonias que crecieron se estudiaron para determinar la resistencia a la neomicina. Después de aislar ADNg (Ejemplo 1), se llevó a cabo una PCR estándar que usa los cebadores tkt 1 S y Rec 2AS para confirmar la sustitución del gen *tkt* de tipo salvaje por el constructo del Ejemplo 4. La cepa confirmada se denominó BS3523.

Ejemplo 7: Introducción de los genes de transcetolasa modificada en la cepa BS3523

Para la preparación de lisados de PBS-1 de las cepas BS3403, BS3482, BS3484, BS3486, BS3490, y BS3512, se hicieron crecer las cepas respectivas en placas TBAB (5 µg/ml de neomicina) toda la noche a 37°C. Las células de esas placas se usaron para inocular 25 ml de medio LB hasta una OD de Klett 20-30 (usando el filtro verde). Cuando el 50% de las células fue móvil (alrededor de Klett 150), se añadieron 0,2 ml del lisado del fago PBS-1 (Henkin, T. M., y G. H. Chambliss. 1984. Genetic mapping of a mutation causing an alteration in *Bacillus subtilis* ribosomal protein S4. Mol Gen Genet 193:364-9) a 0,8 ml del caldo de cultivo. Después de incubar durante 30 min. a 37°C con

agitación ligera o volteo (tambor giratorio), se añadieron 9 ml de medio LB a las células. Se incubaron durante otros 30 min. en las mismas condiciones. Se añadió cloranfenicol a una concentración de 4 µg/ml, y la incubación se continuó durante otras 2 horas. Los tubos se incubaron toda la noche a 37°C sin agitación. A la mañana siguiente, el cultivo se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se almacenó a 4°C o se usó directamente para la transducción subsiguiente. Para esto, la cepa deficiente en transcetolasa BS3523 (véase el ejemplo 6) se hizo crecer en una placa TBAB toda la noche a 37°C. Las células de la placa se usaron para inocular 25 ml de medio LB (Klett 20-30). El cultivo se incubó a 37°C con agitación. Cuando el cultivo alcanzó Klett 175, se mezclaron 0,8 ml de las células con 0,2 ml de lisado del fago PBS-1 de cada una de las cepas BS3403, BS3482, BS3484, BS3486, BS3490, y BS3512 como se describe anteriormente. Después de incubar durante 30 min. a 37°C con agitación, las células se hicieron girar y se suspendieron en 1 ml de medio VY. Después de incubar durante 1 h en las condiciones idénticas, las células se hicieron girar nuevamente, se suspendieron en 0,2 ml de medio 1xSMS, y se colocaron sobre placas de selección (1xSMS como se describe anteriormente con 1 g/l de glucosa, 1 g/l de sorbitol, y agarosa al 15%). Las colonias que crecieron se ensayaron en busca de la pérdida de resistencia a neomicina. Después de aislar ADNg (Ejemplo 1), se realizó una PCR estándar usando los cebadores tkt I S y Rec 2AS para amplificar el gen *tkt* a partir del ADN genómico. El gen *tkt* de las colonias que mostraron una sustitución del gen *tkt* inactivado por uno intacto se secuenciaron para confirmar la existencia de las mutaciones. Las cepas generadas se denominaron BS3525 (lisado de BS3484), BS3528 (lisado de BS3482), BS3530 (lisado de BS3486), BS3534 (lisado de BS3403), BS3535 (lisado de BS3490), BS3541 (lisado de BS3512).

Ejemplo 8: Crecimiento de las cepas mutantes de transcetolasa en glucosa y gluconato

Para evaluar el efecto de las mutaciones de transcetolasa sobre la viabilidad y crecimiento de *B. subtilis*, se determinó la velocidad de crecimiento máxima de las cepas generadas sobre 2 g/l de glucosa o gluconato. Se usó el siguiente medio: 1 x SMS (2 g/l de (NH₄)₂SO₄, 14 g/l de K₂HPO₄, 6 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de citrato trisódico, 0,2 g/l de MgSO₄·7H₂O), 2 g/l de glucosa o gluconato, 500 µg/l de extracto de levadura y disolución de oligoelementos como se describe en el Ejemplo 5. Se inocularon 25 ml del medio descrito en un matraz de 300 ml con pantallas deflectoras a partir de un cultivo durante toda la noche (5 ml de VY, resuspendido en 1 ml de VY reciente) hasta una OD de Klett 20 a 30. Se incubaron a 37°C con agitación (220 rpm). La OD de los cultivos fue seguida en intervalos de una hora durante la fase logarítmica. Durante la fase logarítmica, el intervalo se redujo a 30 min. Para la determinación de la velocidad de crecimiento máxima, se usaron al menos cuatro puntos de datos durante la fase logarítmica.

Tabla 1:

Mutante de <i>B. subtilis</i>	Velocidad de crecimiento en glucosa	% de tipo salvaje	Velocidad de crecimiento en gluconato	% de tipo salvaje	Relación
PY79 tipo salvaje	0,480	100%	0,351	100%	1,42/1
R357G	0,384	80%	0,300	86%	1,28/0,93
R357S	0,372	78%	0,254	72%	1,46/1,08
R357T	0,342	71%	0,240	68%	1,43/1,04
R357N	0,366	76%	0,231	66%	1,58/1,15
R357A	0,381	79%	0,225	64%	1,69/1,23
R357L	0,324	68%	0,189	54%	1,71/1,25
R357H	0,324	68%	0,174	50%	1,86/1,36
R357K	0,348	73%	0,171	49%	2,04/1,48
R357I	0,243	51%	0,108	31%	2,25/1,65
R357Q	0,228	48%	0,09	26%	2,53/1,83
R357V	0,297	62%	0,101	24%	2,94/2,58
R357M	0,258	54%	0,066	19%	3,91/2,84
R357Y	0,222	46%	0,06	17%	3,70/2,71
R357F	0,174	36%	0,038	11%	4,58/3,27
R357D	0,156	33%	0	0%	-

La cepa de tipo salvaje PY79 mostró, como se esperaba, la velocidad de crecimiento más elevada en ambos sustratos. Introduciendo las diferentes mutaciones en la posición 357 de transcetolasa, el crecimiento en gluconato se vio afectado, como se esperaba, mucho más que el crecimiento en glucosa. La reducción de la velocidad de crecimiento máxima en gluconato se usó como una medida para el efecto de la mutación de transcetolasa sobre el flujo a través de la derivación de fosfato de pentosa no oxidativa y sobre la acumulación de los fosfatos de pentosa. Se cubrió un amplio intervalo de velocidades de crecimiento mediante las mutaciones mostradas.

Ejemplo 9: Producción de riboflavina en matraces de agitación

Se inocularon 5 ml de VY que contiene cloranfenicol (10 µg/ml) con las cepas RB50::[pRF69], BS32525, BS3528, BS34530, BS3434, BS34335, y BS3441 productoras de riboflavina (véase el Ejemplo 7). Después de incubar toda la noche, las células se hicieron girar (15 min., 4000 rpm) y se suspendieron en 1 ml de medio de cribado (2xSMS, 10 g/l de glucosa, 1 g/l de extracto de levadura, y oligoelementos como se describe en el ejemplo 5). Se inoculó un matraz de 200 ml con pantallas deflectoras que contiene 25 ml de medio de cribado con 0,25 ml de las células resuspendidas. Los cultivos se incubaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera saturada con agua. Después de un tiempo de incubación de 48 h, durante el cual se usó la glucosa suministrada en todos los cultivos, se tomó una muestra de 0,5 ml de los cultivos, se añadieron 35 µl de NaOH 4 N, y la mezcla se sometió a remolino durante 1 min. Después se añadieron directamente 465 µl de tampón de fosfato potásico 1 M, pH 6,8. La mezcla se aclaró mediante centrifugación durante 5 min. a 14000 rpm (centrífuga Eppendorf 5415D). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se usaron dos métodos diferentes para la determinación de la riboflavina. Para la determinación calorimétrica, se diluyeron 200 µl del sobrenadante con 800 µl de agua. La absorción a 444 nm se multiplicó con el factor de 0,03305 para obtener los gramos de riboflavina por litro de medio. Para los resultados finales, los valores obtenidos se corrigieron para las diferencias de volumen. La concentración de riboflavina también se determinó mediante HPLC según el Ejemplo 10. Los resultados se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2:

Cepa	Resultado de UV Riboflavina	% de RB50::[pRF69]	Resultado de HPLC (riboflavina)	% de RB50::[pRF69]
	[mg/l]		[mg/l]	
BS3528(R357H)	179	171%	139	193%
BS3535(R357S)	173	166%	136	188%
BS3534(R357A)	144	138%	124	172%
BS3525(R357K)	148	142%	112	155%
BS3559(R357Q)	134	129%	103	143%
BS3530(R357N)	126	120%	93	129%
RB50::[pRF69]	104	100%	72	100%
BS3541(R357G)	92	89%	66	92%
BS3523(supresión)	90	87%	58	81%

Casi todas las cepas de *Bacillus* que contienen una mutación de transcetolasa mostraron una producción de riboflavina claramente aumentada, mientras que la cepa negativa a transcetolasa produjo menos riboflavina que la cepa de control. En el caso de la mutación R357H, la concentración de riboflavina casi se duplicó.

Ejemplo 10: Fermentación de riboflavina

Los experimentos de fermentación se llevaron a cabo como se describe en el documento EP 405370.

Las fermentaciones se realizaron con las cepas (1) RB50::[pRF69], (2) BS3534 (R357A), y (3) BS3528 (R357H). A un tiempo de fermentación de 24 horas y de 48 horas, se midieron las concentraciones de riboflavina y la biomasa (peso seco celular) en el caldo de cultivo. Como se muestra en la Tabla 3, la cepa progenitora RB50::[pRF69] produjo 9,8 g/l de riboflavina en 48 h, con un rendimiento en sustrato de 3,59% (p/p). La biomasa se produjo con un rendimiento en sustrato de 20,3% (p/p). Los derivados de RB50::[pRF69] que expresan un gen de transcetolasa modificada mostraron incrementos significativos en la producción de riboflavina. BS3528 y BS3534 produjeron 11,7 g/l y 14,6 g/l, respectivamente. Esto corresponde a un rendimiento en glucosa de 4,23% con BS3528 y 5,14% con

BS3534, respectivamente (Tabla 3). Estos resultados demuestran que la modificación de la actividad de transcetolasa conduce a un incremento en la productividad de riboflavina.

Tabla 3: Rendimiento de riboflavina y de biomasa en sustrato después de un tiempo de fermentación de 48 h

	Rendimiento B2		Diferencia	Rendimiento de Biomasa		Diferencia
	[%] (p/p)			[%](p/p)		
RB50::[pRF69]	3,59	± 0,27		20,26	± 0,80	
BS3534	5,14	± 0,09	+ 43%	18,92	± 0,37	- 7%
BS3528	4,23	± 0,19	+ 18%	17,78	± 1,73	- 12%

5 **Ejemplo 11: Métodos analíticos para la determinación de riboflavina**

Para la determinación de riboflavina, se puede usar el siguiente método analítico (Bretzel et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22, 19-26, 1999).

10 El sistema cromatográfico fue un sistema Hewlett-Packard 1100 equipado con una bomba binaria, un termostato de columna y un automuestreador enfriado. Se usó en línea tanto un detector de conjunto de diodos como un detector de fluorescencia. Se registraron dos señales, UV a 280 nm y traza de fluorescencia a excitación de 446 nm, emisión 520 nm.

Se usó una columna de acero inoxidable Supercosil LC-8-DB (150 x 4,6 mm, tamaño de partículas 3 µm) junto con un cartucho de guarda. Las fases móviles fueron 100 mM de ácido acético (A) y metanol (B). Se usó una elución en gradiente según el siguiente esquema:

Tiempo [min.]	%A	%B
0	98	2
6	98	2
15	50	50
25	50	50

15 La temperatura de la columna se ajustó a 20°C, y el caudal fue 1,0 ml/min. El tiempo del experimento fue 25 min.

Las muestras de fermentación se diluyeron, se filtraron y se analizaron sin tratamiento adicional. La riboflavina se cuantificó mediante comparación con un patrón externo. Los cálculos se basan en la señal de UV a 280 nm. Como material estándar, se usó riboflavina adquirida de Fluka (9471 Buchs, Suiza) (pureza ≥ 99,0%).

20 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> DSM IP Assets BV

<120> Enzima modificada y su uso

<130> 24818

<160> 30

25 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2004

<212> ADN

30 <213> *Bacillus sp.*

ES 2 425 756 T3

<400> 1

atggatacaa ttgaaaagaa atcagttgct accattcgc	cactgtcaat agacgctatt	60
gaaaaagcaa attctgggtca cccagggatg ccgatgggag	ccgctccaat ggcatacacg	120
ctgtggacaa aatttatgaa cgtaagtccg gcaaaccctg	gctgggttaa cctgaccgt	180
tttgttttat ctgctggaca cgggtcagca ctattataca	gcatgcttca tttaaagcggg	240
tttgatctta gtattgaaga tcttaaggga ttccgccagt	ggggcagcaa aacaccagga	300
catccggaat tcggacatac tgccgggtgtt gatgctacaa	caggtccgct tggccaagga	360
attgccatgg cagtccgtat ggcaattgct gaacgccatt	tagcggaaac atacaaccgc	420
gattcattta acgtagtcga tcattataca tacagtattt	gcggtgatgg tgatttaatg	480
gaaggtattt cttctgaagc cgcttcactc gcaggccatc	ttcagcttgg ccgtctgatc	540
gtactatacg attctaataga catctctctt gatggagacc	tcgaccgttc attctctgaa	600
aacgtgaaac agcgttttga agcaatgaat tgggaagttc	tttatggtga ggatggaaac	660
aatattgaag aattaacagc ggctatcgaa aaagcacgcc	aaaatgaaaa gaaacctaca	720
ttaattgaag tgaaaacgac aatcggattc ggttcaccta	accgtgccgg tacatccggt	780
gttcacggtg cgccgcttgg taaagaagaa agcaaattaa	caaagaagc ttacgcgtgg	840
acatatgaag aagacttcta cgttccgtca gaagtttatg	agcatttcgc tgtagctgtt	900
aaagaatcag gtgagaaaaa agaacaagaa tggaatgctc	aattcgctaa atataaagaa	960
gtttatcctg aacttgctga acagcttgaa ctggcaatca	aaggagagct tccgaaggac	1020
tgggatcaag aggttctctgt gtatgaaaaa ggaagcagtt	tggcatcccg tgcacttcc	1080
ggtgaagttc tcaacggact tgcgaaaaaa attcctttct	ttgtcggagg ttctgctgac	1140
ctagcgggat cgaacaaaac gactattaa aatgccggtg	attttacagc ggttgattac	1200
tcaggcaaaa acttctgggtt tgggtgtacgt gaatttgcga	tgggtgcggc cttaaaccggt	1260

ES 2 425 756 T3

atggcgcttc atggcggtct tegtgtattc ggcggaactt tctttgtctt ctctgattac 1320
ctgcgtcctg cgattcgect tgcagcgta atgggccttc ctgtgacata tgtcttcaca 1380
catgacagta ttgcggttgg tgaagacggt ccgacgcacg agcctggtga acagcttgct 1440
tcaactccgtg cgatgcctaa cctttctttg atccgtccag cagacggcaa tgagacagca 1500
gcagcatgga agcttgcaat gcaaagcact gaccacccaa cagcgctagt gcttacacgt 1560
caaaaccttc ctaccatcga tcaaaccatc gaagaagcat tggcaggagt agaaaaagg 1620
gcatatgtcg tttctaaatc taaaaacgaa acacccgacg ctcttctcat cgcttccgga 1680
tcagaggtag gtcttgcaat tgaagcgcag gctgaattgg caaaagaaaa tatcgaatgt 1740
tctgttgca gcatgccttc aatggaccgt tttgagaaac aatctgatga atacaaaaac 1800
gaagtccttc ctgcagatgt gaaaaaacgt cttgcaattg aaatgggctc atcatttgg 1860
tggggcaaat acacggggct tgaaggtgac gttctcggca tagaccgatt cgggtcatct 1920
gctcctggtg aaaccatcat taacgaatac ggcttctcag ttccgaacgt agtgaatcga 1980
gttaaggcat taatcaataa gtaa 2004

<210> 2

<211> 667

<212> PRT

5 <213> *Bacillus sp.*

<400> 2

Met Asp Thr Ile Glu Lys Lys Ser Val Ala Thr Ile Arg Thr Leu Ser
1 5 10 15
Ile Asp Ala Ile Glu Lys Ala Asn Ser Gly His Pro Gly Met Pro Met
20 25 30
Gly Ala Ala Pro Met Ala Tyr Thr Leu Trp Thr Lys Phe Met Asn Val
35 40 45
Ser Pro Ala Asn Pro Gly Trp Phe Asn Arg Asp Arg Phe Val Leu Ser
50 55 60
Ala Gly His Gly Ser Ala Leu Leu Tyr Ser Met Leu His Leu Ser Gly
65 70 75 80
Phe Asp Leu Ser Ile Glu Asp Leu Lys Gly Phe Arg Gln Trp Gly Ser
85 90 95

ES 2 425 756 T3

Lys Thr Pro Gly His Pro Glu Phe Gly His Thr Ala Gly Val Asp Ala
 100 105 110
 Thr Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Ile Ala Met Ala Val Gly Met Ala
 115 120 125
 Ile Ala Glu Arg His Leu Ala Glu Thr Tyr Asn Arg Asp Ser Phe Asn
 130 135 140
 Val Val Asp His Tyr Thr Tyr Ser Ile Cys Gly Asp Gly Asp Leu Met
 145 150 155 160
 Glu Gly Ile Ser Ser Glu Ala Ala Ser Leu Ala Gly His Leu Gln Leu
 165 170 175
 Gly Arg Leu Ile Val Leu Tyr Asp Ser Asn Asp Ile Ser Leu Asp Gly
 180 185 190
 Asp Leu Asp Arg Ser Phe Ser Glu Asn Val Lys Gln Arg Phe Glu Ala
 195 200 205
 Met Asn Trp Glu Val Leu Tyr Val Glu Asp Gly Asn Asn Ile Glu Glu
 210 215 220
 Leu Thr Ala Ala Ile Glu Lys Ala Arg Gln Asn Glu Lys Lys Pro Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Glu Val Lys Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Pro Asn Arg Ala
 245 250 255
 Gly Thr Ser Gly Val His Gly Ala Pro Leu Gly Lys Glu Glu Ser Lys
 260 265 270
 Leu Thr Lys Glu Ala Tyr Ala Trp Thr Tyr Glu Glu Asp Phe Tyr Val
 275 280 285
 Pro Ser Glu Val Tyr Glu His Phe Ala Val Ala Val Lys Glu Ser Gly
 290 295 300
 Glu Lys Lys Glu Gln Glu Trp Asn Ala Gln Phe Ala Lys Tyr Lys Glu
 305 310 315 320
 Val Tyr Pro Glu Leu Ala Glu Gln Leu Glu Leu Ala Ile Lys Gly Glu
 325 330 335

ES 2 425 756 T3

Leu Pro Lys Asp Trp Asp Gln Glu Val Pro Val Tyr Glu Lys Gly Ser
 340 345 350

Ser Leu Ala Ser Arg Ala Ser Ser Gly Glu Val Leu Asn Gly Leu Ala
 355 360 365

Lys Lys Ile Pro Phe Phe Val Gly Gly Ser Ala Asp Leu Ala Gly Ser
 370 375 380

Asn Lys Thr Thr Ile Lys Asn Ala Gly Asp Phe Thr Ala Val Asp Tyr
 385 390 395 400

Ser Gly Lys Asn Phe Trp Phe Gly Val Arg Glu Phe Ala Met Gly Ala
 405 410 415

Ala Leu Asn Gly Met Ala Leu His Gly Gly Leu Arg Val Phe Gly Gly
 420 425 430

Thr Phe Phe Val Phe Ser Asp Tyr Leu Arg Pro Ala Ile Arg Leu Ala
 435 440 445

Ala Leu Met Gly Leu Pro Val Thr Tyr Val Phe Thr His Asp Ser Ile
 450 455 460

Ala Val Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Glu Pro Val Glu Gln Leu Ala
 465 470 475 480

Ser Leu Arg Ala Met Pro Asn Leu Ser Leu Ile Arg Pro Ala Asp Gly
 485 490 495

Asn Glu Thr Ala Ala Ala Trp Lys Leu Ala Val Gln Ser Thr Asp His
 500 505 510

Pro Thr Ala Leu Val Leu Thr Arg Gln Asn Leu Pro Thr Ile Asp Gln
 515 520 525

Thr Ser Glu Glu Ala Leu Ala Gly Val Glu Lys Gly Ala Tyr Val Val
 530 535 540

Ser Lys Ser Lys Asn Glu Thr Pro Asp Ala Leu Leu Ile Ala Ser Gly
 545 550 555 560

Ser Glu Val Gly Leu Ala Ile Glu Ala Gln Ala Glu Leu Ala Lys Glu
 565 570 575

ES 2 425 756 T3

Asn Ile Asp Val Ser Val Val Ser Met Pro Ser Met Asp Arg Phe Glu
580 585 590

Lys Gln Ser Asp Glu Tyr Lys Asn Glu Val Leu Pro Ala Asp Val Lys
595 600 605

Lys Arg Leu Ala Ile Glu Met Gly Ser Ser Phe Gly Trp Gly Lys Tyr
610 615 620

Thr Gly Leu Glu Gly Asp Val Leu Gly Ile Asp Arg Phe Gly Ala Ser
625 630 635 640

Ala Pro Gly Glu Thr Ile Ile Asn Glu Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn
645 650 655

Val Val Asn Arg Val Lys Ala Leu Ile Asn Lys
660 665

<210> 3

<211> 37

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400>3

aggagaaatc atatggatac aattgaaaag aaatcag 37

10 <210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 4

ggacatactg ccggtgtga tg 22

<210> 5

<211> 36

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

aattaaatga attcattaa gaggagaaat catatg 36

<210> 6

<211> 35

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 6

aattaaatgg atcccttatt gattaaatgcc ttaac 35

10 <210> 7

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 7

gttctgaggt cattactgg 19

<210> 8

<211> 22

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 8

25 ggacatactg ccggtgtga tg 22

<210> 9

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador

<400> 9

ttgaagaatt aacagcggc 19

<210> 10

35 <211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> Cebador
<400> 10
cagcttgaac tggcaatc 18
5 <210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
10 <223> Cebador
<400> 11
gtcctgcgat tgccttg 18
<210> 12
<211> 18
15 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 12
20 acgaaacacc cgacgctc 18
<210> 13
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial
25 <220>
<223> Cebador
<400> 13
aatataatgg atccttactt atgattaat gcctaac 38
<210> 14
30 <211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
35 <400> 14
ggatgcaaaa ctgcttc 18
<210> 15

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 15

agcagtttgg catccaacgc atctccggt gaagtc 37

<210> 16

<211> 37

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 16

15 agcagtttgg catccaacgc atctccggt gaagtc 37

<210> 17

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cebador

<400> 17

agcagtttgg catccgcagc atctccggt gaagtc 37

<210> 18

25 <211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

30 <400> 18

agcagtttgg catccaacgc atctccggt gaagtc 37

<210> 19

<211> 37

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 19
agcagtttgg catcctcagc atcttccggt gaagttc 37
<210> 20
<211> 37
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 20
10 agcagtttgg catccacagc atcttccggt gaagttc 37
<210> 21
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Cebador
<400> 21
agcagtttgg catcccatgc atcttccggt gaagttc 37
<210> 22
20 <211 > 37
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
25 <400> 22
agcagtttgg catccgtggc atcttccggt gaagttc 37
<210> 23
<211> 37
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 23
agcagtttgg catccattgc atcttccggt gaagttc 37
35 <210> 24
<211> 37
<212> ADN

<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 24
5 agcagtttgg catccttggc atctccggt gaagtc 37
<210> 25
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> Cebador
<400> 25
agcagtttgg catccatggc atctccggt gaagtc 37
<210> 26
15 <211> 37
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador
20 <400> 26
agcagtttgg catccggtgc atctccggt gaagtc 37
<210> 27
<211>21
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 27
ggggcagcaa aacaccagga c 21
30 <210> 28
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
35 <223> Cebador
<400> 28
gatctcgacc ctgcagccca agcacacagg aacctctga tccc 44

<210> 29

<211> 47

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Cebador

<400> 29

gcgtaaaac gcataccatt ttgaacaaaa ccttcctacc atcgatc 47

<210> 30

10

<211> 24

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

15

<400> 30

cttattgatt aatgccttaa ctcg 24

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la producción de sustancias para las que ribosa-5-fosfato, ribulosa-5-fosfato, o xilulosa-5-fosfato es un precursor biosintético, que comprende cultivar un microorganismo en un medio adecuado en condiciones que permiten la expresión de una transcetolasa modificada y separar el producto de fermentación del medio, seleccionándose dicho microorganismo de un microorganismo productor de riboflavina seleccionado de *Bacillus* o *Corynebacterium* genéticamente manipulado mediante ingeniería con un polinucleótido que codifica dicha transcetolasa modificada que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición 357 como se muestra en SEC ID NO: 2, y en el que la velocidad de crecimiento de dicho microorganismo sobre una fuente de carbono que es metabolizada exclusivamente por la ruta de fosfato de pentosa se reduce entre 10 a 90% en comparación con una célula hospedante que contiene una transcetolasa no modificada, y en el que el microorganismo sigue siendo prototrófico para aminoácidos aromáticos.
- 10 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la transcetolasa es una transcetolasa de *Bacillus*.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el polinucleótido que codifica la transcetolasa se muestra en SEC ID NO:1.
- 15 4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el producto de fermentación se selecciona de riboflavina, un precursor de riboflavina, FMN, FAD, fosfato de piridoxal y uno o más de sus derivados.
5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que el producto de fermentación es riboflavina.
- 20 6. Uso de una transcetolasa modificada para la producción de riboflavina en un microorganismo, en el que la secuencia de aminoácidos de la transcetolasa modificada contiene al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición 357 como se muestra en SEC ID NO:2, y en el que la velocidad de crecimiento de dicho microorganismo en una fuente de carbono que es metabolizada exclusivamente por la ruta de fosfato de pentosa está reducida entre 10 a 90% en comparación con una célula hospedante que contiene una transcetolasa no modificada.
- 25 7. Uso de un microorganismo para la producción de riboflavina, seleccionándose dicho microorganismo de un microorganismo productor de riboflavina seleccionado de *Bacillus* o *Corynebacterium* genéticamente manipulado mediante ingeniería con un polinucleótido que codifica dicha transcetolasa modificada que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una mutación en una posición que corresponde a la posición 357 como se muestra en SEC ID NO:2, y en el que la velocidad de crecimiento de dicho microorganismo en una fuente de carbono que es metabolizada exclusivamente por la ruta de fosfato de pentosa se reduce entre 10 a 90% en comparación con una célula hospedante que contiene una transcetolasa no modificada, y en el que el microorganismo sigue siendo prototrófico para aminoácidos aromáticos.
- 30

Figura 1:

TKT_ECOLI: *Escherichia coli*
 TKT_BACSU: *Bacillus subtilis*
 TKT_BACLD: *Bacillus licheniformis*
 TKT_BACHD: *Bacillus halodurans*
 TKT_CORGL: *Corynebacterium glutamicum*
 TKT_YEAST: *Saccharomyces cerevisiae*
 TKT_ASHGO: *Ashbya gossypii*

Alineamiento de secuencias múltiples CLUSTAL W (1.83)

```

TKT1_ECOLI -----MSSRKELANAI RALSMDAVQKAKSGHPGAPMGMAIDAE
TKT2_ECOLI -----MSRKDLANAI RALSMDAVQKANS GHGHPGAPMGMAIDAE
TKT_BACSU -----MDTIEKKS VAT IRTL SIDAI EKANS GHGHPGMPMGAA PMAY
TKT_BACLD -----MKTIELKSVAT IRTL SIDAI EKAKSGHPGMPMGTA PMAY
TKT_BACHD -----MSKHVEQLAVNT IRTL SIDSV EKANS GHGHPGMPMGAA PMAF
TKT_CORGL MTTLTLSPELQALT VRNYP SDWSDVDVT KAVDT VRVLAADAVENCGSGHPGTAMSLAPLAY
TKT1_YEAST -----TQFTDIDKLA VSTIRILAVDT VSKANS GHGHPGAPLGMAPA AH
TKT_ASHGO -----MTQFSDVDRLAVST IRLLSVDQVSKANS GHGHPGAPLGLAPA AH
TKT2_YEAST -----MAQFSDIDKLA VSTLRLLSVDQVES AQSGHPGAPLGLAPA VH

TKT1_ECOLI VLWRDFLKHN PQNP SWADRDRFVLSNGHGSMLIYSL LHLTGYDLPMEELKNFRQLH SKTP
TKT2_ECOLI VLWNDFLKHN PTDPTWYDRDRFVLSNGHASM LLYSL LHLTGYDLPLEELKNFRQLH SKTP
TKT_BACSU TLWTKFMNVS PANPGWFNRDRFVLSAGHGSALLYSMLHL S GFDLSIEDLKGFRQWGS KTP
TKT_BACLD ALWTKMMNVSPENPNWFNRDRFVLSAGHGSMLLYSMLHL S GYDVSIEDLKNFRQWGS KTP
TKT_BACHD CLWTKFMNHN PANPDWVNRDRFVLSAGHGSMLLYSMLHL TGYDLSLEELQNFRQWGS KTP
TKT_CORGL TLYQRMNVDPQDTNWAGRDRFVLS CGHSSLTQYIQLYLG GFGLEMDL KALRTWDSLTP
TKT1_YEAST VLWSQMR-MNPTNPDWINRDRFVLSNGHAVA LLYSMLHLTGYDLSIEDLKQFRQLGSRTP
TKT_ASHGO VVWKQMR-LNPKSPKWINRDRFVLSNGHACALLYSMLHL FGYDLSIEDLKQFRQVGS KTP
TKT2_YEAST VIFKQLR-CNPNEHWINRDRFVLSNGHSCALLYSMLHL LGYDYSIEDLRQFRQVNSRTP

TKT1_ECOLI GHPEVGYTAGVETTTG PLGQGI ANAVGMAIAEKT LAAQFN---RPGHDIVDHYTYAFMGD
TKT2_ECOLI GHPEIGYTPGVETTTG PLGQGLANAVGLAIAERT LAAQFN---QPDHEIVDHFTYVFMGD
TKT_BACSU GHPEFGHTAGVDATTG PLGQGI ANAVGMAIAERHLAETYN---RDSFNVVDHYTYVICGD
TKT_BACLD GHPEFGHTPGVDATTG PLGQGI MAVGMALAE RHLAETYN---RDDYRVVDHYTYVICGD
TKT_BACHD GHPEYGHTPGVEATTG PLGQGVAMAVGMAMAERHLA ETYN---RDGYNIVDHYTYVICGD
TKT_CORGL GHPEYRHTKGVEITTG PLGQGLASAVGMAMAARRERGLFDPTAAEGES PFDHHIYVIASD
TKT1_YEAST GHPEF-ELPGVEVTTG PLGQGISNAVGMAMAQANLAATYN---KPGFTLSDNYTYVFLGD
TKT_ASHGO GHPEY-ELPGVEVTTG PLGQGISNAVGLAIAQANLAATYN---KPGYELSDNYTYVFLGD
TKT2_YEAST GHPEF-HSAGVEITSG PLGQGISNAVGMAMAQANFAATYN---EDGFPISDSYTF AIVGD

TKT1_ECOLI GCMMEGISHEVCSLAGTLKLGKLI AFYDDNGI SIDGHVEGWFTDDTAMRFEAYGWHVIRD
TKT2_ECOLI GCLMEGISHEVCSLAGTLGLGKLI GFYDHNGI SIDGETEGWFTDDTAKRFEAYHWHVIHE
TKT_BACSU GDLMEGISSEEAASLAGHLQLGRLIVLYDSNDI SLDGDLDRSFSENVKQRF EAMNWEVLYV
TKT_BACLD GDLMEGISSEEAASLAGHLNLRGRLIVLYDSNDI SLDGELNRSFSENVKQRF EAMNWEVLYV
TKT_BACHD GDLMEGVSAEAASLAGHLKLRMILLYDSNDI SLDGDLHHSFSESVEDRFKAYGWHVVRV
TKT_CORGL GDLQEGVTSEASSIAGTQQLGNLIVFWDNRI SIEDNTEIAFNEDVVARYKAYGWQTIEV
TKT1_YEAST GCLQEGISSEASSLAGHLKLGNLIAIYDDNKITIDGATSISFDEDVAKRYEAYGWEVLYV
TKT_ASHGO GCLQEGVSSEASSLAGHLKLGNLIAFYDDNKITIDGHTEVSFDEDV LKRYEAYGWEVLNV
TKT2_YEAST GCLQEGVSSETSSLAGHLQLGNLITFYDSNSI SIDGKTSYSFDEDV LKRYEAYGWEVMEV

TKT1_ECOLI IDGH-DAASIKRAVEEARAVTDKPSLLMCKTI IGFGSPNKAGTHDSHGAPLGD AEIALTR
TKT2_ECOLI IDGH-DPQAVKEAILEAQSVKDKPSLI ICRTVIGFGSPNKAGKEEAHGAPLGEEVALAR
TKT_BACSU EDGN-NIEELTAAIEKARQNEKKPTLIEVKTTIGFGSPNRAGTSGVHGAPLGKEESK LTK
TKT_BACLD EDGN-NIAEITAAIEKAKQNEKQPTLIEVKTTIGFGSPNRAGTSGVHGAPLGSEEAK LTK
TKT_BACHD EDGN-NLDEIAKAI EEAKADER-PSLIEVKTTIGFGSPNKGKSVSHGAPLGADEVK LTK
TKT_CORGL EAGE-DVAAIEAAVAEAKKDKRPTFIRVRTI IGFPAPTMMNTGAVHGAALGAAEVAATK
TKT1_YEAST ENGNEDLAGIAKAI AQAKLSKDKPTLIKMTT TIGYGS LH-AGSHSVHGAPLKADDVKQLK
TKT_ASHGO ANGDENLEDIASALEQAKKNKDKPTLIKLT T TIGFGSLN-AGSHTVHGAPLKADDVKQLK
TKT2_YEAST DKGDDDMESIS SALEKAKLSKDKPTI IKVTTTIGFGSLQ-QGTAGVHGSA LKADDVKQLK
    
```

TKT1_ECOLI EQLGWKYAP-FEIPSEIYAQW--DAKEAGQAKESAWNEKFAAYAKAYPQEADEFTRRMKG
 TKT2_ECOLI QKLGWHHP- FEIPKEIYHAW--DAREKGEKAQQSWNEKFAAYKKAHPQLAEDEFTRMSG
 TKT_BACSU EAYAWTYEEDFYVPSEVYEHFAVAVKESGEKKEQEWNAQFAKYKEVYPELAEQLELAIKG
 TKT_BACLD EAYEWTYEEDFYVPSEVYEHFNETVKEAGKKKEAENELFSAYKKAHP ELAELELAIKG
 TKT_BACHD EAYEWTYENEFHIPEEVAAYY-EQVKQQAEEKESWNELEFAQYKKAYPELASQFELAVHG
 TKT_CORGL TELGFDP EAHFAIDDEVI AHT-RSLAERAAQKKAAWQVKFDEWAAAANPENKALFDRLNSR
 TKT1_YEAST SKFGFNPDKSFVVPQEVYDHYQKTIKPGVEANNKWNKLFSEYQKKEPELGAELARRLSG
 TKT_ASHGO TKLGFNPDES FIVPQEVYDLYHNSTIQPGAESEKEWNALLEKYAGEYPKEAAELKRRLAG
 TKT2_YEAST KRWGFDPNKS FVVPQEVYDYYKKT VVEPGQKLN EEWDRMFEEYKTKFPEKKGELQRRING

"357"

TKT1_ECOLI EMPSPDFAKAKEFI AKLQANPAKIASRKASQNAIEAFGPLLPEFLGGSADLAPSNLTLWS
 TKT2_ECOLI GLPKDWEKTTQKYINELQANPAKIATR KASQNTLNAYGPMLPELLGGSADLAPSNLTIWK
 TKT_BACSU ELPKDWDQEV P----VYEKG-SSLASRASSGEVLNGLAKKI PFFVGG SADLAGSNKTTIK
 TKT_BACLD ELPEGWDQKVP----VYEKG-SSLASRASSGEVLNGLIAQQV PFFGGSADLAGSNKTTIK
 TKT_BACHD DLPEGWDAVAP----SYEVG-KSVATR SSSGEALNAFAKTVPQLFGGSADLASSNKTLIK
 TKT_CORGL ELPAGYADELP----TWDADEKGVATRKASEAALQALGKTLPELWGG SADLAGSNNTVIK
 TKT1_YEAST QLPANWESKLP----TYTAKDSAVATRK LSETVLEDVYNQLPELIGGSADLTPSNLTRWK
 TKT_ASHGO KL PENWESKLP----VYKPTDSAVASRKLSEIVLQSI FEDVPELIGGSADLTPSNLTRTT
 TKT2_YEAST ELPEGWEKHL P----KFTPDDDALATRKTSQQVLTNMVQVLP E LIGGSADLTPSNLTRWE

TKT1_ECOLI GSKAINEDAAG-----NYIHYGVREFGMTAIANGISLHGG-FLPYTSTFLMFVEY
 TKT2_ECOLI GSVSLKEDPAG-----NYIHYGVREFGMTAIANGIAHGG-FVPYATATFLMFVEY
 TKT_BACSU NAGDFTA VDYS-----GKNFWFGVREFAMGAALNGMALHGG-LRVFGGTFVVFSDY
 TKT_BACLD NGGDVSAKDYA-----GRNIWFGVREFAMGAALNGMALHGG-LRVFGGTFVVFSDY
 TKT_BACHD GEANFSRDDYS-----GRNVWFGVREFAMGAAMNGMALHGG-LKVF GATFFVVFSDY
 TKT_CORGL GSPSFGPESISTETWSAEPYGRNLHFGIREHAMG SILNGISLHGG-TRPYGGTFLIFSDY
 TKT1_YEAST EALDFQPPSSG----SGNYSGRYIRYGI REHAMGAIMNGISAFGANYPYGGTFLNFVSY
 TKT_ASHGO NAVDFQPPQSG----LGDYSGRYIRFGVREHGMGAI INGLSAYGANYKVF GATFLNFVSY
 TKT2_YEAST GAVDFQPPITQ----LGNYAGRYIRYGVREHGMGAIMNGISAFGANYPYGGTFLNFVSY

TKT1_ECOLI ARNAVRMAALMKORQVMVYTHDSIGLGEDGPTHQPVEQVASLRVTPNMSTWRPCDQVESA
 TKT2_ECOLI ARNAARMAALMKARQIMVYTHDSIGLGEDGPTHQAVEQLASLRLTPNFSTWRPCDQVEAA
 TKT_BACSU LRPAIRLAALMGLPVTYVFTHDSI AVGEDGPTHEPVEQLASLRAMPNLSLIRPADGNETA
 TKT_BACLD LRPAIRLAALMGLPVTYVFTHDSI AVGEDGPTHEPIEQLASLRALPNLSVIRPADGNETA
 TKT_BACHD LRPAIRLAALMQLPVIYVFTHDSI AVGEDGPTHEPVEQLASLRAMPGLSVIRPADGNE SV
 TKT_CORGL MRPAVRLAALMETDAYVWVTHDSIGLGEDGPTHQP VETLAALRAIPGLSVLRPADANETA
 TKT1_YEAST AAGAVRLSALS GH PVIWVATHDSIGVGEDGPTHQPIETLAHFRSLPNIQVWRPADGNEVS
 TKT_ASHGO AAGAVRLAALS GH PVIWIATHDSIGLGEDGPTHQPIETLAHLRAIPNMVWRPADGNEVS
 TKT2_YEAST AAGAVRLAALS GN PVIWVATHDSIGLGEDGPTHQPIETLAHLRAIPNMHVWRPADGNETS

TKT1_ECOLI VAWKYGVERQDGPTALILSRQNL AQQERTEEQLAN-IARGGYVLKD-CAGQPELI FIATG
 TKT2_ECOLI VGWKL AVERHNGPTALILSRQNL AQVERTPDQVKE-IARGGYVLKD-SGGKPDII LIATG
 TKT_BACSU AAWKLAVQSTDHPTALVLTRQNLPTIDQ TSEEALAGVEK GAYVVS KSKNETPDALLI ASG
 TKT_BACLD AAWKLALQSKDQPTALVLTRQNLPTIDQSAETAYEGVKKGAYVVS KSQNEKPEAILL ASG
 TKT_BACHD AAWKLALLESKDQPTALVLTRQNLPTLEGA VDRAYDGVSKGAYVLAP-ANGSADLLLLASG
 TKT_CORGL QAWAAALEYKEGPKGLALTRQNVPLEGTKEKAAEGVRRGGYVLVEGSKETPDVILMGSG
 TKT1_YEAST AAYKNSLESKHTPSII ALSRQNL PQLGSSIESAS---KGGYVLQD--VANPDIILVATG
 TKT_ASHGO AAYKVALESQDTPSVIALSRQNL PQLDSSIEKAS---KGGYILQD--VENPDI AIVSTG
 TKT2_YEAST AAYYSAIKSGRTPSVVALSRQNL PQL EHSFEKAL---KGGYVIHD--VENPDIILVSTG

TKT1_ECOLI SEVELAVAAYEKLTA-EGVKARVVSMPSTDAFDKQDAAYRESVLPKAVTARVAVEAGIAD
 TKT2_ECOLI SEMEITLQAAEKLAG-EGRNVRV VSLPSTDI FDAQDEEYRESVLP SNVAARVAVEAGIAD
 TKT_BACSU SEVGLAIEAQAELAK-ENIDVSVVSMPSMDRFEKQSDEYKNEVLPADVKKRLAIEMGSSF
 TKT_BACLD SEVGLALDAQSELQK-EGIDVSVVSPSWDRFDKQPAEYKNAVLPDVTKRLAIEMGSPL
 TKT_BACHD SEVSLAVNAKEALEK-EGIHAAVVSMPSWDRFEAQS AEYKEEVLPSDVTARLAIEMGSSL
 TKT_CORGL SEVQLAVNAAKALEA-EGVAARVVS VPCMDWFQE QDAEYIESVLPAAV TARSVEAGIAM
 TKT1_YEAST SEVSLSVEAAKTLAA-KNIKARVSLP DFFTFDKQPLEYRLSVLPDNVP-IMSVEVIATT
 TKT_ASHGO SEVGI AVEAAKLLAE-KNMKVRI VSLPDFHTFSRQPK EYQLSVLPDRVP-ILSVEVLSTS
 TKT2_YEAST SEVSI SIDA AKKLYDTKKIKARV VSLPDFYTFDRQSEYRFSVLPDGPV-IMSFEVLATS

ES 2 425 756 T3

TKT1_ECOLI YWYKYVGLNGAIVGMTTFGESAPAELLFEEFGFTVDNVVAKAKELL-----
 TKT2_ECOLI YWYKYVGLKGAIVGMTGYGESAPADKLFPPFGFTAENIVAKAHKVLGVKGA-----
 TKT_BACSU GWGKYTGLEGDVLGIDRFGASAPGETIINEYGFSVPNVVNRVKALINK-----
 TKT_BACLD GWERYTGTGDILGIDQFGASAPGETIMKEYGFTPANVVDRVKKLLNR-----
 TKT_BACHD GWAKYVGNQGDVVAIDRFGASAPGERIMEEFGFTVQHVVVARAKALLENK-----
 TKT_CORGL PWYRFLGTQGRAVSLEHFGASADYQTLFEKFGITTDVVAAAKDSING-----
 TKT1_YEAST CWGKYAHQS---FGIDRFGASGKAPEVFKFFGFTPEGVAERAQKTIAFYKGDKLISPLKK
 TKT_ASHGO GWSEYAHQS---FGLNRFASGKGPEVYKFFFTPEGIASRAEKTVAFYKGKEVLSPLNK
 TKT2_YEAST SWGKYAHQS---FGLDEFGRSGKGPEIYKLFDFADGVASRAEKTINYKKGKQLLSPMGR

TKT1_ECOLI --
 TKT2_ECOLI --
 TKT_BACSU --
 TKT_BACLD --
 TKT_BACHD --
 TKT_CORGL --
 TKT1_YEAST AF
 TKT_ASHGO AF
 TKT2_YEAST AF

Figura 2:

tkt 1S: 5' -aggagaaatcatatggatacaattgaaaagaaatcag-3'
 tkt 1AS: 5' -aattaaatggatccttacttattgattaatgccttaac-3'
 tkt 1ASohne: 5' -aattaaatggatccttattgattaatgccttaac-3'
 tkt 2S: 5' -ggacataactgccggtggttgatg-3'
 tkt 2AS: 5' -ggacataactgccggtggttgatg-3'
 tkt 3S: 5' -ttgaagaattaacagcggc-3'
 tkt 4S: 5' -cagcttgaactggcaatc-3'
 tkt 5S: 5' -gtcctgcgattcgccttg-3'
 tkt 6S: 5' -acgaaacacccgacgctc-3'
 tkt 357 AS: 5' -ggatgccaaaactgcttcc-3'
 tkt Rec 1S: 5' -ggggcagcaaaacaccaggac-3'
 tkt Rec 1AS: 5' -gatctcgaccctgcagcccaagcacacaggaacctcttgatccc-3'
 tkt Rec 2S: 5' -gcgtcaaaacgcataaccattttgaacaaaaccttcctaccatcgatc-3'
 tkt Rec 2AS: 5' -cttattgattaatgccttaactcg-3'
 tkt 357A-S: 5' -agcagtttggcatccgcagcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357N-S: 5' -agcagtttggcatccaacgcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357K-S: 5' -agcagtttggcatccaagcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357Q-S: 5' -agcagtttggcatcccaagcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357S-S: 5' -agcagtttggcatcctcagcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357T-S: 5' -agcagtttggcatccacagcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357H-S: 5' -agcagtttggcatcccatgcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357V-S: 5' -agcagtttggcatccgtggcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357I-S: 5' -agcagtttggcatccattgcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357L-S: 5' -agcagtttggcatccttggcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357M-S: 5' -agcagtttggcatccatggcatcttccggtgaagttc-3'
 tkt 357G-S: 5' -agcagtttggcatccggtgcatcttccggtgaagttc-3'
 rpi MutS: 5' -aattaaatgaattcattaaagaggagaaatcatatg-3'