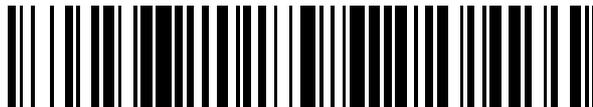


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 865**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2009 E 09717464 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2262894**

54 Título: **Microorganismo recombinante y procedimiento para producir L-lisina**

30 Prioridad:

03.03.2008 US 33099 P

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

21.10.2014

73 Titular/es:

**GLOBAL BIO-CHEM TECHNOLOGY GROUP
COMPANY LIMITED (100.0%)**

**Unit 1104, Admiralty Centre, Tower 1 18 Harcourt
Road
Hong Kong, CN**

72 Inventor/es:

**YANG, SHENG;
HUANG, HE y
WANG, DEHUI**

74 Agente/Representante:

MANRESA VAL, Manuel

ES 2 510 865 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

Microorganismo recombinante y procedimiento para producir L-lisina

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología. En particular, la presente invención proporciona procedimientos para producir L-lisina mediante la proliferación de una bacteria *Escherichia* transformada, en particular *E. coli*, que comprende un gen *dapA* natural o variante de *Bacillus subtilis*, que se describen en la presente memoria.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La L-lisina es un aminoácido esencial que no se sintetiza en los animales. Se ha descubierto que muchas cepas bacterianas naturales y mutantes producen L-lisina. Al utilizarse ampliamente como suplemento alimenticio, medicamento, producto químico e ingrediente alimentario, se ha producido la L-lisina por fermentación a gran escala utilizando principalmente una bacteria *Coryneform* o una bacteria *Escherichia*.

En la mayoría de las bacterias, la L-lisina se sintetiza de un modo natural a partir de aspartato en una vía enzimática de nueve etapas, entre ellas dos etapas compartidas por las vías de biosíntesis de la metionina y la treonina (Anastassiadis, S., RecentpatentsonBiotechnology 2007, 1(1):11-24; Chen, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1993, 268(13):9448-66). Por ejemplo, la dihidrodipicolinasintasa ("DDPS"), una enzima que cataliza la primera etapa en la rama de la biosíntesis de la lisina, experimenta una autorregulación negativa por la L-lisina en bacterias gramnegativas (por ejemplo, *E. coli*, *Bacillusphaericus* y *Methanobacteriumthermoautotrophicum*), pero no en las bacterias grampositivas (por ejemplo *Bacilluslicheniformis*, *Bacillismegaterium*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacteriumglutamicum*, *Bacilluscereus*, y *Bacilluslactofermentum*) (Dobson, R. *et al.*, *Acta Cryst.* 2005, D61:1116-24). Además, la regulación de la ruta de la biosíntesis de la lisina en *Bacillus subtilis* ("*B. subtilis*") es única porque implica una regulación doble mediante la lisina y uno de sus precursores, el diaminopimelato (Chen, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1993, 268(13):9448-66).

Acorde con la diversa sensibilidad a la autorregulación negativa de la DDPS por la L-lisina, se observa una homología limitada en la secuencia proteica de la DDPS y en su gen correspondiente, el *dapA*, entre las cepas bacterianas de géneros distintos. La DDPS en *B. subtilis* presenta una secuencia de aminoácidos aproximadamente del 43 % y el 40 % idéntica a la de *E. coli* y *CorynebacteriumGlutamicum* ("*C. glutamicum*"), respectivamente (Chen, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1993, 268(13):9448-66). Incluso en el mismo género de bacterias, las distintas cepas bacterianas presentan una homología únicamente moderada. Por ejemplo, el gen *dapA* de *Bacillusmethanolicus* ("*B. methanolicus*") presenta una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos aproximadamente un 65 % idéntica a un gen *dapA* conocido previamente de *B. subtilis* (patente US n. 6.878.533).

Un modo de mejorar la producción de L-lisina por parte de una bacteria *Escherichia* es superar la autorregulación negativa de la DDPS por la L-lisina. Se han realizado mutaciones en el gen *dapA* natural de una bacteria *Escherichia* para desensibilizar la DDPS a la L-lisina (patente US n. 6.040.160). Se ha intentado asimismo introducir un gen *dapA* natural de una bacteria que no fuera *Escherichia*, en la que la DDPS correspondiente no experimentara autorregulación negativa por la L-lisina, en una bacteria *Escherichia*, pero no se ha conseguido obtener unos resultados coherentes y satisfactorios.

Un grupo coreano indicó que una introducción de un gen *dapA* natural de una cepa de *C. glutamicum* con hiperproducción de lisina en una cepa mutante de *E. coli* (TF1) que producía lisina permitió un aumento paralelo de la actividad de la DDPS sensible a la lisina y de la producción de lisina (Oh, J. *et al.*, *Biotech. Ltrs.* 1991, 13(10):727-32; patente coreana n. 10-1992-0008382). Sin embargo, la expresión del mismo gen *dapA* natural en otras dos cepas de *E. coli* (TF13 y TF23) no dio como resultado un alto rendimiento en la producción de lisina. Como justificación de la incoherencia de los resultados se mencionó que el mecanismo de regulación implicado en la biosíntesis de la lisina es más complejo en *E. coli* que en las bacterias de *Coryneform*.

La expresión de un gen *dapA* exógeno constituye un reto puesto que la xenoproteínaDDPS correspondiente se ve probablemente sometida a la descomposición por la proteasa y la formación de un cuerpo de inclusión insoluble en una bacteria *Escherichia* (patente US n. 6.040.160). Además, no se espera que una DDPS de *C. glutamicum* (Oh, J. *et al.*, *Biotech. Ltrs.*, 1991, 13(10):727-32; patente coreana n. 10-1992-0008382) o de *B. methanolicus* (patente US n. 6.878.533) presente su actividad ventajosa, es decir, una actividad de la DDPS insensible a la lisina que produzca un alto rendimiento de la producción de lisina, en *E. coli* en parte debido a que la temperatura de cultivo óptima para *C. glutamicum* o *B. methanolicus* difiere de la de *E. coli* en aproximadamente diez o más grados.

Se observó una regulación extremadamente complicada de la síntesis de lisina en células de *E. coli*, en la que se expresaban los genes implicados en la biosíntesis de la lisina en *B. subtilis* (Shevchenko, T.N. *et al.*, *TsitolGenet.* 1984, 18(1):58-60). En particular, la expresión de dichos genes exógenos, entre ellos un gen *dapA* exógeno, en células de *E. coli* no consiguió aumentar la producción de lisina a un nivel elevado y satisfactorio. Se indicó que se

puede alcanzar un aumento considerable en la biosíntesis de lisina utilizando una cepa de *E. coli* o *B. subtilis* que presente mutaciones en sus genes naturales implicados en la biosíntesis de la lisina para desensibilizar la autorregulación negativa por la lisina y el diaminopimelato.

5 En la actualidad, no existe procedimiento eficaz alguno para producir L-lisina utilizando una bacteria *Escherichia* que comprenda un gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis*. Puesto que la demanda de L-lisina, en particular para el pienso, aumenta continuamente junto con la expansión de la población mundial, existe la necesidad de desarrollar procedimientos nuevos y eficaces para mejorar la producción de la L-lisina utilizando una cepa bacteriana de *Escherichia*.

10

SUMARIO DE LA INVENCION

Según la presente invención, una introducción de un gen *dapA* salvaje natural o variante de *B. subtilis* en una bacteria *Escherichia* mejora la producción de L-lisina por parte de la bacteria *Escherichia* a niveles industriales. Además, se puede utilizar la bacteria *Escherichia* transformada para producir L-lisina en un medio de cultivo con un alto rendimiento (por ejemplo, por lo menos 25, 50, 75, 100, 125 o 150 gramos por litro).

La presente invención proporciona un ADN recombinante replicable de un modo autónomo en una bacteria *Escherichia* y que comprende un gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis*. Un gen *dapA* variante de *B. subtilis* presenta una secuencia no idéntica pero sustancialmente idéntica (por ejemplo, en un 90 % 95 % o 99 %) a la secuencia de un gen *dapA* natural de *B. subtilis*. Se puede utilizar ADN recombinante para introducir un gen *dapA* de *B. subtilis* en una bacteria *Escherichia* para aumentar la producción de L-lisina.

El gen *dapA* de *B. subtilis* puede presentar una secuencia de ácido nucleico idéntica o sustancialmente idéntica (por ejemplo, en un 90 %, 95 % o 99 %) a la de un gen *dapA* de *B. subtilis* tal como se establece en GenBank, número de registro, L08471 (SEC ID n.º: 1) y Chen, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1993, 268(13):9448-66). Un gen *dapA* variante de *B. subtilis* puede comprender una o más modificaciones en los nucleótidos de la SEC ID n.º: 1. En una forma de realización específica no limitativa, un gen *dapA* variante de *B. subtilis* comprende dos mutaciones de G a T en el nucleótido 355 de T y a C en el nucleótido 360 de la SEC ID n.º: 1.

Además, el gen *dapA* de *B. subtilis* puede codificar una proteína que presenta una secuencia de ácido nucleico idéntica o sustancialmente idéntica (por ejemplo, en un 90 %, 95 % o 99 %) a la secuencia de aminoácidos deducida de un gen *dapA* de *B. subtilis* tal como se establece en GenBank, número de registro, L08471 (SEC ID n.º: 2) y Chen, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1993, 268(13):9448-66). La proteína puede presentar una secuencia de aminoácidos que comprenda una o más modificaciones en la SEC ID n.º: 2. En una forma de realización específica no limitativa, un gen *dapA* variante de *B. subtilis* codifica una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos que comprende una mutación de histidina a tirosina en el aminoácido 119 de la SEC ID n.º: 2 ("variante H119Y"). El gen *dapA* de *B. subtilis* puede codificar una proteína que presente actividad de DDPS.

La presente invención proporciona asimismo una bacteria *Escherichia* que comprende un gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis* para producir L-lisina en un medio de cultivo. La bacteria *Escherichia* puede producir por lo menos 50 gramos por litro de L-lisina en el medio de cultivo. En una forma de realización específica no limitativa, se proporciona una bacteria *Escherichia* que comprende un gen *dapA* natural de *B. subtilis* para producir L-lisina. En una forma de realización adicional específica no limitativa, se proporciona una bacteria *Escherichia* que comprende un gen *dapA* variante H119Y de *B. subtilis* para producir L-lisina.

La presente invención proporciona además procedimientos para producir L-lisina mediante la proliferación de una bacteria *Escherichia* en un medio de cultivo y la extracción de L-lisina del medio de cultivo, comprendiendo la bacteria un gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis*. Se permite que la L-lisina se acumule antes de recoger o extraer la misma del medio de cultivo. Se puede extraer la L-lisina del medio de cultivo cuando la L-lisina alcanza, por lo menos 25, 50, 75, 100, 125 o 150 gramos por litro, preferentemente por lo menos 50 gramos por litro. En una forma de realización específica no limitativa, se hace proliferar en un medio de cultivo una bacteria *Escherichia* que comprende un gen *dapA* natural de *B. subtilis* y se extrae la L-lisina del medio de cultivo. En una forma de realización específica no limitativa adicional, se hace proliferar en un medio de cultivo una bacteria *Escherichia* que comprende un gen *dapA* variante H119Y de *B. subtilis*, y se extrae la L-lisina del medio de cultivo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona ventajosamente procedimientos, bacterias transformadas que pertenecen al género *Escherichia* y ADN recombinantes para producir L-lisina por fermentación. Se ha descubierto ahora que se puede producir L-lisina con un alto rendimiento mediante una bacteria *Escherichia* que comprende un gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis*.

En aras de la claridad de la descripción y no a título limitativo, la presente invención se describirá más detalladamente en las subsecciones siguientes:

- (1) un ADN recombinante;
- (2) una bacteria *Escherichia* transformada; y
- (3) un procedimiento para producir L-lisina.

5 (1) ADN recombinante

El ADN recombinante de la presente invención presenta un gen *dapA* natural o variante de una cepa de *B. subtilis*, y se duplica de un modo autónomo en una cepa bacteriana de *Escherichia*. Se puede obtener introduciendo un fragmento de ADN que comprenda el gen *dapA* de *B. subtilis* en un vector de expresión replicable en una cepa bacteriana de *Escherichia*.

En la cepa de *B. subtilis*, se expresa el gen *dapA* y la DDPS correspondiente no experimenta una autorregulación negativa sustancial (por ejemplo, del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o superior) por la L-lisina. La cepa de *B. subtilis* puede ser productora o no de L-lisina. Una cepa preferida de *B. subtilis* es la W168, que no es productora de lisina. Esta cepa se encuentra disponible en BacillusGenetic Stock Center, Universidad Estatal de Ohio, EE.UU.

Se puede obtener un fragmento de ADN que comprende un gen *dapA* natural de *B. subtilis* ("gen *BsdapA*") a partir del ADN cromosómico de una cepa natural de *B. subtilis*. Se puede preparar el ADN cromosómico a partir de una cepa de *B. subtilis*, utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica. Se puede obtener el fragmento de ADN amplificando el gen *dapA* natural de *B. subtilis* a partir del ADN cromosómico utilizando un procedimiento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se pueden preparar los cebadores de PCR aptos basándose en la secuencia del gen *dapA* publicada previamente en *B. subtilis* u otras cepas bacterianas (por ejemplo, *E. coli* and *C. glutamicum*) (Chen, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1993, 268(13):9448-66). Por ejemplo, se puede utilizar un par de cebadores monocatenarios 21-mer, *DapA-F* (SEC ID n.º: 3) y *DapA-R* (SEC ID n.º: 4).

A continuación se muestran las secuencias de ácido nucleico SEC ID n.º: 3 y 4:

SEC ID n.º: 3 (<i>DapA-F</i>)	CGGCGATCGTTTCTGTTGGCA
SEC ID n.º: 4 (<i>DapA-R</i>)	ATCTGGGCCATATCACGCGCT

Se puede obtener un fragmento de ADN que comprende un gen *dapA* variante de *B. subtilis* de un modo similar a partir del ADN cromosómico de una cepa mutada de *B. subtilis in vivo*. Se puede obtener asimismo un gen *dapA* variante de *B. subtilis* introduciendo modificaciones en el gen *dapA* natural de *B. subtilis in vitro* mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis mediante PCR.

Se puede determinar la secuencia del fragmento de ADN resultante mediante un procedimiento conocido comúnmente utilizando cebadores aptos (por ejemplo, *DapA-F* y *DapA-R*).

El gen *dapA* de *B. subtilis* puede presentar una secuencia de ácido nucleico idéntica o sustancialmente idéntica (por ejemplo, en un 90 %, 95 % o 99 %) a la del gen *dapA* de *B. subtilis* tal como se establece en GenBank, número de registro, L08471 (SEC ID n.º: 1) y Chen, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1993, 268(13):9448-66). Un gen *dapA* natural de *B. subtilis* puede presentar una secuencia de ácido nucleico idéntica a la SEC ID n.º: 1. Un gen *dapA* variante de *B. subtilis* puede comprender una o más modificaciones en los nucleótidos de la SEC ID n.º: 1. Por ejemplo, un gen *dapA* variante de *B. subtilis* puede comprender dos mutaciones de G a T en el nucleótido 355 y de T a C en el nucleótido 360 de la SEC ID n.º: 1. Se puede determinar el porcentaje de identidad de la secuencia utilizando un software estándar tal como BLAST o FASTA.

Además, el gen *dapA* de *B. subtilis* puede codificar una proteína que presenta una secuencia de ácido nucleico idéntica o sustancialmente idéntica (por ejemplo, en un 90 %, 95 % o 99 %) a la secuencia de aminoácidos deducida de un gen *dapA* de *B. subtilis* tal como se establece en GenBank, número de registro, L08471 (SEC ID n.º: 2) y Chen, N. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1993, 268(13):9448-66). Un gen *dapA* natural de *B. subtilis* puede codificar una proteína que presente una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEC ID n.º: 2. Un gen *dapA* de *B. subtilis* puede codificar asimismo una proteína que presente una secuencia de aminoácidos que comprenda una o más modificaciones en la SEC ID n.º: 2. Por ejemplo, un gen *dapA* variante de *B. subtilis* puede codificar una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos que comprende una mutación de histidina a tirosina en el aminoácido 119 de la SEC ID n.º: 2 ("variante H119Y").

Las modificaciones de los aminoácidos comprenden sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones se pueden introducir mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida y la mutagénesis mediante PCR. Las sustituciones de aminoácidos pueden comprender aquellas en las que el aminoácido se sustituye con un aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Dichas familias comprenden aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina,

asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en β (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

- 5 Las sustituciones de aminoácidos pueden comprender asimismo aquellas que se correlacionan con las sustituciones de aminoácidos en el gen *dapA* natural de una bacteria *Escherichia* de la que se conoce que desensibiliza las DDPS correspondientes con respecto a la L-lisina.

10 El fragmento de ADN que comprende un gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis* se puede ligar posteriormente con un vector de expresión apto para producir un ADN recombinante que comprenda el gen *dapA*. Un vector de expresión de ADN apto se duplica de un modo autónomo en una cepa bacteriana de *Escherichia* que comprende un marcador genético seleccionable. Un marcador genético seleccionable permite detectar la resistencia a un antibiótico (por ejemplo, ampicilina, tetraciclina, kanamicina y neomicina), un cambio de color o cualquier otra característica que permita distinguir los hospedadores transformados a partir de hospedadores no transformados.

15 Los ejemplos de vectores aptos comprenden un vector de expresión de *E. coli* tal como pTrc99A, pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pMW119, pMW118, pMW219, pMW218 y pSTV28. Se prefiere introducir el fragmento de ADN en un vector de expresión de ADN de tal modo que el gen *dapA* se encuentre controlado por un activador fuerte de *E. coli*. Los ejemplos de promotores aptos comprenden *trc*, *tac*, *lac* y T7, preferentemente *trc*.

20 El gen *dapA* de *B. subtilis* puede codificar una proteína que presente actividad de DDPS. Se puede confirmar la presencia de un ADN recombinante que comprende un gen *dapA* de *B. subtilis* por el nivel elevado de actividad de la DDPS en una cepa bacteriana transformada con el ADN recombinante o debido a la recuperación de la auxotrofia en una cepa bacteriana distinta deficiente en DDPS (por ejemplo, la cepa de *E. coli* JE7627) transformada con el ADN recombinante.

(2) Bacteria *Escherichia* transformada

30 Se puede transformar una bacteria *Escherichia* con un ADN recombinante que comprenda un gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis* utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. La bacteria *Escherichia* progenitora (sin transformar) puede presentar un gen *dapA* natural o mutante, y expresar la DDPS correspondiente natural o mutante. La actividad enzimática de la DDPS natural puede experimentar autorregulación negativa por la L-lisina. La bacteria *Escherichia* progenitora puede ser productora de L-lisina. Se puede mejorar la actividad de otra enzima natural implicada en la biosíntesis de la lisina. Por ejemplo, se puede utilizar una cepa de *E. coli* que comprenda un ADN que codifique una aspartocinasa III natural y que presente una mutación para desensibilizar la autorregulación negativa por la L-lisina (patente US n.º 6.040.160). Se prefiere que la cepa bacteriana de *Escherichia* sea *E. coli*. Se prefiere además que la bacteria *Escherichia* se una cepa de *E. coli* que se utilice comúnmente en la producción industrial de L-lisina.

40 Tras la transformación, la bacteria *Escherichia* presenta un gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis*. Se puede determinar la presencia de un gen *dapA* de *B. subtilis* en la bacteria transformada mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica. El gen *dapA* de *B. subtilis* se puede encontrar en un plásmido. Se puede integrar asimismo en un cromosoma de la bacteria *Escherichia* transformada. La bacteria *Escherichia* transformada produce L-lisina con un alto rendimiento (por ejemplo, por lo menos 25, 50, 75, 100, 125 o 150 gramos por litro).

45 En una forma de realización, la cepa B-3996 de *E. coli* (disponible en el Research Institute for Genetics and Industrial Micro organism Breeding con el número de registro RIA 1867) se transforma con un ADN recombinante que comprende un gen *dapA* natural (por ejemplo, pTrc99A-BsdapA) tras expulsar el único plásmido pVIC40 (patente US n. 6.040.160) para crear una cepa bacteriana transformada B-399/pTrc99A-BsdapA. Se preparó de un modo similar una cepa de control B-399/pTrc99A mediante la transformación con un ADN recombinante correspondiente sin BsdapA (por ejemplo, pTrc99A). Se preparó el medio de cultivo mezclando una disolución esterilizada (que contenía 16 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/l de $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l de extracto de levadura (Difco), 0,5 g/l de L-metionina, 0,1 g/l de L-treonina y 0,05 g/l de L-isoleucina a un pH de 7,0) con glucosa esterilizada al 20 % en una proporción de 4 a 1. Se puede proporcionar glucosa para mejorar la producción de L-lisina. A continuación se añadió CaCO_3 farmacopeico esterilizado a la mezcla y se disolvió hasta una concentración final de 30 g/l. Se pueden añadir asimismo antibióticos aptos (por ejemplo, 15 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina y 5 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina). Ambas cepas se cultivaron con una agitación de 114 a 116 rpm y a 37 °C durante 48 horas. Se recogió la L-lisina del medio de cultivo y se analizó. Se esperaba que la cepa bacteriana B-399/pTrc99A-BsdapA produjera por lo menos 10 gramos por litro de L-lisina, lo que resultaría significativamente superior a la cepa de control B-399/pTrc99A.

60 En otra forma de realización, se utilizó una cepa bacteriana DC037 de *E. coli* de Global Technology Group Bio-Chem Company Limited para preparar una *E. coli* recombinante que comprendía un gen *dapA* natural de *B. subtilis* (LDC051), una *E. coli* recombinante que comprendía un gen *dapA* variante H119Y de *B. subtilis* (DC231), y una cepa de *E. coli* recombinante (DC073) como control, que producía L-lisina en 150, 180 y 20 gramos por litro,

respectivamente. La preparación y los ensayos con dichas cepas de *E. coli* recombinantes se describen en los Ejemplos 3 y 4.

5 El 26 de febrero de 2009 se depositaron las bacterias de las cepas DC051 y DC231 en el Centro General de Recogida de Cultivos Microbiológicos de China (CGMCC), según Tratado de Budapest, y se les dio los números de registro CGMCC n.º 2923 y CGMCC n.º 2924, respectivamente.

10 La actividad de la DDPS en la bacteria *Escherichia* transformada puede no experimentar una autorregulación negativa sustancial por la L-lisina (por ejemplo, de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o superior). La actividad de la DDPS en la bacteria *Escherichia* transformada se puede reducir no más del 50 % en presencia de L-lisina 10 mM.

15 Se puede determinar la actividad DDPS en una bacteria según el procedimiento descrito por Yugari, Y. y Gilvarg C. in *J. Biol. Chem.*, 1965, 240(12):4710-16, o mediante cualquier otro procedimiento apto. Por ejemplo, se añade un extracto bacteriano a una disolución de la reacción que contiene imidazol-HCl 50 mM (pH 7,4), L-aspartico semialdehído 20 mM y piruvato sódico 20 mM, y se incuba a 37 °C durante 10 minutos. Se puede utilizar una disolución de la reacción sin piruvato sódico como testigo en blanco. La actividad de la DDPS se determina mediante la cantidad de dihidrodipicolinato generada por la reacción, que se detecta con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 270 nm. Se añadieron diversas cantidades de L-lisina a la mezcla de la reacción para valorar la sensibilidad a la lisina en la actividad de la DDPS.

20 (3) Procedimiento para producir L-lisina

25 La L-lisina se puede producir mediante la proliferación de una bacteria *Escherichia* que comprende gen *dapA* natural o variante de *B. subtilis* en un medio de cultivo. Resulta ventajoso un medio apto para la proliferación óptima de una bacteria *Escherichia* (Anastassiadis, S., Recent Patents On Biotechnology 2007, 1(1):11-24). Resulta ventajoso un antibiótico (por ejemplo, ampicilina) en el medio para mantener la selectividad y la estabilidad de la bacteria *Escherichia* transformada.

30 Por ejemplo, se preparó el medio de cultivo mezclando una disolución esterilizada (que contenía 16 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g/l de FeSO₄·7H₂O, 0,01 g/l de MnSO₄·5H₂O, 2 g/l de extracto de levadura (Difco), 0,5 g/l de L-metionina, 0,1 g/l de L-treonina y 0,05 g/l de L-isoleucina a un pH de 7,0) con glucosa esterilizada al 20 % en una proporción de 4 a 1. Se puede proporcionar glucosa para mejorar la producción de L-lisina. A continuación se añadió CaCO₃ farmacopeico esterilizado a la mezcla y se disolvió hasta una concentración final de 30 g/l. Se pueden añadir asimismo antibióticos aptos (por ejemplo, 15 µg/ml de tetraciclina y 5 µg/ml de kanamicina).

35 Resultan ventajosas unas condiciones óptimas de cultivo para una bacteria *Escherichia* (Anastassiadis, S., Recent Patents On Biotechnology 2007, 1(1):11-24). Se realiza el cultivo preferentemente en condiciones aeróbicas a una temperatura comprendida entre 25 °C y 45 °C y a un pH comprendido entre 5 y 8. La concentración de L-lisina alcanza un máximo tras cultivar durante aproximadamente entre 2 y 10 días. Se puede controlar la proliferación bacteriana basándose en la densidad celular del medio de cultivo determinada con un espectrofotómetro.

40 Se permite que la L-lisina se acumule en el medio de cultivo de una bacteria *Escherichia* transformada cultivada según la presente invención. Se puede recoger la L-lisina mediante diversos procedimientos (por ejemplo, procedimientos cromatográficos de intercambio iónico) para producir L-lisina-HCl antes o después de la separación celular mediante centrifugación y filtración del medio de cultivo; o se puede recoger el caldo de L-lisina para producir sulfato de L-lisina mediante un proceso de granulación (Anastassiadis, S., Recent Patents On Biotechnology 2007, 1(1):11-24; patente china n.º 200410050017.4). Se puede recoger o extraer la L-lisina del medio de cultivo cuando la L-lisina alcanza por lo menos entre 5 y 10 gramos por litro, o por lo menos 25, 50, 75, 100, 125 o 150 gramos por litro en un proceso de fermentación a gran escala, preferentemente por lo menos 50 gramos por litro. Se puede determinar la cantidad de L-lisina mediante diversos procedimientos analíticos conocidos en la técnica (por ejemplo, HPLC).

45 **EJEMPLOS**

55 A continuación se describirá la presente invención de un modo general, se podrá comprender más fácilmente haciendo referencia a los ejemplos siguientes, que se incorporan únicamente a título ilustrativo de ciertos aspectos y formas de realización de la presente invención, y no pretenden limitar la misma.

60 Ejemplo 1 Construcción del plásmido pTrc99A-BsdapA

65 Se construyó el plásmido pTrc99A-BsdapA para que comprendiese un gen *dapA* natural de *B. subtilis*. Se preparó el ADN cromosómico a partir de la cepa natural W168 de *B. subtilis* (Bacillus Genetic Stock Center, la Universidad Estatal de Ohio, EE.UU.), utilizando un procedimiento conocido comúnmente. Se obtuvo un fragmento de ADN de 0,88 kb amplificando el gen *dapA* natural en el ADN cromosómico utilizando un par de cebadores, DapA-F (SEC ID n.º: 3) y DapA-R (SEC ID n.º: 4), que presentan las secuencias de ácido nucleico mostradas en las SEC ID n.º: 3 y 4,

respectivamente. Se recuperó el fragmento de ADN, se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, y se ligó con un plásmido pTrc99A previamente digerido con las mismas enzimas de restricción para producir un plásmido pTrc99A-BsdapA. El plásmido pTrc99A-BsdapA comprendía una secuencia de ácido nucleico con la SEC ID n.º: 1. La secuencia de ácido nucleico codifica una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos con la SEC ID n.º: 2.

Ejemplo 2. Construcción del plásmido pTrc99A-BsdapAH119Y

Se construyó el plásmido pTrc99A-BsdapAH119Y para que comprendiese un gen *dapA* variante H119Y de *B. subtilis*. Se introdujo la mutación utilizando el plásmido pTrc99A-BsdapA como plantilla de PCR y amplificando con un par de cebadores *bsdapa119muts* (SEC ID n.º: 5) y *bsdapa119mutas* (SEC ID n.º: 6). A continuación se muestran las secuencias de ácido nucleico SEC ID n.º: 5 y 6:

SEC ID n.: 5 (<i>bsdapa119muts</i>)	TCAAGAAGGAATGTACCAGTATTTCAAA GCAATTGCGGCAGAGAC
SEC ID n.: 6 (<i>bsdapa119mutas</i>)	GTCTCTGCCGCAATTGCTTTGAAATACTG GTACATTCTTCTTGA

Los sitios de mutación de los cebadores se indican con caracteres en negrita y cursiva.

Se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α con un parte del producto de la PCR digerida con *DpnI*. Se extrajo el plásmido a partir de transformantes y se digirió con la enzima de restricción *DraI* para identificar el plásmido mutante pretendido pTrc99A-BsdapAH 119Y, que comprendía una secuencia de ácido nucleico que presentaba dos mutaciones de G a T en el nucleótido 355 y de T a C en el nucleótido 360 de la SEC ID n.º: 1 La secuencia del ácido nucleico codifica una proteína que presenta una secuencia de aminoácidos que comprende una mutación de histidina a tirosina en el aminoácido 119 de la SEC ID n.º: 2.

Ejemplo 3. *E. coli* recombinante que comprende el gen *dapA* natural de *B. subtilis*

Se preparó una *E. coli* recombinante que comprendía un gen *dapA* natural de *B. subtilis* (LDC051) a partir de una cepa bacteriana DC037 de *E. coli*, que se recibió de Global Bio-Chem Technology Group Company Limited. La DC037 presentaba dos plásmidos distintos, comprendiendo cada uno un gen *dapA* mutante de *E. coli* y un gen de resistencia a la tetraciclina o a la kanamicina. Se eliminaron dichos dos plásmidos y se sustituyeron con los plásmidos pDCtetBSdapA y pDCKanBSdapA, comprendiendo cada uno un gen *BsdapA* y un gen de resistencia a la tetraciclina o a la kanamicina como se especificará posteriormente.

Se construyó un plásmido pDCtetBSdapA que contenía un gen *BsdapA* y un gen de resistencia a la tetraciclina. Se obtuvo el *BsdapA* a partir de pTrc99A-BsdapA utilizando un par de cebadores, *ptrcBSdapAI-F* y *ptrcBSdapA1-R*, que presentaban secuencias de ácidos nucleicos tales como se muestran a continuación en las SEC ID n.º: 7 y 8, respectivamente. Se recuperó un fragmento de ADN de 1,6 kb y se digirió con las enzimas de restricción *Tth1111* y *SpeI*, y se ligó con el plásmido pDCtetdapA, que se había digerido previamente con las mismas enzimas de restricción, para preparar el plásmido pDCtetBSdapA.

Se construyó un plásmido pDCKanBSdapA que contenía un gen *BsdapA* y un gen de resistencia a la kanamicina. Se obtuvo el *BsdapA* a partir de pTrc99A-BsdapA utilizando un par de cebadores, *ptrcBSdapA2-F* y *ptrcBSdapA2-R*, que presentaban secuencias de ácidos nucleicos tales como se muestran a continuación en las SEC ID n.º: 9 y 10, respectivamente. Se recuperó un fragmento de ADN de 1,6 kb y se digirió con las enzimas de restricción *NotI* y *PshAI*, y se ligó con el plásmido pDCKandapA, que se había digerido previamente con las mismas enzimas de restricción, para preparar plásmido pDCKanBSdapA.

Se preparó la DC045 a partir de la DC037. Se trató la DC037 con 800 µg/ml de EB durante 24 horas, se cribó posteriormente con 5 µg/ml de tetraciclina y 50 µg/ml de kanamicina, respectivamente, para preparar la DC039, en la que se eliminó el pDCKandapA y se mantuvo el pDCtetdapA.

Se obtuvo un fragmento de 2,8 kb amplificando la *E. coli* W3110 con un par de cebadores, LDCup y f1DN, que presentan las secuencias de ácido nucleico que se muestran a continuación en las SEC ID n.º: 11 y 12, respectivamente. Se subclonó dicho fragmento en el vector pMD18simpleT para obtener el pMD18swtLDC.

Se obtuvo un gen de resistencia a la apramicina de 1,5 kb amplificando el pIJ773 con un par de cebadores, FRT5 y HPA1FRT3, que presentan las secuencias de ácido nucleico que se muestra a continuación en las SEC ID n.º: 13 y 14, respectivamente. Se digirió el pMD18swtLDC con *HpaI* como vector y se ligó con el fragmento del gen de resistencia a la apramicina de 1,5 kb para obtener el pMD18swtLDC-apra. Se aisló un fragmento de 4,5 kb digiriendo el pMD18swtLDC-apra con *PvuII* y se utilizó como fragmento recombinante para transformar la DC039 (pIJ790) y obtener la DC043, en la que se sustituyó el LDC natural por el LDC truncado del genoma de la DC039. Se obtuvo la

DC045 que contenía el LDC natural y el plásmido pDCtetdapA tras eliminar el gen de resistencia a la apramicina del genoma de la DC043 con la ayuda del plásmido pCP20.

A continuación, se construyó el pDCamBSdapA para rechazar el plásmido pDCtetdapA de la DC045.

Se extrajo y se digirió el plásmido pIJ773 con las enzimas de restricción EcoRI y *Clal*. Se aisló un fragmento de 1,3 kb. Se obtuvo un fragmento de 3,4 kb digiriendo el pDCtetBSdapA con el enzima de restricción *PvuII* y se ligó posteriormente con el plásmido pMD18simple, que se había digerido previamente con la misma enzima de restricción para construir el pMD18s(BStet). El pMD18s(BStet) se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *Clal* y se obtuvo un fragmento de 4,5 kb que se utilizó como vector. El fragmento de 1,3 kb obtenido a partir del pIJ773 se ligó con el fragmento vector de 4,5 kb. Se transformaron las células competentes DH5 α con la mezcla de ligación y se hicieron proliferar en placas que contenían ampicilina / apramicina. Se extrajo el ADN del plásmido de las bacterias transformadas y se digirió con la enzima de restricción *PvuII*, obteniéndose un fragmento de 3,5 kb como un fragmento recombinante de brazo largo.

La BW25113 (pIJ790) transformada con pDCtetBSdapA se transformó además con el fragmento recombinante de brazo largo. Se extrajo el plásmido recombinante pDCamBSdapA de las bacterias transformadas y se utilizó para transformar la DC045. La DC045 transformada contenía dos plásmidos, pDCtetdapA y pDCamBSdapA. Gracias al rechazo de dos orígenes de duplicación, se obtuvo una DC049-1 en la que se retiró el pDCtetdapA y se mantuvo el pDCamBSdapA. Se obtuvo la DC051 tras transformar la DC049-1 con pDCtetBSdapA y pDCkanBSdapA.

El 26 de febrero de 2009 se depositaron las bacterias de la cepa DC051 en el Centro General de Recogida de Cultivos Microbiológicos de China (CGMCC), según Tratado de Budapest, y se les dio el número de registro CGMCC n.º 2923.

La DC073, que presenta el vector de expresión pTrc99A, se preparó de un modo similar a un control. A diferencia de la DC051, la DC073 no comprende pBSdapA.

A continuación se muestran las secuencias de ácido nucleico SEC ID n.º: 7 a 14:

SEC ID n.: 7 (ptrcBSdapA1-F)	GGACACTGTCTAATGTGAGTTAGCGCG
SEC ID n.: 8 (ptrcBSdapA1-R)	CACTAGTATTGAAGCATTATCAGGGT
SEC ID n.: 9	GCGGCCGCTGTGCAGGTC
SEC ID n.: 10	GACCACTGTCAGGGTTATTGTCTCAT
SEC ID n.: 11 (LDCup)	ATGAACATCATTGCCATTATGGG
SEC ID n.: 12 (f1DN)	TTACTGCTCATACAGTTCCAACG
SEC ID n.: 13 (FRT5)	ATTCCGGGGATCCGTCGACC
SEC ID n.º: 14 (HPA1FRT3)	AACAGCACGTTACTCGCCCGGAAGCCGC TCTGGCAAGTTATGTAGGCTGGAGCTGC TTC

Se hicieron proliferar DC051 y DC073 en un medio de cultivo con ampicilina a 37 °C durante 3 días y produjeron 150 y 20 gramos por litro, respectivamente, de L-lisina en el medio.

Ejemplo 4. *E. coli* recombinante que comprende el gen dapA variante H119Y de *B. subtilis*

Se preparó una *E. coli* recombinante que comprendía un gen dapA variante H119Y de *B. subtilis* (DC231) utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 3, con la excepción de que se utilizó el plásmido pTrc99A-BsdapAH119Y para sustituir el plásmido pTrc99A-BsdapA. Se obtuvo la DC231 tras transformar la DC049-1 con pDCkanBSdapAH119Y y pDCtetBSdapAH119Y.

El 26 de febrero de 2009 se depositaron las bacterias de la cepa DC231 en el Centro General de Recogida de Cultivos Microbiológicos de China (CGMCC), según Tratado de Budapest, y se les dio el número de registro CGMCC n.º 2924.

Se hizo proliferar la DC231 en un medio de cultivo utilizando el procedimiento descrito en el ejemplo 3. Se produjeron 180 gramos por litro de L-lisina en el medio.

LISTADO DE LA SECUENCIA

ES 2 510 865 T3

<110> Global Bio-Chem Technology Group Company Limited.
 Yang, Sheng
 Huang, He
 Wang, Dehui

<120> MICROORGANISMO RECOMBINANTE Y PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR L-LISINA

<130> CP1090198P

<150> US 61/033,099
 <151> 2008-03-03

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 7016
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis*

<220>
 <221> gen
 <222> (5665).. (6537)
 <223> gen dapA

<400> 1

30

atcggcacag gttcgagaca tgaaacgccg gagataaacg gaatttctca ctttttagag 60

cacatgttct ttaaaggac gagcacaaa tctgcacgg agatagcaga atctttgat 120

cgtattggcg gccaggtaa tgcgtttact tcaaaggaat atacctgcta ctatgcaaag 180

gtgcttgacg agcatgcaa ttacgcgtg gacgtattag cagatatgtt ctttcattca 240

35

acgtttgatg aaaacgagct gaaaaagag aaaaatgtag tatatgaaga aattaaatg 300

tatgaagatg cgccggacga cattgtacat gatttatga gcaaagccac ttacggcaat 360

cattcttttag gctacccaat tttaggaacg gaagaaacgc ttgcttcctt taacggtagc 420

tctctcagac aatacatgca tgattattat acgccggacc gagtggtgat ttcggtagcg 480

ggcaatatat ctgacagttt tatcaaagat gtagaaaaat ggttcgggctc atacgaggcg 540

40

aaaggcaaag cgacaggcct tgagaagcct gagttccaca cggaaaaact gacgagaaaa 600

aaagaacag agcaggctca tttgtgcctt ggatttaaag gcttagaggt tggccatgaa 660

cgtatttatg atttaatcgt cctcaacaat gtgctcggag gcagcatgag cagccggctg 720

ttggaagatg tgcgtgaaga taaaggactt gcttattctg tttacagcta tcacagctca 780

tatgaggaca gcggaatgct aacgatttac ggcggaacgg gtgcaaatca gcttcagcag 840

45

ctgtcggaaa caattcaaga aaccctggcc acattaaac gtgacggcat tacctcgaag 900

gaactggaaa acagcaaaga gcaaatgaag ggaagcttaa tgctgagctt agaaagcaca 960

aacagcaaaa tgagccgaaa cggaaaaaat caactgctgc tcggcaaca taaaacatta 1020

ES 2 510 865 T3

gatgaaatta tcaatgaatt aaacgccgtg aacttagagc gtgttaatgg ccttgccaga 1080
 caattgttta ccgaagacta tgcattagca cttatcagcc cttccggcaa tatgccgtct 1140
 5 taaaaaggaa agcctgcccc ataatggagc aggcattttt taatcccttt catcatacat 1200
 agtacaaggg ggtgacagac atgcggtca gtgaattatc gggaaaggaa attgtagaca 1260
 tcaaaagagc tgaacggctc ggagtgctcg gccagaccga tttggaaatc aatgaacagg 1320
 10 atggacagat tacagcactc ctcattccca cagttaagtg gtttggtttg agaaagcaag 1380
 gtcatgacat tcgtgtccca tggcaccata ttcaaaagat cggttcagat atgattatat 1440
 15 tagatgtacc tgaggaaatg cctcctcgac aagagtaaag agcccaatg actgtgaagc 1500
 gggctctaaa gaaaacatct gaaacatcgg ctgccggagc cgatgtttt ttatatggaa 1560
 aaagcgcate ttttatatte accggtattt ccttttgatc ataagatgaa ggggagctta 1620
 20 acaactagag atccagtata tacaagaag gtgaacggtt agaatgtaa cgggattgaa 1680
 aattgcagtt atcggcggtg acgcaagaca gctcgaaat ataagaaagc tcaactgaaca 1740
 25 gcaggctgac atctatcttg tcggttttga ccaattggat cacggttta cggggcagc 1800
 aaaatgcaat attgatgaaa ttccttttca gcaaatagac agcatcatc ttcagtatc 1860
 cgcgacaaca ggagaaggtg tcgtatcgac tgtattttcg aatgaagaag ttgtgttaa 1920
 30 acaggacat cttgacagaa cgctgcaca ttgtgtcatt ttctcaggaa tttctaacgc 1980
 ctatttagaa aacattgcag ctcaggcaaa aagaaaactt gttaagctgt ttgagcggga 2040
 35 tgacattgag atatacaact ctattccgac agtagaagga acgatcatgc tggctattca 2100
 gcacacggat tatacgatac acggatcaca ggtggccgtt ctcggctcgg ggcgcaccgg 2160
 gatgacgatt gcccgatcat ttgccgcgct cggggcgaat gtaaaagtgg gggcaagaag 2220
 40 ttcagcgcac ctggcacgta tcaactgaaat ggggctcgtt ccttttcata ccgatgagct 2280
 gaaagagcat gtaaaagata tagatatttg cattaatacc ataccgagta tgattttaa 2340
 45 tcaaacggta ctttctagca tgacaccaa aaccttaata ttgatctgg cctcacgtcc 2400
 cgggggaacg gattttaaat atgccgagaa acaagggatt aaagcacttc ttgctcccgg 2460
 gcttccaggg attgtcgtc ctaaaacagc tgggcaaatc cttgcaaagc tcttgagcaa 2520
 50 gcttttgct gaaatacaag ctgaggagg gaaataagga tgtcgtcatt aaaaggaaaa 2580
 agaatcgggt ttgggctgac cgggtcgcac tgcacatag aagcggttt cccgcaaatt 2640
 55 gaggagtgg tcaacgaag agctgaagtc cgtccggtt tcaacattta tgtaaaatct 2700
 acaaatacce gatattgaga gggcgcagaa tgggttaaaa aaattgaaga cctgactgga 2760
 tatgaggcca ttgattcgat tgtaaaggca gaacctctt ggccgaagct gcccttgac 2820
 60 tgcatggtca ttgcgcttt aacaggcaat tcaatgagca agctggcaaa tgccatgagc 2880
 gacagcccgg tgctgatggc ggcaaaagcg acaatccgga acaatcgcc tgtcgttctg 2940
 65 ggtatctcga caaatgatgc tcttggttta aacggaacaa atttaatgag gctcatgtca 3000

ES 2 510 865 T3

acaaaaaata tctttttat tccattcggg caagatgata catttaaaaa accgaattca 3060
 atggtagcca aaatggatct gcttccgcaa acgattgaaa aggcactcat gcaccagcag 3120
 5 cttcagccga ttctagttga gaattatcag ggaaatgact aaatttacag aaaatctttc 3180
 ccaaactaaa aaattcggtc atcacccgca tattctatgg taaaataaaa cgtaaaatca 3240
 tagtcaaate aattcaatga agctgattgg cggaaggagt tttacagatg ggaagaggtt 3300
 10 tacacgtagc tgttgtcggg gcgacagggg ctgtgggaca acaaatgctt aaaacacttg 3360
 aagacagaaa ctttgaatg gacacactta cattgctatc ttcaaaacgc tctgcgggga 3420
 15 caaagtcac gtttaaaggc caagagctga ctgttcagga agcttctcct gagagctttg 3480
 aaggggtaaa tattgctttg ttcagcggcg gcggaagcgt atcacaagca ttggcaccag 3540
 aagctgtaaa acgcggcgct attgttatag ataatacagag tgcgttccgc atggatgaaa 3600
 20 atacaccgct tgttgtgcca gaagtgaatg aggcagactt gcatgaacac aacggcatta 3660
 ttgccaatcc aaactgctct acaatccaaa tggttgcggc acttgaaccg atccgcaaag 3720
 25 catatggctt aaacaaggtc atcgtatcaa cttaccaggc agtatcagga gcgggtaatg 3780
 aagctgtaaa agagctttac agccaaacac aggcgatttt aaataaagaa gaaatagagc 3840
 ctgagatcat gcctgtaaaa ggtgacaaaa aacactatca aatgccttc aacgcgattc 3900
 30 cgcaaatcga taaattccaa gataacggct atacgtttga ggaaatgaaa atgataaatg 3960
 aaacgaaaaa aatcatgcac atgcctgacc ttcaagtagc ggctacatgt gtgagactgc 4020
 35 caatccaaac tgggcactca gagtccgtct acatcgaat agaccgtgat gacgctacag 4080
 ttgaagatat taaaaatcta ttgaaagaag ctccgggcgt gacacttcag gatgatccaa 4140
 gccagcagct ttatccgatg cctgctgatg ctgtcggcaa aaacgatgtg tttgtaggcc 4200
 40 gcatccgcaa agacttgac agagcaaacg gttttcattt atgggttgtt tctgataacc 4260
 tattaaaagg cgcgcatgg aactctgttc aaattgcaga aagcctgaaa aactaaacc 4320
 45 tcgtataaaa gagagaattt tctaaagacg aatagaagag agtaaggcgc tatcagcctg 4380
 ctctcttctg ttacgtccga ataatttga gtgaaaacag tgaagataat tgttcaaaag 4440
 ttggcggaag catcagtaaa agatgataaa ggccgcaaac tggctttagg gcatattaaa 4500
 50 gaagcaatca gtgaaggata taaggttgtc gttgtcgttt cagcagatggg ccgaaaaggg 4560
 gaccgctatg caacagattc tttgctcggg ctgctttacg gcgatcagtc agcgatttct 4620
 55 cctagggagc aggatttgc tttatcttgc ggagagacta tttcctctgt cgtctttaca 4680
 agcatgctgc ttgataacgg tgtgaaagca gctgcgctga caggggctca ggctggcttt 4740
 ttaacgaatg atcagcatac taatgcgaaa atcattgaaa tgaaccgga gcgtttattc 4800
 60 agtgtgctcg ccaatcatga tgcggtatgc gtcgcaggct tccagggcgc aactgaaaag 4860
 ggtgatacaa caacaatcgg cagagggggc agcgatacgt ctgcagccgc actcggagca 4920

65

ES 2 510 865 T3

gctgttgatg cggaatacat cgatattttc accgatgtag aaggcgtgat gactgctgac 4980
 ccaagagtgg tagaaaatgc aaaaccgctt cctgttgga cgtatacga aatctgcaac 5040
 5 ctggcgtatc agggggccaa ggtcatttct ccgctgctg tggaaatcgc aatgcaggcc 5100
 aaggttccga tccgctccg ttcgacttat tcgaatgata aaggcacatt ggtgacatca 5160
 10 catcactctt ccaaggtcgg cagtgatgtt ttgaaaggc tgattacggg aatcgccat 5220
 gtcaaagatg tcacgcagtt caaagtgcct gcgaaaatcg gccagtataa cgttcagact 5280
 gaagtgttca aggctatggc aaacgctgga atcagtgtcg atttctttaa cattacacct 5340
 15 agtgaatcg tctatacggg agccggaaat aaaacagaaa cagctcagcg tattttaatg 5400
 gatatgggct atgatccaat ggtgacgaga aactgcgca aggtatcggc ggtcggcgcg 5460
 ggcattatgg gtgttcccgg tgttacgtcc aaaattgtat cggctctttc agaaaaagaa 5520
 20 attccgatcc ttcagtcggc tgacagccat acgacgatat ggggtgctct ccatgaagcg 5580
 gatatggttc ctgctgtaaa cgctttgcat gaagtgtttg aactttogaa gtaaatgtga 5640
 25 ttgaatcatg atgaggtgaa taaaatgaat ttcggaaatg tgtctacagc gatgattaca 5700
 ccctttgaca ataaagggaa cgtagacttt caaaaactgt ctacactgat tgattacttg 5760
 ttgaaaaacg gaacggattc tttagtagta gcgggaacaa ctggagaatc tccgaccctt 5820
 30 tcaactgaag aaaaaattgc gctttttgaa tatacggtaa aagaagtaa cggacgggtg 5880
 cccgttatcg ctggactgag gagcaacaac acgaaagatt ccattaagct gacaaaaaaa 5940
 35 gctgaggaag cgggcgtgga cgctgttatg cttgttacc cgtattaca taaaccttct 6000
 caagaaggaa tgtaccagca ttttaaagca attgcggcag agacatctct tccggttatg 6060
 ctctataatg ttcttgccg tacggttget tctcttgctc ctgaaacgac gatccgtttg 6120
 40 gcggcagaca ttccgaatgt ggttgcgatt aaagaagcga gcggagacct cgaagcgatt 6180
 aaaaaatta ttgctgaaac acctgaagac ttctatgtct attcagggga tgatgctcta 6240
 acgcttcaa ttctttcagt tggaggtaga ggagtgtgt cagtggcgag ccatattgca 6300
 45 ggcactgata tgcagcaaat gatcaaaaat tatacgaatg ggcaaacagc taatgcggca 6360
 ctgattcatc agaaactgct gccgattatg aaggaactgt ttaaagcgc taatcctgct 6420
 50 ccagtcaaaa cagcgttca gctgagaggt cttgatgtcg gttctgtgcg tctgcctcta 6480
 gtcccattaa ctgaggatga acgtctgagc ttaagcagca cgatcagca actgtaagaa 6540
 aattcatac agtgaacaa acgcggtcat tctcacattc agctgagttt gaccgtttct 6600
 55 ttacatatt ggttttccct aaaccttctg ctttatcttg ttttctaaat ttactttcag 6660
 ttataatagg aacaagtgat gatggacggg tatgagacta ggaggatata gattttgaaa 6720
 60 aagaaaaata cagaaaacgt tagaattatc gcccttggcg gtgtcggaga gatcgggaat 6780
 taccatthtt ggacagctgt cttttcagca gcagccatta tgctcggggg ctttctcgt 6840
 65 gactttttca cagtgcaaat gattttttat gcaagctcta ttctatattt tttgagtgga 6900

ES 2 510 865 T3

ttgatgatga tgaaacagg ctgacgcggt cagcctgttt ttttatgagg ctgaaatgcg 6960
 gcaccgcata aacgtttttg tgctggagtc gtgctgattt tttttgagcg gaattc 7016

5 <210> 2
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

10 <400> 2

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

ES 2 510 865 T3

Ser His Ile Ala Gly Thr Asp Met Gln Gln Met Ile Lys Asn Tyr Thr
 210 215 220
 5
 Asn Gly Gln Thr Ala Asn Ala Ala Leu Ile His Gln Lys Leu Leu Pro
 225 230 235 240
 10
 Ile Met Lys Glu Leu Phe Lys Ala Pro Asn Pro Ala Pro Val Lys Thr
 245 250 255
 15
 Ala Leu Gln Leu Arg Gly Leu Asp Val Gly Ser Val Arg Leu Pro Leu
 260 265 270
 20
 Val Pro Leu Thr Glu Asp Glu Arg Leu Ser Leu Ser Ser Thr Ile Ser
 275 280 285
 25
 Glu Leu
 290
 30
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <221> Dudoso
 <222> (1)..(21)
 <223> Cebador DapA-F
 40
 <400> 3
 cggcgatcgt ttctgttggc a 21
 45
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55
 <220>
 <221> Dudoso
 <222> (1).. (21)
 <223> Cebador DapA-R
 <400> 4
 atctgggcca taccagcgc t 21
 60
 <210> 5
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

ES 2 510 865 T3

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> Dudoso
 <222> (1) .. (45)
 <223> Cebador bsdapa119muts

10 <400> 5
 tcaagaagga atgtaccagt atttcaaagc aattgcggca gagac 45

15 <210> 6
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

25 <220>
 <221> Dudoso
 <222> (1).. (45)
 <223> Cebador bsdapa119mutas

30 <400> 6
 gtctctgccg caatgcttt gaaatactgg tacattcctt ctga 45

35 <210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <220>
 <221> Dudoso
 <222> (1) .. (27)
 <223> Cebador ptrcBSdapA1-F

50 <400> 7
 ggacactgtc taatgtgagt tagcgcg 27

55 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>
 <221> Dudoso
 <222> (1).. (27)
 <223> Cebador ptrcBSdapA1-R

<400> 8
 cactagtatt gaagcattta tcagggt 27

<210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 10

<220>
 <221> Dudoso
 <222> (1).. (18)
 <223> Cebador ptrcBSdapA2-F
 15

<400> 9
 gcggccgctg tgcaggtc 18

<210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25

<220>
 <221> Dudoso
 <222> (1)..(26)
 <223> Cebador ptrcBSdapA2-R
 30

<400> 10
 gaccactgtc agggttattg tctcat 26

<210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 40

<220>
 <221> Dudoso
 <222> (1).. (23)
 <223> Cebador LDCup
 45

<400> 11
 atgaacatca tgccattat ggg 23

<210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55

<220>
 <221> Dudoso
 60

65

ES 2 510 865 T3

<222> (1).. (23)
 <223> Cebador f1DN

5 <400> 12
 Ttactgctca tacagttcca acg 23

10 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <220>
 <221> Dudoso
 <222> (1)..(20)
 <223> Cebador FRT5

25 <400> 13
 attccgggga tccgtcgacc 20

30 <210> 14
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

35 <220>
 <221> Dudoso
 <222> (1).. (59)
 <223> Cebador HPA1FRT3

<400> 14
 Aacagcacgt tactcgcccg gaagccgctc tggcaagta tgtaggctgg agctgctc 59

REIVINDICACIONES

- 5 1. ADN recombinante replicable de un modo autónomo en una bacteria *Escherichia coli*, en el que el ADN recombinante comprende un gen *dapA* de *B. subtilis* y en el que el gen *dapA* presenta una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos por lo menos idéntica en un 90 % a la SEC ID n.º: 2, y en el que se sustituye el aminoácido histidina de la posición 119 con tirosina, presentando dicha proteína actividad de dihidrodipicolinasintasa (DDPS).
- 10 2. ADN recombinante según la reivindicación 1, en el que el gen *dapA* presenta una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2, y en el que se sustituye el aminoácido histidina de la posición 119 con tirosina.
- 15 3. Bacteria *Escherichia coli* que puede producir L-lisina y que comprende un gen *dapA* de *B. subtilis*, en el que el gen *dapA* presenta una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos por lo menos idéntica en un 90 % a la SEC ID n.º: 2, y en el que se sustituye el aminoácido histidina de la posición 119 con tirosina, presentando dicha proteína actividad de dihidrodipicolinasintasa (DDPS).
- 20 4. Bacteria según la reivindicación 3, en el que el gen *dapA* presenta una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2, y en el que se sustituye el aminoácido histidina de la posición 119 con tirosina.
- 25 5. Bacteria que presenta el número de registro CGMCC n.º 2923 depositada en el Centro General de Recogida de Cultivos Microbiológicos de China.
- 30 6. Bacteria que presenta el número de registro CGMCC n.º 2924 depositada en el Centro General de Recogida de Cultivos Microbiológicos de China.
- 35 7. Bacteria según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en la que la bacteria produce por lo menos 50 gramos por litro de L-lisina en un medio de cultivo.
8. Procedimiento para producir L-lisina que comprende hacer proliferar la bacteria *Escherichia coli* que comprende un gen *dapA* de *B. subtilis* en un medio de cultivo y en el que el gen *dapA* presenta una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos por lo menos idéntica en un 90 % a la SEC ID n.º: 2, y en el que se sustituye el aminoácido histidina de la posición 119 con tirosina, presentando dicha proteína actividad de dihidrodipicolinasintasa (DDPS), y extraer L-lisina del medio de cultivo.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el gen *dapA* presenta una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína con una secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2, y en el que se sustituye el aminoácido histidina de la posición 119 con tirosina.