

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 016**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/04** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2008 E 08708980 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2129786**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos utilizando cepas de la familia Enterobacteriaceae**

30 Prioridad:

**05.03.2007 DE 102007010519**

**25.10.2007 DE 102007051024**

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

**06.11.2014**

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)  
Rellinghauser Strasse 1-11  
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**RIEPING, MECHTHILD;  
THIERBACH, GEORG y  
KREUTZER, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 519 016 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos utilizando cepas de la familia Enterobacteriaceae

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la preparación fermentativa de L-aminoácidos, en particular L-treonina, L-triptófano, L-lisina, L-valina y L-homoserina, utilizando glicerol como fuente de carbono y con ayuda de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, o de las bacterias corineformes que poseen alelos del gen *glpK* que codifican variantes de la glicerol quinasa.
- 10 Estado conocido de la técnica
- L-aminoácidos encuentran aplicación en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y, de manera muy particular, en la alimentación animal.
- 15 Es conocido que los L-aminoácidos se preparan por fermentación de cepas de Enterobacteriaceae, en particular *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*, y de cepas de bacterias corineformes, en particular *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*). Debido a la gran importancia, se trabaja constantemente para mejorar el procedimiento de producción. Las mejoras del procedimiento pueden afectar a medidas técnicas de fermentación tales como, por ejemplo, agitación y suministro de oxígeno, o la composición de los medios nutricios tales como, por ejemplo, la elección del azúcar o la concentración del azúcar utilizado durante la fermentación, o el tratamiento para dar la forma del producto, por ejemplo, mediante, cromatografía de intercambio iónico, o las propiedades intrínsecas de rendimiento de los propios microorganismos.
- 20 Para mejorar las características de rendimiento de estos microorganismos se utilizan métodos de mutagénesis, selección y selección de mutantes. De esta manera se obtienen cepas que son resistentes frente a antimetabolitos tales como, por ejemplo, el análogo de treonina ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivalérico (AHV), o auxotróficas para metabolitos de importancia reguladora, y que producen L-aminoácidos tales como, por ejemplo, L-treonina. Resistencia frente al análogo de triptófano 5-metil-DL-triptófano (5-MT) distingue, por ejemplo, una cepa productora de L-triptófano.
- 25 Desde hace algunos años, también se utilizan métodos de tecnología de ADN recombinante para la mejora de cepas productoras o secretoras cepas de L-aminoácidos de la familia Enterobacteriaceae, amplificando, por ejemplo, genes de la biosíntesis de aminoácidos individuales o alterando las propiedades de genes especiales e investigando el efecto sobre la producción. Informaciones recopilatorias sobre la biología celular y molecular de *Escherichia coli* y *Salmonella* se pueden encontrar en Neidhardt (comp.): *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, 2ª edición, ASM Press, Washington, D.C., EE.UU., (1996).
- 30 Para la preparación de L-aminoácidos, hoy en día se emplea generalmente por la industria de la fermentación glucosa o sacarosa como fuente de carbono. Se está constantemente buscando nuevas y económicas fuentes de materias primas.
- 35 El glicerol (propanotriol) está presente en los aceites y grasas en forma químicamente unida. Conecta como un "puente" las moléculas de ácidos grasos en los triglicéridos. En la fabricación de combustible a partir de aceite de colza (biodiesel, éster metílico de colza) se produce glicerol como un producto de acoplamiento (subproducto). Por lo tanto, éste se encuentra en una medida digna de mención como materia prima en la industria de la fermentación.
- 40 Es conocido que cepas productoras de L-treonina de *Escherichia coli* se desarrollan en glicerol como única fuente de carbono (documento US-A-5.175.107).
- 45 Exposiciones recopilatorias para el metabolismo del glicerol de Enterobacteriaceae se encuentran en Lin (En: Neidhardt (comp.), *Escherichia coli y Salmonella, American Society for Microbiology, Washington, D.C., EE.UU.: 307-342 (1996)*).
- 50 La glicerol quinasa, que se presenta asociada en su forma enzimáticamente activa con el facilitador de *GlpF*, se fosforila utilizando ATP de glicerol citoplásmico (Voegelé et al., *Journal of Bacteriology* 175 (4): 1087-94 (1993)) para formar glicerol-3- fosfato. La actividad de la glicerol quinasa *GlpK* es inhibida alostéricamente por la fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) y la enzima  $\text{IIA}^{\text{Glc}}$ , el fosfoportador dependiente de fosfoenolpiruvato específico para la glucosa: sistema de azúcar-fosfotransferasa (PTS). Según Holtman et al. (*Journal of Bacteriology* 183: 3336-3344 (2001)) FBP domina el control alostérico de la enzima.
- 55 La secuencia de nucleótidos de la forma salvaje del gen que codifica la glicerol-quinasa de *Escherichia coli* fue determinado por Pettigrew et al. (*Journal of Biological Chemistry* 263: 135-139 (1988)) y está disponible, en general, en el banco de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina (Bethesda, MD, EE.UU.) bajo el número de acceso (accession number) U00096 (Región: 4113737-4115245).
- 60

Además, puede deducirse de la solicitud de patente EP 1715055 como secuencia nº 15.

5 En el documento EP 1715055 se describe una mejora en la producción fermentativa de L-aminoácidos por microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae mediante la amplificación del gen glpK.

10 Son conocidos mutantes de glpK de E. coli, en los que está reducida la inhibición de la glicerol quinasa por parte de la enzima IIA<sup>Glc</sup> del PTS (Liu et al., Biochemistry 33: 10120-10126 (1994); Pettigrew et al., Journal of Bacteriology 178: 2846-2852 (1996); Pettigrew et al., Biochemistry 37: 4875-4883 (1998)) o bien la mutación conduce a una activación de la glicerol quinasa por parte de la enzima IIA<sup>Glc</sup> (Pawlyk y Pettigrew, Proceedings of the National Academy of Science USA 99 (17): 11115-11120 (2002)).

15 Además de ello, son conocidos mutantes de glpK de E. coli con (1) actividad incrementada de la glicerol quinasa, en los que (2) está reducida la inhibición por parte de FBP (Herring et al., Nature Genetics 38 (12): 1406-1412 (2006); Pettigrew et al., Journal of Bacteriology 178: 2846-2852 (1996); Honisch et al., Genome Research 14: 2495-2502 (2004)) y en los que (3) adicionalmente está neutralizado el control de la utilización de glicerol por parte del azúcar PTS (Holtman et al., Journal of Bacteriology 183 : 3336-3344 (2001)).

20 Como azúcares PTS se designan azúcares que son recogidos por el sistema PTS. Éstos inhiben la absorción y la utilización de azúcar no PTS o fuentes de carbono no PTS ("represión catabólica") simultáneamente presentes. A los azúcares PTS en Enterobacteriaceae pertenecen, entre otros, glucosa, sacarosa, fructosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, manosa, manitol, N-acetilglucosamina, β-glucósidos y glucitol.

25 Misión de la invención

Los autores de la invención se han propuesto la misión de proporcionar nuevas medidas para la preparación fermentativa mejorada de L-aminoácidos, en particular L-treonina, L-triptófano, L-lisina, L-valina y L-homoserina, usando glicerol.

30 Descripción de la invención

Objeto de la invención es un método para la preparación de L-aminoácidos, preferiblemente L-treonina, L-triptófano, L-lisina, L-valina y L-homoserina, caracterizado porque se llevan a cabo las etapas siguientes:

35 a) fermentación de microorganismos recombinantes secretores de L-aminoácidos de la familia Enterobacteriaceae o de las bacterias corineformes que contienen un alelo glpK que codifica un polipéptido con actividad de glicerol quinasa (ATP-dependiente), cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 95% idéntica a la de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, preferiblemente SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido posee una longitud de 502 aminoácidos y en la posición 428 contiene a cualquier aminoácido  
40 proteinogénico, preferiblemente ácido L-glutámico, ácido L-aspártico, L-isoleucina, L-histidina, L-triptófano y L-fenilalanina, de manera particularmente preferida ácido L-aspártico, en un medio a una temperatura deseada, empleándose como fuente de carbono, en esencia, glicerol o, en esencia, glicerol y uno o más de los azúcares seleccionados del grupo de glucosa, sacarosa y fructosa, y

45 b) acumulación en el caldo de fermentación del L-aminoácido producido.

Por una glicerol quinasa se entiende una enzima que cataliza la fosforilación de glicerol a glicerol-3-fosfato.

50 Por aminoácidos proteinogénicos se entienden los aminoácidos que se presentan en proteínas naturales, es decir, en proteínas de microorganismos, plantas, animales y seres humanos. A ellos pertenecen, en particular, L-aminoácidos seleccionados del grupo ácido L-aspártico, L-asparagina, L-treonina, L-serina, ácido L-glutámico, L-glutamina, glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-prolina, L-arginina y eventualmente L-selenocisteína.

55 Los alelos empleados para las medidas de la invención del gen glpK codifican polipéptidos con la actividad de una glicerol quinasa y con una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% o al menos 96%, de manera particularmente preferida al menos 97% o al menos 98% y de manera muy particularmente preferida al menos 99% idéntica a la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, preferiblemente SEQ ID NO: 2, y adicionalmente contiene un intercambio de aminoácidos en la posición 428. Los polipéptidos codificados poseen una longitud correspondiente a  
60 502 aminoácidos.

Para las medidas de la invención también se pueden emplear polinucleótidos que se hibridan con uno o más de los polinucleótidos seleccionados entre el grupo de polinucleótido complementario a la SEQ ID NO: 1, polinucleótido

5 complementario a la SEQ ID NO: 3 y polinucleótido complementario a la SEQ ID NO: 5, preferiblemente un polinucleótido complementario a la SEQ ID NO: 1 y que codifican polipéptidos que tienen actividad de glicerol quinasa, y que en la posición 428 contiene a cualquier aminoácido proteinogénico, exceptuada glicina, preferiblemente ácido L-glutámico, ácido L-aspartico, L-isoleucina, L-histidina, L-triptófano y L-fenilalanina, de manera particularmente preferida ácido L-aspartico. Los polipéptidos codificados poseen una longitud correspondiente a 502 aminoácidos.

10 Instrucciones sobre la hibridación de secuencias de ADN las encuentra el experto, entre otros, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de la razón social Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar bajo condiciones rigurosas, es decir, se forman sólo híbridos en los que la sonda y la secuencia diana, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son al menos 70% idénticos. Se sabe que la rigurosidad de la hibridación, incluidas las etapas de lavado, se ve influenciada o bien es determinada variando la composición del tampón, la temperatura y la concentración de sal. La reacción de hibridación se lleva a cabo generalmente a una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridization Guide, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996).

15 Para la reacción de hibridación, puede emplearse, por ejemplo, un tampón correspondiente a 5x SSC a una temperatura de aprox. 50°C - 68°C. En este caso, también pueden hibridarse sondas con polinucleótidos que tienen una identidad de menos del 70% con la secuencia de la sonda.

20 Híbridos de este tipo son menos estables y se eliminan por lavado en condiciones restrictivas. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la reducción de la concentración de sal a 2x SSC y, eventualmente, seguidamente a 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aprox. 50°C - 68°C, aprox. 52°C - 68°C, aprox. 54°C - 68°C, aprox. 56°C - 68°C, aprox. 58°C - 68°C, aprox. 60°C - 68°C, aprox. 62°C - 68°C, aprox. 64°C - 68°C, aprox. 66°C - 68°C. Se prefieren intervalos de temperaturas de aprox. 64°C - 68°C o de aprox. 66°C - 68°. Eventualmente, es posible disminuir la concentración de sal a una concentración correspondiente a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Al aumentar gradualmente la temperatura de hibridación en pasos de aprox. 1 - 2°C de 50°C a 68°C se pueden aislar fragmentos de polinucleótidos que poseen, por ejemplo, al menos el 70% o al menos el 80% o al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98 % o al menos el 99% o al menos el 99,9% de identidad con la secuencia de la sonda empleada o bien de las secuencias de nucleótidos representadas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5. Otras instrucciones para la hibridación están comercialmente disponibles en forma de los denominados kits (por ejemplo DIG Easy Hyb de la razón social Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Catálogo 1603558).

35 Para los fines de la invención se emplean, además, alelos del gen glpK que codifican polipéptidos con actividad de glicerol quinasa que comprenden o poseen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6, preferiblemente SEQ ID NO: 2, con el intercambio de aminoácido indicado en la posición 428, y con una o más de las características seleccionadas del grupo

- 40 a) uno a diez intercambios de aminoácidos conservativos,  
b) una prolongación en el extremo C de uno (1) a veinte aminoácidos.

45 Se explica por sí mismo que los intercambios conservativos de aminoácidos mencionados en a) no afectan al intercambio de aminoácido en la posición 428.

El número de intercambios conservadores de aminoácidos es preferiblemente de a lo sumo cinco (5), de manera particularmente preferida de a lo sumo cuatro (4), y de manera muy particularmente preferida de a lo sumo tres (3), o de a lo sumo dos (2).

50 En el caso de los aminoácidos aromáticos, se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian fenilalanina, triptófano y tirosina. En el caso de los aminoácidos hidrófobos, se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian entre sí leucina, isoleucina y valina. En el caso de los aminoácidos polares, se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian entre sí glutamina y asparagina. En el caso de los aminoácidos de carácter básico, se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian entre sí arginina, lisina e histidina. En el caso de los aminoácidos de carácter ácido, se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian entre sí ácido aspártico y ácido glutámico. En el caso de los aminoácidos con contenido en grupos hidroxilo, se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian entre sí serina y treonina.

60 Preferiblemente, la prolongación en el extremo C del polipéptido no es superior a 10, 5, 3 ó 2 aminoácidos.

En la posición 428, se prefiere el intercambio de glicina por ácido L-glutámico (G428E), ácido L-aspartico (G428D), L-isoleucina (G428I), L-histidina (G428H), L-triptófano (G428W) y L-fenilalanina (G428F). Se prefiere particularmente el intercambio por ácido L-aspartico (G428D).

5 En el caso de los microorganismos empleados para las medidas de la invención se trata, en particular, de representantes especialmente recombinantes, secretores de L-aminoácidos, de la familia Enterobacteriaceae o de las bacterias corineformes. Los representantes de las Enterobacteriaceae se eligen preferiblemente de los géneros Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia. Los géneros Escherichia y Serratia son especialmente preferidos. En el caso del género Escherichia se ha de mencionar, en particular, la especie Escherichia coli y en el caso del género Serratia, la especie Serratia marcescens.

10 Entre las bacterias corineformes se prefiere el género Corynebacterium. Particularmente preferidas son cepas que se basan en las especies siguientes: Corynebacterium efficiens, Corynebacterium glutamicum y Corynebacterium ammoniagenes, siendo particularmente preferida la especie Corynebacterium glutamicum.

15 Algunos representantes de la especie Corynebacterium glutamicum se encuentran en el estado conocido de la técnica también bajo otras denominaciones de especies tales como, por ejemplo, Corynebacterium acetoacidophilum, Corynebacterium lilium, Corynebacterium melassecola, Brevibacterium flavum, Brevibacterium lactofermentum y Brevibacterium divaricatum ATCC14020. La expresión "Micrococcus glutamicus" era asimismo habitual para Corynebacterium.

20 Para la preparación de cepas secretoras de L-aminoácidos de la familia Enterobacteriaceae o de las bacterias corineformes, que contienen alelos glpK, que codifican las variantes indicadas de la glicerol quinasa, se utilizan preferiblemente cepas (cepas de partida o cepas parentales), que ya poseen la capacidad de enriquecer el L-aminoácido deseado en la célula y/o en el medio nutricio circundante o bien de acumularse en el caldo de fermentación. Para ello se puede utilizar también el término "producir". En particular, las cepas empleadas para las medidas de la invención poseen la capacidad de enriquecerse o bien de acumularse en la célula y/o en el medio nutricio o bien el caldo de fermentación  $\geq$  en (al menos) 0,25 g/l,  $\geq$  0,5 g/l,  $\geq$  1,0 g/l,  $\geq$  1,5 g/l,  $\geq$  2,0 g/l,  $\geq$  4 g/l o  $\geq$  10 g/l de L-aminoácido  $\leq$  (máximo) 120 horas,  $\leq$  96 horas,  $\leq$  48 horas,  $\leq$  36 horas,  $\leq$  24 horas o  $\leq$  12 horas. En este caso se puede tratar de cepas que fueron preparadas por mutagénesis y selección, mediante técnicas de ADN recombinante o mediante una combinación de ambos métodos.

30 Las cepas secretoras de L-aminoácidos mencionadas producen uno o más, preferiblemente un o esencialmente un aminoácido seleccionado del grupo L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-arginina y L-homoserina, preferiblemente seleccionado del grupo de L-treonina, L-triptófano, L-lisina, L-valina y L-homoserina. El término L-aminoácido o aminoácido también incluye sus sales.

35 La expresión "un o esencialmente un aminoácido" tiene en cuenta que además del L-aminoácido deseado se pueden producir uno o más de otros de los L-aminoácidos (aminoácidos secundarios) mencionados. La proporción de estos aminoácidos secundarios es  $\geq$  0 hasta como máximo 40%, preferiblemente  $\geq$  0 hasta como máximo 20%, de manera particularmente preferida  $\geq$  0 hasta 10% y de manera muy particularmente preferida  $\geq$  0 hasta como máximo 5%, referido a la cantidad del L-aminoácido deseado.

40 Como cepas del género Escherichia, en particular de la especie Escherichia coli, adecuadas como cepas parentales, productoras o bien secretoras de L-treonina, se pueden mencionar, por ejemplo:

- 45 - Escherichia coli H4581 (documento EP 0 301 572)
- Escherichia coli KY10935 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61 (11): 1877-1882 (1997))
- 50 - Escherichia coli VNIIgenetika MG442 (documento US-A-4.278.765)
- Escherichia coli VNIIgenetika M1 (documento US-A-4.321.325)
- Escherichia coli VNIIgenetika 472T23 (documento US-A-5.631.157)
- 55 - Escherichia coli BKIIM B-3996 (documento US-A-5.175.107)
- Escherichia coli kat 13 (documento WO 98/04715)
- 60 - Escherichia coli KCCM-10132 (documento WO 00/09660)

Como cepas del género Serratia, en particular de la especie Serratia marcescens, adecuadas como cepas parentales, productoras o bien secretoras de L-treonina, se pueden mencionar, por ejemplo:

## ES 2 519 016 T3

- *Serratia marcescens* HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38 (6): 1045-1051 (1979))

- *Serratia marcescens* TLR156 (Gene 57 (2-3): 151-158 (1987))

5 - *Serratia marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37 (3): 255-265 (1992)).

Cepas de la familia Enterobacteriaceae, productoras o secretoras de L-treonina, poseen preferiblemente, entre otras, una o más de las características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo: resistencia frente a ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivalérico, resistencia frente a tialisina, resistencia frente a etionina, resistencia frente a  $\alpha$ -metilserina, resistencia frente a ácido diaminosuccínico, resistencia frente a ácido  $\alpha$ -aminobutírico, resistencia frente a borrelidina, resistencia frente a ácido ciclopentano-carboxílico, resistencia frente a rifampicina, resistencia frente a análogos de valina tales como hidroxamato de valina, resistencia frente a análogos de purina tales como, por ejemplo, 6-dimetilaminopurina, necesidad de L-metionina, eventualmente necesidad parcial y compensable de L-isoleucina, necesidad de ácido meso-diaminopimélico, auxotrofia respecto a dipéptidos que contienen treonina, resistencia frente a L-treonina, resistencia frente a refinado de treonina, resistencia frente a L-homoserina, resistencia frente a L-lisina, resistencia frente a L-metionina, resistencia frente a ácido L-glutámico, resistencia frente a L-aspartato, resistencia frente a L-leucina, resistencia frente a L-fenilalanina, resistencia frente a L-serina, resistencia frente a L-cisteína, resistencia frente a L-valina, sensibilidad al fluoropiruvato, treonina-deshidrogenasa defectuosa, eventualmente capacidad para la utilización de sacarosa, refuerzo del operón treonina, refuerzo de la homoserina-deshidrogenasa L-aspartato quinasa I, preferiblemente de la forma resistente a la retro-alimentación, refuerzo de la homoserina quinasa, refuerzo de la treonina sintasa, refuerzo de la aspartato quinasa, eventualmente de la forma resistente a la retro-alimentación, refuerzo de la aspartato semialdehído deshidrogenasa, refuerzo de la fosfoenolpiruvato-carboxilasa, eventualmente de la forma resistente a la retro-alimentación, refuerzo de la fosfoenolpiruvato-sintasa, refuerzo de la transhidrogenasa, refuerzo del producto génico RhtB, refuerzo del producto génico RhtC, refuerzo del producto génico YfiK, refuerzo de una piruvato carboxilasa, y atenuación de la formación de ácido acético.

Como cepas del género *Escherichia*, en particular de la especie *Escherichia coli*, adecuadas como cepas parentales, productoras o bien secretoras de L-triptófano, se pueden mencionar, por ejemplo:

30 - *Escherichia coli* JP4735 / pMU3028 (documento US 5.756.345)

- *Escherichia coli* JP6015 / pMU91 (documento US 5.756.345)

35 - *Escherichia coli* SV164 (pGH5) (documento WO 94/08031)

- *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) (documento US 4.371.614)

- *E. coli* AGX6 (pGX50) aroP (NRRL B-12264) (documento US 4.371.614)

40 - *Escherichia coli* AGX17 / pGX50, pACKG4-pps (documento WO 97/08333)

- *Escherichia coli* ATCC 31743 (documento CA 1182409)

45 - *E. coli* C534 / pD2310, pDM136 (ATCC 39795) (documento WO 87/01130)

- *Escherichia coli* JB102 / p5LRPS2 (documento US 5.939.295).

Cepas de la familia Enterobacteriaceae, productoras o secretoras de L-triptófano, poseen preferiblemente, entre otras, una o más de las características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo: resistencia a 5-metil-DL-triptófano, la resistencia a 5-fluoro-triptófano, resistencia frente a 4-metil-DL-triptófano, resistencia frente a 6-metil-DL-triptófano, resistencia frente a 4-fluoro-triptófano, resistencia frente a 6-fluoro-triptófano, resistencia frente a antranilato, resistencia frente a triptazan, resistencia frente a indol, resistencia frente a ácido indol-acrílico, necesidad de fenilalanina, necesidad de tirosina, eventualmente capacidad para la utilización de sacarosa, refuerzo del operón triptófano, preferiblemente de la antranilato-sintasa, preferiblemente de la forma resistente a la retro-alimentación, una triptofanil-ARN-sintasa parcialmente defectuosa, una absorción atenuada de triptófano, una triptofanasa defectuosa, proteínas represoras inactivadas, refuerzo de la biosíntesis de serina, refuerzo de la síntesis de fosfoenolpiruvato, refuerzo de la síntesis de D-eritrosa-4-fosfato, refuerzo de la síntesis de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DHAP), refuerzo de la biosíntesis de corismato.

60 Como cepa del género *Escherichia*, en particular de la especie *Escherichia coli*, adecuada como cepa parental, productora o bien secretora de L-homoserina, se pueden mencionar, por ejemplo:

*Escherichia coli* NZ10rhtA23/pAL4 (documento US 6.960.455).

Cepas de la familia Enterobacteriaceae, productoras o secretoras de L-homoserina, poseen preferiblemente, entre otras, una o más de las características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo: necesidad de L-treonina, necesidad de L-metionina, necesidad de L-isoleucina, una homoserina-quinasa defectuosa, eventualmente capacidad para la utilización de sacarosa, refuerzo de la homoserina-deshidrogenasa I/aspartato quinasa I, preferiblemente de la forma resistente a la retro-alimentación, refuerzo del producto génico RhtA.

Como cepas del género *Escherichia*, en particular de la especie *Escherichia coli*, adecuadas como cepas parentales, productoras o bien secretoras de L-lisina, se pueden mencionar, por ejemplo:

- *Escherichia coli* pDA1/TOC21R (= CNCM I-167) (documento FR-A-2511032),
- *Escherichia coli* NRRL B-12199 (documento US 4.346.170)
- *Escherichia coli* NRRL B-12185 (documento US 4.346.170).

Como cepa del género *Escherichia*, en particular de la especie *Escherichia coli*, adecuada como cepa parental, productora o bien secretora de L-valina, se pueden mencionar, por ejemplo:

- *Escherichia coli* AJ11502 (NRRL B-12288) (documento US-A-4391907).

Como cepas del género *Corynebacterium*, en particular de la especie *Corynebacterium glutamicum*, adecuadas como cepas parentales, productoras o bien secretoras de L-lisina, se pueden mencionar, por ejemplo:

- *Corynebacterium glutamicum* DM58-1 / pDM6 (= DSM4697) descrita en el documento EP 0 358 940,
- *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B (= DSM16835) descrita en Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology 55(3), 684-688 (1989)),
- *Corynebacterium glutamicum* AHP-3 (= Ferm BP-7382) descrita en el documento EP 1 108 790, y
- *Corynebacterium glutamicum* NRRL B-11474 descrita en el documento US 4.275.157.

Como cepas del género *Corynebacterium*, en particular de la especie *Corynebacterium glutamicum*, adecuadas como cepas parentales, productoras o bien secretoras de L-valina, se pueden mencionar, por ejemplo:

- *Corynebacterium glutamicum* FERM BP-3006, descrita en el documento US 5.521-074, y
- *Corynebacterium glutamicum* FERM BP-1764, descrita en el documento US 5.188-948.

En los trabajos subyacentes a la presente invención se encontró que microorganismos productores de L-aminoácidos de la familia Enterobacteriaceae, después de un intercambio del gen *glpK* de tipo salvaje por un alelo del gen *glpK*, que codifica una variante de la glicerol quinasa dependiente de ATP, que contiene el intercambio de aminoácido G428D, producen en medida creciente L-aminoácidos, en particular L-treonina, L-triptófano, L-lisina, L-valina y L-homoserina.

En los trabajos subyacentes a la presente invención se encontró, además, que microorganismos productores de L-aminoácidos de bacterias corineformes, después de la expresión de un alelo del gen *glpK*, que codifica una variante de la glicerol quinasa dependiente de ATP, que contiene el intercambio de aminoácido G428D, producen en medida creciente L-aminoácidos.

Las secuencias de nucleótidos de los genes o marcos de lectura abiertos (ORF) de *Escherichia coli* pertenecen al estado conocido de la técnica y pueden ser tomados de la secuencia del genoma de *Escherichia coli* publicada por Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)).

El gen *glpK* de *Escherichia coli* K12 codifica una glicerol quinasa dependiente de ATP (*GlpK*, EC N° 2.7.1.30.). La secuencia de nucleótidos del gen de tipo salvaje se encuentra disponible en las bases de datos públicas bajo el número de acceso (Accession No.) U00096 (Región: 4113737-4115245). Se conoce en el estado conocido de la técnica también bajo el nombre de gen alternativo b3926. El polipéptido codificado posee una longitud de 502 aminoácidos. Una vez realizada la traducción, se disocia la metionina N-terminal.

De las especies *Salmonella typhimurium* (N° de acceso: NC 003197 (secuencia de todo el genoma)) y *Shigella flexneri* (N° de acceso: NC 004337 (secuencia de todo el genoma)), que asimismo pertenecen a la familia Enterobacteriaceae se conoce también la secuencia de nucleótidos para el gen *glpK* de tipo salvaje.

5 Las secuencias de ácidos nucleicos pueden tomarse de los bancos de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina (Bethesda, MD, EE.UU.), del banco de datos de la secuencia de nucleótidos de European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania o bien Cambridge, Reino Unido) o del banco de datos de ADN de Japón (DDBJ, Mishima, Japón).

10 Para una mejor visión de conjunto, la secuencia conocida del gen *glpK* del tipo salvaje de *Escherichia coli* está representada bajo la SEQ ID NO: 1 y las secuencias del gen *glpK* del tipo salvaje de *Salmonella typhimurium* o bien *Shigella flexneri*, asimismo conocidas, están representadas bajo la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 5. Las proteínas codificadas por estos marcos de lectura se representan como SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6.

15 Es conocido que el aminoácido metionina N-terminal puede ser disociado por enzimas propias del hospedante (metionina-aminopeptidasa). Los datos de posición para los residuos de aminoácidos respectivos se desplazan en consecuencia. Por ejemplo, el ácido L-aspartico se mueve desde la posición 11 del polipéptido codificado (véase la SEQ ID NO: 2) después de la separación de la metionina N-terminal a la posición 10.

20 Como marco de lectura abierto (ORF, open reading frame) se designa un segmento de una secuencia de nucleótidos que codifica o puede codificar una proteína o bien un polipéptido o ácido ribonucleico, a la o al cual de acuerdo con el estado conocido de la técnica, no se la/le asigna función alguna. Después de asignar una función al segmento correspondiente de la secuencia de nucleótidos, se habla, en general, de un gen. Por alelos se entiende, por lo general, formas alternativas de un gen dado. Las formas se caracterizan por diferencias en la secuencia de nucleótidos.

25 Químicamente, un gen o alelo es un polinucleótido. Otro término para esto es ácido nucleico, particularmente ácido desoxirribonucleico.

Los términos polipéptido y proteína son intercambiables.

30 Como producto génico se designa, en general, la proteína codificada o el ácido ribonucleico codificado por una secuencia de nucleótidos, es decir, un ORF, un gen o un alelo.

Para la generación de los alelos *glpK*, que pasan a emplearse en los microorganismos empleados para el procedimiento de acuerdo con la invención, se utilizan, entre otros, métodos descritos en la técnica para la mutagénesis dirigida.

35 Pueden utilizarse procedimientos de la mutagénesis dirigida al sitio utilizando oligonucleótidos mutagénicos (T.A. Brown: *Gentechnologie für Einsteiger*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tal como se describen en el manual de Gait: *Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1984) o por Newton y Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994). Las mutaciones generadas pueden determinarse y verificarse mediante secuenciación de ADN, por ejemplo según el método de Sanger et al. (*Proceedings of the National Academy of Science USA* 74 (12): 5463-5467 (1977)).

40 Para la construcción de mutaciones puntuales en el gen *glpK* se utiliza, por ejemplo, el kit Quick Change Site-Directed Mutagenesis de Stratagene (Amsterdam, Holanda). Al utilizar estos métodos, el gen *glpK* descrito en el estado conocido de la técnica se amplifica a partir de ADN aislado total de una cepa de tipo salvaje con ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se clona en vectores de plásmido adecuados y luego el ADN se somete al proceso de mutagénesis. Mediante "GeneSOEing" (término inglés de corte y empalme del gen por extensión y solapamiento, Horton, *Molecular Biotechnology* 3: 93-98 (1995)), se pueden obtener las mutaciones puntuales ya por PCR.

50 Los alelos *glpK* generados pueden incorporarse en cepas adecuadas, por ejemplo mediante transformación y el procedimiento de intercambio de genes o bien alelos.

55 Un método habitual en *Enterobacteriaceae* es el método descrito por Hamilton et al. (*Journal of Bacteriology* 174, 4617 - 4622 (1989)) del intercambio de genes con ayuda de un derivado pSC101 condicionalmente replicante pMAK705 o pKO3 (Link et al, *Journal of Bacteriology* 179: 6228-6237). Pueden utilizarse asimismo otros métodos descritos en el estado conocido de la técnica tales como, por ejemplo, el de Martínez-Morales et al. (*Journal of Bacteriology* 1999, 7143-7148 (1999)) o el de Boyd et al. (*Journal of Bacteriology* 182, 842-847 (2000)).

Asimismo, es posible convertir mediante conjugación o transducción los alelos *glpK* generados en diversas cepas.

60 Las mutaciones de *glpK* pueden llevarse a cabo asimismo en plásmidos de expresión, de tal manera que se pueden producir en exceso las proteínas resultantes.

En un procedimiento de acuerdo con la invención, también se pueden sobre-exresar los alelos *glpK* que codifican las variantes de glicerol quinasa expuestas.



Así, en el estado conocido de la técnica se describen numerosos promotores que hacen posible ajustar una concentración o actividad deseada de la variante de glicerol quinasa respectiva. Por ejemplo, se puede emplear el promotor *lysC* del mutante DM58-1, que se describe por Kalinowski et al. (*Molecular Microbiology* 5(5) 1197-1204 (1991)), o el promotor *gap*, que se describe en la solicitud de patente con el número de solicitud EP 06007373.1. Además, pueden emplearse los promotores descritos en la solicitud de patente con el número de solicitud EP 06117294.6, los promotores descritos en la revista *Research Disclosure* (Artículo 512057 en la edición de diciembre de 2006, páginas 1616 a 1618), los promotores descritos por Patek et al. (*Journal of Biotechnology* 104 (1-3), 311-323 (2003)) o las variantes del promotor *dapA* descritas por Vasicova et al. (*Journal of Bacteriology* 181, 6188-6191 (1999)), por ejemplo del promotor A25.

De igual manera, pueden emplearse también los promotores conocidos de la genética de *Escherichia coli* tales como, por ejemplo, el promotor *tac*, el promotor *trp*, el promotor *trc* y el promotor *lpp*, o el promotor  $P_L$  y  $P_R$  del fago  $\lambda$ .

El polinucleótido provisto de esta forma con un promotor puede ser incorporado en forma de una (1) o varias copias en la bacteria corineforme deseada.

Para ello, pueden utilizarse por ejemplo plásmidos que son replicados por bacterias corineformes. Vectores de plásmidos adecuados son, por ejemplo, pZ1 (Menkel et al., *Applied and Environmental Microbiology* (1989) 64: 549-554) o los vectores pSELF descritos por Tauch et al. (*Journal of Biotechnology* 99, 79-91 (2002)). Un artículo ilustrativo sobre el tema plásmidos en *Corynebacterium glutamicum* se encuentra en Tauch et al. (*Journal of Biotechnology* 104, 27-40 (2003)).

Además, en el cromosoma de una bacteria corineforme se puede introducir una copia del polinucleótido.

En una forma de realización de este tipo se utiliza un plásmido no replicativo en bacterias corineformes. En este caso, en el extremo 5' y en el extremo 3' del gen deseado, que codifica un polipéptido con actividad glicerol quinasa, se agrega un fragmento de ADN que representa el sitio diana dentro del cromosoma de la bacteria corineforme en el que se integra el gen correspondiente mediante recombinación homóloga. Sitios diana adecuados para *Corynebacterium glutamicum* se describen, entre otros, en la Tabla 3 del documento WO 03/040373, en las Tablas 12 y 13 del documento WO 04/069996, en Aham et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 67 (12), 5425-5430 (2001)), o Correia et al. (*FEMS Microbiology Letters* 142, 259-264 (1996)). Después de la conjugación o transformación y recombinación homóloga mediante al menos dos sucesos de recombinación, la cepa resultante contiene al menos dos copias del gen respectivo.

Además, puede ser ventajoso para la producción de L-aminoácidos, además del empleo de uno de los alelos *glpK* indicados, reforzar una o más enzimas de la vía específica de la biosíntesis respectiva.

Puede ser ventajoso para la producción de L-treonina con cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, además del empleo de uno de los alelos *glpK* indicados, reforzar una o más enzimas de la conocida vía de la biosíntesis de treonina o enzimas del metabolismo anaplerótico o enzimas para la producción de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido o enzimas de la glucólisis o enzimas PTS o enzimas del metabolismo del azufre. En general, se prefiere el uso de genes endógenos.

Puede ser ventajoso para la producción de L-triptófano con cepas de la familia *Enterobacteriaceae*, además del empleo de uno de los alelos *glpK*, reforzar una o más enzimas de la conocida vía de la biosíntesis de triptófano o enzimas de la biosíntesis de serina o enzimas para la producción de 3-desoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato (DHAP) y corismato. En general, se prefiere el uso de genes endógenos.

Por "genes endógenos" o "secuencias de nucleótidos endógenas" se entienden los genes o marcos de lectura abiertos o alelos o bien secuencias de nucleótidos presentes en la población de una especie.

El término "refuerzo" en este contexto describe el aumento en la actividad intracelular o concentración de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo que son codificadas por el correspondiente ADN, aumentando, por ejemplo, el número de copias del gen o bien de los genes, del ORF o bien de los ORFs en al menos una (1) copia, enlazando funcionalmente un fuerte promotor con el gen, o utilizando un gen o alelo u ORF que codifica una enzima o bien proteína correspondiente con una actividad alta, y opcionalmente combinando estas medidas.

Microorganismos recombinantes con un refuerzo de este tipo se generan, por lo general, mediante transformación, transducción o conjugación, o una combinación de estos métodos, con un vector que contiene el gen deseado, el ORF deseado, un alelo de este gen u ORFs o partes de los mismos, y/o que contiene un promotor que refuerza la expresión del gen o del ORF. En el caso de este promotor se puede tratar del promotor que procede de una mutación reforzante de la propia secuencia reguladora, que se encuentra aguas arriba del gen u ORF, o se fusiona un promotor adecuado o

eficaz con el gen u ORF.

5 Mediante las medidas de mejora, especialmente la sobre-expresión, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se incrementa, en general, en al menos un 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, como máximo en hasta 1000% o 2000%, referido a la de la proteína de tipo salvaje o bien a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo no recombinante o cepa parental para la correspondiente enzima o bien proteína. Por microorganismo no recombinante o cepa parental (parent strain) se entiende el microorganismo en el cual se llevan a cabo las medidas de refuerzo.

10 Para lograr una sobre-expresión, se puede aumentar el número de copias de los genes o marcos de lectura abierta correspondientes, o se puede mutar la región del promotor y de regulación o el sitio de unión al ribosoma, localizado aguas arriba del gen estructural. De la misma manera actúan las casetes de expresión que son incorporadas aguas arriba del gen estructural. Mediante promotores inducibles, es adicionalmente posible aumentar la expresión en el  
15 transcurso de la producción fermentativa de L-treonina y L-triptófano, además puede ser ventajoso el uso de promotores para la expresión de genes que posibilita una expresión génica cronológica diferente. En el nivel de la regulación traduccional de la expresión génica, es posible aumentar la frecuencia de iniciación (reacción de adición del ribosoma al ARNm) o la velocidad de la elongación (fase de prolongación). La expresión se mejora asimismo mediante medidas para prolongar la vida útil del ARNm. Además, al impedir la degradación de la proteína enzimática, se potencia asimismo la actividad enzimática. Los ORFs, genes o construcciones génicas pueden estar presentes en plásmidos con  
20 diferentes números de copias o pueden estar integrados y amplificados en el cromosoma. Alternativamente, se puede lograr una sobre-expresión de los genes pertinentes mediante la alteración de la composición de los medios y la realización del cultivo.

Métodos para la sobre-expresión se describen suficientemente en el estado conocido de la técnica - por ejemplo en  
25 Makrides et al. (Microbiological Reviews 60 (3), 512-538 (1996)) -. Mediante el uso de vectores, se incrementa el número de copias en al menos una (1) copia. En calidad de vectores se pueden utilizar plásmidos tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 5.538.873. Como vectores pueden utilizarse asimismo fagos, por ejemplo el fago Mu tal como se describe en el documento EP 0332448, o el fago lambda ( $\lambda$ ). Un aumento en el número de copias también se puede lograr incorporando una copia adicional en otro sitio del cromosoma - por ejemplo, en el sitio att del fago  $\lambda$  (Yu y Court, Gene 223, 77-81 (1998)) - . En el documento US 5.939.307 se describe que mediante la incorporación de  
30 casetes de expresión o promotores tales como, por ejemplo, el promotor tac, el promotor trp, el promotor lpp o el promotor P<sub>L</sub> y el promotor P<sub>R</sub> del fago  $\lambda$ , por ejemplo aguas arriba del operón treonina cromosómico, se puede conseguir un aumento de la expresión. Del mismo modo, se pueden utilizar los promotores del fago T7, los promotores de la caja de cambios o el promotor nar. Casetes de expresión o promotores de este tipo también se pueden utilizar para sobre-expresar, tal como se describe en el documento EP 0 593 792, genes unidos a plásmidos. Mediante el uso del alelo lacI<sup>Q</sup> se puede controlar de nuevo la expresión de genes unidos a plásmidos (Glascock y Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)). Además, es posible que la actividad de los promotores se incremente mediante la modificación de su  
35 secuencia por medio de uno o más intercambios de nucleótidos, mediante inserción o inserciones y/o deleción o deleciones. Otra expresión cronológica de genes se puede conseguir, por ejemplo, tal como se describe en Walker, et al. (Journal of Bacteriology 181: 1269-80 (1999)) mediante el uso del promotor fis dependiente de la fase de crecimiento. La velocidad de elongación se ve afectada por el uso del codón, mediante el uso de codones para los ARNts que se presentan con frecuencia en la cepa parental (parent strain) se puede reforzar la expresión génica.

Instrucciones generales las encuentra el experto en la materia, entre otros, en Chang y Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), en Hartley y Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), en Amann y Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), en de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), en LaVallie et al. (BIO / TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), en el documento PCT/US97/13359, en Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), en Quandt y Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), en Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), en Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) y  
50 en libros de texto conocidos de genética y biología molecular.

Se pueden utilizar vectores de plásmidos replicables en Enterobacteriaceae tales como, por ejemplo, vectores de clonación derivados de pACYC184 (Bartolomé et al.; de Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) o derivados de pSC101 (Vocke y Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21): 6557-6561 (1983)). En un procedimiento de acuerdo con la invención se puede emplear una cepa transformada con un vector, preferiblemente el vector del plásmido, portando el vector al menos uno o más de los genes que se mencionan en lo que sigue o sus secuencias de nucleótidos o alelos codificadores de productos génicos.

60 Así, por ejemplo, para la producción de L-treonina, se pueden reforzar, en particular sobre-expresar, al mismo tiempo uno o más de los genes seleccionados del grupo

- al menos un gen del operón thrABC que codifica la aspartato quinasa, la homoserina deshidrogenasa, la homoserina quinasa y la treonina sintasa (documento US-A-4.278.765),

## ES 2 519 016 T3

- el gen *pyc* de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la piruvato carboxilasa (documento WO 99/18228),
- el gen *pps* que codifica la fosfoenolpiruvato-sintasa (*Molecular and General Genetics* 231 (2): 332-336 (1992)),
- el gen *ppc* que codifica la fosfoenolpiruvato-carboxilasa (documento WO 02/064808),
- los genes *pntA* y *pntB* que codifican las subunidades de la transhidrogenasa (*European Journal of Biochemistry* 158: 647-653 (1986)),
- el gen *rhtC* que codifica la proteína inductora de resistencia frente a treonina (documento EP-A-1 013 765),
- el gen *thrE* que codifica la proteína portadora de la exportación de treonina de *Corynebacterium glutamicum* (documento WO 01/92545),
- el gen *gdhA* que codifica la glutamato-deshidrogenasa (*Nucleic Acids Research* 11: 5257-5266 (1983); *Gene* 23: 199-209 (1983)),
- el gen *ptsH* del operón *ptsHIcrr* que codifica la proteína fosfohistidina-hexosa- fosfotransferasa del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
- el gen *ptsI* del operón *ptsHIcrr* que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
- el gen *crr* del operón *ptsHIcrr* que codifica el componente IIA específico para glucosa del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
- el gen *ptsG* que codifica el componente IIBC específico para glucosa (documento WO 03/004670),
- el gen *cysK* que codifica la cisteína-sintasa A (documento WO 03/006666),
- el gen *cysB* que codifica el regulador del regulón *cys* (documento WO 03/006666),
- el gen *cysJ* del operón *cysJIH* que codifica la flavoproteína de la NADPH-sulfito- reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen *cysI* del operón *cysJIH* que codifica la hemoproteína de la NADPH-sulfito- reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen *cysH* del operón *cysJIH* que codifica la adenilsulfato-reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen *sucA* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad descarboxilasa de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa (documento WO 03/008614),
- el gen *sucB* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad E2 dihidrolipolitranssuccinasa de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa (documento WO 03/008614)
- el gen *sucC* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- el gen *sucD* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad  $\alpha$  de la succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yibD* de *Escherichia coli* (Número de Acceso AE000439 del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento WO 05/075627).

Además, por ejemplo para la producción de L-triptófano, se pueden reforzar, en particular sobre-expresar, al mismo tiempo uno o más de los genes seleccionados del grupo

- al menos un gen del operón triptófano que codifica la antranilato-sintasa, la antranilato fosforribosiltransferasa, la fosforribosilantranilato-isomerasa, la indol-3-glicerolfosfato-sintasa y la triptófano-sintasa (*Applied and Environmental Microbiology* 38 (2): 181- 190 (1979)),

## ES 2 519 016 T3

- el gen serA que codifica la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (documento WO 87/01130),
- 5 • el gen serB que codifica la fosfoserinafosfatasa (documento WO 87/01130),
- el gen serC que codifica la fosfoserina-aminotransferasa (documento WO 87/01130),
- el gen aroF que codifica la DHAP-sintasa sensible a L-tirosina (documento WO 87/01130; documento EP 1270721),
- 10 • el gen aroG que codifica la DHAP-sintasa sensible a L-fenilalanina (documento WO 87/01130; documento EP 1270721),
- el gen aroH que codifica la DHAP-sintasa sensible a L-triptófano (documento WO 87/01130; documento EP 1270721),
- 15 • el gen pps que codifica la fosfoenolpiruvato-sintasa (documento WO 96/08567)
- el gen pckA que codifica la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (documento WO 2004/090125),
- 20 • el gen tktA que codifica la transcetolasa A (documento US 5.168.056),
- el gen tktB que codifica la transcetolasa B (documento US 5.168.056),
- 25 • el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yddG de Escherichia coli (Número de Acceso NC000913 (Región 1544312-1545193) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento EP 1449918).

30 Además, para la preparación de los L-aminoácidos se fermentan microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en los que para optimizar el metabolismo del glicerol, se pueden reforzar, en particular sobre-expresar, al mismo tiempo uno o más de los genes seleccionados del grupo además simultáneamente uno o más de los genes seleccionados del grupo (documento EP 1715055):

- 35 • el gen glpA que codifica la subunidad grande de la sn-glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (anaerobia),
- el gen glpB que codifica la subunidad para el anclaje a membrana de la sn-glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (anaerobia),
- 40 • el gen glpC que codifica la subunidad pequeña de la sn-glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (anaerobia),
- el gen glpD que codifica la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (aerobia),
- el gen glpE que codifica la azufre-transferasa,
- 45 • el gen glpF que codifica el facilitador del glicerol GlpF,
- el gen glpG,
- 50 • el gen glpQ que codifica la glicerolfosfodiesterasa periplasmática,
- el gen glpT que codifica la glicerol-3-fosfato-permeasa,
- el gen glpX que codifica la fructosa-1,6-bisfosfatasa II,
- 55 • el gen tpiA que codifica la triosafofosfato-isomerasa,
- el gen gldA que codifica la glicerol-deshidrogenasa (NAD-dependiente),
- 60 • el gen dhaK que codifica el dominio N-terminal de la dihidroxiacetona-quinasa,
- el gen dhaL que codifica el dominio C-terminal de la dihidroxiacetona-quinasa,
- el gen dhaM que codifica la subunidad de la proteína PTS de la dihidroxiacetona-quinasa,

- el gen dhaR que codifica el activador del operón dha,
- el gen fsa que codifica la fructosa-6-fosfato aldolasa I, y
- el gen talC que codifica la fructosa-6-fosfato aldolasa II.

Además, para la preparación de los L-aminoácidos se fermentan microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en los que para optimizar el metabolismo del glicerol, se atenúa, en particular, se elimina o se reduce adicionalmente al mismo tiempo el gen glpR que codifica el represor del regulón glp (documento EP 1715056).

El término "atenuación" en este contexto describe la reducción o eliminación de la actividad o concentración intracelular de una o más enzimas o bien proteínas en un microorganismo que son codificadas por el ADN correspondiente, utilizando, por ejemplo, un promotor más débil que en el microorganismo o cepa parental no recombinante para la enzima o bien proteína correspondiente, o un gen o bien alelo que codifica una enzima o bien proteína correspondiente con una baja actividad o bien inactiva la enzima o la proteína correspondiente, o el marco de lectura abierto o el gen, y eventualmente se combinan estas medidas.

Mediante las medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce, por lo general, a 0 hasta 75%, a 0 hasta 50%, a 0 hasta 25%, a 0 hasta 10% o a 0 hasta 5% de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o bien de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo no recombinante o cepa parental. Por microorganismo no recombinante o cepa parental (parent strain) se entiende el microorganismo para el que se lleven a cabo las medidas de atenuación.

Para lograr una atenuación se pueden reducir o eliminar, por ejemplo, la expresión de los genes o marcos de lectura abiertos o las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas. Eventualmente pueden combinarse ambas medidas.

La reducción en la expresión génica puede tener lugar mediante una realización adecuada del cultivo, por modificación genética (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica o también mediante la técnica de ARN antisentido. Estructuras de señal de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión a ribosoma, el codón de iniciación y terminadores. Datos al respecto los encuentra el experto en la materia, entre otros, por ejemplo en Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58: 191-195 (1998)), en Carrier y Keasling (*Biotechnology Progress* 15: 58-64 (1999)), Franch y Gerdes (*Current Opinion in Microbiology* 3: 159-164 (2000)) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("*Molekulare Genetik*", 6ª Edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995) o de Winnacker ("*Gene und Klone*", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990).

Una reducción de la expresión génica también se puede lograr mediante la incorporación de una mutación en el codón de terminación la región codificadora de un gen deseado con la supresión simultánea de la mutación en el codón de terminación de un supresor de ARNt adecuado. Este modo de proceder se describe en el documento WO 03/074719.

Mutaciones que conducen a un cambio o bien una reducción de las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas son conocidas del estado de la técnica. Como ejemplos se pueden mencionar los trabajos de Qiu y Goodman (*Journal of Biological Chemistry* 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5511-5515 (1998)), Wentz y Schachmann (*Journal of Biological Chemistry* 266: 20833-20839 (1991)).

Presentaciones recopilatorias se pueden tomar de libros de texto de genética y biología molecular conocidos tales como, por ejemplo, del de Hagemann ("*Allgemeine Genetik*", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

En calidad de mutaciones entran en consideración transiciones, transversiones, inserciones y deleciones de al menos un (1) par de bases o bien nucleótidos. Dependiendo del efecto del intercambio de aminoácidos causado por la mutación sobre la actividad enzimática, se habla de mutaciones de sentido erróneo ("missense mutations") o mutaciones sin sentido ("nonsense mutations"). La mutación sin sentido conduce a un intercambio de un aminoácido dado en una proteína por otro, tratándose, en particular, de un intercambio no conservador de aminoácido. Con ello se perjudica la funcionalidad o bien actividad de la proteína y se reduce a un valor de 0 a 75%, 0 a 50%, 0 a 25%, 0 a 10% o 0 a 5%. La mutación sin sentido conduce a un codón de terminación en la región codificante del gen y, con ello, a una interrupción prematura de la traducción. Inserciones o deleciones de al menos un par de bases en un gen conducen a mutaciones de desplazamiento de marco ("frame shift mutations"), que conducen a que se incorporen aminoácidos incorrectos o a que se interrumpa de forma prematura la traducción. Si como consecuencia de la mutación se forma un codón de terminación en la región codificante, entonces esto conduce asimismo a una interrupción prematura de la traducción. Deleciones de al menos uno (1) o más codones conducen típicamente asimismo a una pérdida completa de la actividad enzimática. Las medidas mencionadas se llevan a cabo preferiblemente en la parte 5'-terminal de la región codificadora, que codifica el extremo N del polipéptido. Si la longitud total de un polipéptido (medida como el número de

L-aminoácidos unidos químicamente) se designa con 100%, entonces pertenecen – en el marco de las medidas de atenuación de la presente invención – al extremo N del polipéptido la parte de la secuencia de aminoácidos, que, calculada a partir del aminoácido de partida L-formil-metionina contiene 80% de los siguientes L-aminoácidos.

5 Instrucciones para generar mutaciones de este tipo pertenecen al estado conocido de la técnica y pueden tomarse de libros de texto de genética y biología molecular conocidos tales como, por ejemplo, del libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik", 6ª Edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), del de Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o del de Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

10 Mutaciones adecuadas en los genes pueden incorporarse en cepas adecuadas mediante intercambio de genes o alelos.

15 Un método habitual es el método descrito por Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)) del intercambio de genes con ayuda de un derivado de pSC101 pMAK705 condicionalmente replicante. Asimismo pueden utilizarse otros métodos descritos en el estado conocido de la técnica tales como el de Martínez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 181: 7143-7148 (1999)) o el de Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182: 842-847 (2000)).

20 Es asimismo posible transferir por conjugación o transducción en diversas cepas mutaciones en los genes respectivos o mutaciones que afectan a la expresión de los respectivos genes o marcos de lectura abiertos.

25 Explicaciones más detalladas sobre los términos y expresiones de la genética y la biología molecular se puede encontrar en los libros de texto de genética y biología molecular conocidos tales como, por ejemplo, el libro de texto de Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4ª ed., Springer Verlag, Nueva York (EE.UU.), 2000) o el libro de texto de Berg, Tymoczko y Stryer (Biochemistry, 5ª ed., Freeman and Company, Nueva York (EE.UU.), 2002) o el manual de Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (conjunto de 3 volúmenes), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE.UU.), 2001).

30 Además, para la producción de L-treonina puede ser ventajoso atenuar, en particular eliminar o reducir la expresión, adicionalmente al empleo de uno de los alelos de glpK indicados, uno o más de los genes seleccionados del grupo

- el gen tdh que codifica la treonina-deshidrogenasa (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- 35 • el gen mdh que codifica la malato-deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yjfA de Escherichia coli (Número de Acceso AAC77180 del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento WO 02/29080),
- 40 • el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) ytfP de Escherichia coli (Número de Acceso AAC77179 del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento WO 02/29080),
- 45 • el gen pckA que codifica la enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (documento WO 02/29080),
- el gen poxB que codifica la piruvato-oxidasa (documento WO 02/36797),
- 50 • el gen dgsA que codifica el regulador DgsA del sistema de fosfotransferasa (documento WO 02/081721), que también se conoce bajo la denominación gen mlc,
- el gen fruR que codifica el represor de fructosa (documento WO 02/081698), que también se conoce bajo la denominación gen cra,
- 55 • el gen rpoS que codifica el factor sigma<sup>38</sup> (documento WO 01/05939), que también se conoce bajo la denominación gen katF, y
- el gen aspA que codifica para la aspartato amonio-liasa (documento WO 03/008603).

60 Estas medidas se llevan a cabo eventualmente, además de o en combinación apropiada con las medidas indicadas para reforzar la producción de treonina y las medidas para optimizar el metabolismo del glicerol.

Además, para la producción de L-triptófano puede ser ventajoso atenuar, en particular eliminar o reducir la expresión, adicionalmente al empleo de uno de los alelos de glpK indicados, uno o más de los genes seleccionados del grupo

- el gen tnaA que codifica triptofanasa (documento US 4.371.614),
- 5 • el gen trpR que codifica el represor del operón trp (documento US 4.371.614),
- el gen tyrA que codifica la corismato-mutasa T y la preferato-deshidrogenasa (documento US 4.371.614),
- el gen pheA que codifica la corismato-mutasa P y la preferato-deshidrogenasa (documento US 4.371.614),
- 10 • el gen mtr que codifica la proteína de transporte específica para triptófano (documento US 5.756.345),
- el gen tnaB que codifica la triptófano-permeasa (documento US 5.756.345),
- el gen aroP que codifica el transportador para aminoácidos aromáticos (documento US 5.756.345),
- 15 • el gen sdaA que codifica la L-serina deaminasa (documento EP 0149539),
- el gen pgi que codifica la glucosa-6-fosfato-isomerasa (documento WO 87/01130),
- 20 • el gen tyrB que codifica la tirosina-aminotransferasa (documento WO 87/01130).

Estas medidas se llevan a cabo eventualmente, además de o en combinación apropiada con las medidas indicadas para reforzar la producción de triptófano y las medidas para optimizar el metabolismo del glicerol.

25 Además, para la producción de L-aminoácidos, puede ser ventajoso, además del empleo de uno de los alelos glpK indicados, eliminar reacciones secundarias indeseadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (comps.), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

30 El rendimiento de las bacterias aisladas o del proceso de fermentación utilizando el mismo con respecto a uno o más de los parámetros elegidos del grupo de la concentración del producto (producto por volumen), del rendimiento del producto (producto formado por fuente de carbono consumida) y la formación de producto (producto formado por volumen y tiempo) o también otros parámetros del proceso y combinaciones de los mismos, se incrementa en al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 1,5% o al menos 2% referido al microorganismo o cepa parental no recombinante o bien  
35 al proceso de fermentación utilizando el mismo.

De acuerdo con la invención, los microorganismos producidos se cultivan en un procedimiento por lotes (cultivo por lotes), en un procedimiento por lotes alimentados (proceso de alimentación), en un procedimiento por lotes alimentados repetidos (proceso de alimentación repetitivo) o en un procedimiento continuo. Compendios sobre este tipo de métodos  
40 están disponibles en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

45 En un procedimiento por lotes, con unas pocas excepciones tales como, por ejemplo, oxígeno y agentes correctores del pH, todos los materiales de partida se disponen en forma de una tanda y el microorganismo se cultiva en el medio obtenido.

50 En el caso de un procedimiento por lotes alimentados se cultiva primero el microorganismo por medio de un proceso por lotes (fase de lotes). A continuación de ello, se añade al cultivo una sustancia de partida esencial para la preparación del producto, eventualmente también varias sustancias de partida, de forma continua o discontinua (fase de alimentación, feed-phase). En el caso de la preparación de L-aminoácidos, en este caso se trata de una fuente de carbono.

55 En el caso de un procedimiento por lotes alimentados repetidos se trata de un procedimiento por lotes alimentados, en el que, después de finalizada la fermentación, una parte del caldo de fermentación sirve como inóculo para iniciar un procedimiento por lotes alimentados repetidos renovado. Eventualmente, este ciclo se puede repetir varias veces. Procedimientos por lotes alimentados repetidos se describen, por ejemplo, en el documento WO 02/18543 y WO 05/014843.

60 En el caso de un procedimiento continuo, a continuación de un procedimiento por lotes o por lotes alimentados, se añaden continuamente al cultivo una o varias, eventualmente todas las sustancias de partida y, al mismo tiempo, se retira caldo de fermentación. Procedimientos continuos se describen, por ejemplo, en los documentos de patente US 5.763.230, WO 05/014840, WO 05/014841 y WO 05/014842.

- 5 El medio de cultivo o bien el medio de fermentación a utilizar debe satisfacer de una manera adecuada los requisitos de las cepas respectivas. Descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la Sociedad Americana de Bacteriología (Washington D.C., EE.UU., 1981). Los términos medio de cultivo, medio de fermentación y medio nutricio son intercambiables entre sí.
- En general, un medio de cultivo contiene, entre otros, una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y fuentes de fósforo.
- 10 El medio de cultivo debe comprender, además, sales de metales, tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, además de las sustancias arriba mencionadas, pueden emplearse sustancias de crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas.
- 15 Por fuente de carbono se entienden en el marco de esta invención compuestos que únicamente contienen carbono, oxígeno e hidrógeno en la molécula y que se aprovechan por los microorganismos para la formación de su biomasa (masa celular) y para la producción de los L-aminoácidos. En un procedimiento de acuerdo con la invención, en un aspecto la fuente de carbono se compone esencialmente de glicerol, y en otro aspecto se compone esencialmente de glicerol y de uno o más de los azúcares seleccionados del grupo de glucosa, sacarosa, fructosa, trehalosa, maltosa, celobiosa, manosa, manitol, N-acetilglucosamina,  $\beta$ -glucósidos y glucitol, preferiblemente se compone en esencia de uno o más de los azúcares seleccionados del grupo de glucosa, sacarosa y fructosa.
- 20 La expresión "en esencia" tiene en cuenta en este contexto, por una parte, el hecho de que en los procesos industriales de fermentación para la producción de L-aminoácidos se utilizan sustancias de partida no sólo químicamente puras, sino también sustancias de partida eventualmente contaminadas de calidad técnica o inferior. Además, la expresión tiene en cuenta la composición de componentes de medios típicos complejos microbiológicos, la modificación química de las sustancias de partida como consecuencia de la esterilización por el calor y, finalmente, la transmisión de componentes de medios o componentes del caldo de fermentación que resulta de la inoculación de un medio nutricio por medio de un cultivo previo (un inóculo).
- 25 En un procedimiento de acuerdo con la invención puede utilizarse no sólo glicerol químicamente puro, sino también glicerol de calidad técnica (glicerol bruto). Glicerol de calidad técnica contiene pequeñas concentraciones de compuestos que resultan en el proceso de preparación y que no fueron separados por completo. A ellos pertenecen, entre otros, agua, diversas sales y compuestos orgánicos.
- 30 El glicerol bruto, que se obtiene a partir de aceite de colza, contiene, por ejemplo, como impurezas, compuestos tales como ácido linoleico, ácido linolénico, ácido oleico y sus ésteres metílicos o también ácido glicerol-monoacético, mono-, di- y tri-glicéridos, que eventualmente pueden utilizarse como fuente de carbono. El contenido de este tipo de compuestos que sirven como fuente de carbono es generalmente  $\leq$  (a lo sumo) 7,5% en peso, preferiblemente  $\leq$  5% en peso, de manera particularmente preferida  $\leq$  2,5% en peso (referido al glicerol bruto anhidro). El glicerol empleado para las medidas de la invención tiene un contenido de  $\geq$  (al menos) 90% en peso, preferiblemente  $\geq$  92,5% en peso, y de manera particularmente preferida de  $\geq$  95% en peso (basado en la sustancia de partida anhidra).
- 35 Una fuente importante de glucosa es hidrolizados de almidón. Típicamente, sustancias acompañantes son, de manera correspondiente, por ejemplo, maltosa y/o isomaltosa en concentraciones de aproximadamente 0,1 a 2% en peso. La glucosa utilizada para las medidas de la invención tiene un contenido de  $\geq$  (al menos) 90% en peso, preferiblemente  $\geq$  95% en peso (referido a la sustancia seca).
- 40 Es conocido que, en disoluciones de sacarosa, la sacarosa a temperatura elevada, como ocurre, por ejemplo, durante la esterilización por calor, se invierte en una pequeña proporción en glucosa y fructosa. En la sacarosa o disolución de sacarosa utilizada para las medidas de la invención, la proporción de glucosa y fructosa asciende a  $\leq$  (máximo) 10% en peso, preferiblemente  $\leq$  5% en peso (referido a la sustancia seca).
- 45 La melaza (melaza de remolacha) en la producción de sacarosa a partir de remolacha azucarera contiene una mezcla de azúcares que consiste sustancialmente en sacarosa.
- 50 En el mundo científico son conocidas disoluciones concentradas que contienen glucosa y fructosa, por ejemplo, bajo la denominación "isojarabe", "jarabe de maíz de alto contenido en fructosa" o "jarabe de glucosa con contenido en fructosa". Éstas se preparan mediante hidrólisis de almidón con subsiguiente tratamiento de la glucosa con isomerasa. Contienen una mezcla de azúcares, que es generalmente de aproximadamente 50 - 55% en peso de glucosa y 40 - 45% en peso de fructosa (referido a la materia seca). En virtud del proceso de preparación, estos jarabes de maltosa contienen, entre otros, generalmente maltosa en una concentración de como máximo aproximadamente 6% en peso (referido a la sustancia seca).
- 55
- 60



Disoluciones concentradas, que esencialmente contienen una mezcla de azúcares que se compone en partes equimolares de glucosa y fructosa, son asimismo conocidas en el mundo científico. Éstas se preparan, por ejemplo, mediante tratamiento de sacarosa con invertasa y, en consecuencia, contienen pequeñas proporciones de sacarosa ( $\leq$  5% en peso referido a la sustancia seca).

5 En el mundo científico se conocen, además, disoluciones concentradas que contienen una mezcla de azúcares que consiste en sacarosa, glucosa y fructosa. Éstas se preparan por inversión parcial de sacarosa. Un concentrado conocido se compone de 38,5% en peso de sacarosa, 38,5% en peso de azúcar invertido (es decir, glucosa y fructosa en la relación 1: 1) y 23% en peso de agua.

10 La melaza (melaza de caña de azúcar) que resulta en la producción de sacarosa a partir de la caña de azúcar contiene una mezcla de azúcares que consiste esencialmente en sacarosa, glucosa y fructosa.

15 La expresión "en esencia" tiene en cuenta, además, el hecho de que en componentes de medios complejos empleados en medios de fermentación tales como, por ejemplo, extracto de levadura o líquido de maceración de maíz contienen, en proporciones variables, compuestos que pueden servir como fuente de carbono. Así, el extracto de levadura contiene, entre otros, trehalosa y/o glucosa. El líquido de maceración de maíz contiene alrededor de 10 a 20% en peso (referido a la sustancia seca) de ácido láctico. Componentes de medios complejos de este tipo se emplean, por lo general, en una concentración de 0,5 a 20 g/l y también en concentraciones mayores en el medio de fermentación.

20 Informaciones para la preparación de glucosa, sacarosa y fructosa y para la composición de componentes de medios complejos se encuentran, entre otros, en los libros de texto de Bartens (Zuckertechnologie, Rüben und Rohrzuckerherstellung, Verlag Dr. Albert Bartens KG, Berlín (Alemania)), McGinnis (Beet-Sugar Technology, tercera edición, Studio of Printcraft, Fort Collins, Colorado, EE.UU. (1982)), Drews (Mikrobiologisches Praktikum, 3ª Edición, Springer Verlag, Berlín (Alemania), 1976), Rehm (Industrielle Mikrobiologie, 2ª Edición, Springer Verlag, Berlin (Alemania), 1980) y Crueger y Crueger (Lehrbuch der Angewandten Mikrobiologie, Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden (Alemania), 1982).

30 Finalmente, la expresión "en esencia" tiene en cuenta el hecho de que mediante la inoculación de un medio nutricio utilizando un denominado precultivo (inóculo), las fuentes de carbono no consumidas o formadas durante el precultivo se transfieren al cultivo utilizado para la preparación del L-aminoácido correspondiente. La proporción del precultivo en el cultivo resultante de la inoculación asciende, por lo general, a 2 hasta 20%, eventualmente también como máximo a 50%.

35 En un procedimiento de acuerdo con la invención, el glicerol o glicerol bruto empleado se compone, por lo general, de hasta  $\geq$  (al menos) 90% en peso, preferiblemente de al menos 92,5% en peso y de manera particularmente preferida de  $\geq$  95% en peso de glicerol (referido al material de partida anhidro). Asimismo se puede emplear glicerol con una pureza de  $\geq$  97% en peso,  $\geq$  98% en peso o  $\geq$  99% en peso.

40 En un procedimiento de acuerdo con la invención, el azúcar empleado preferiblemente o bien las mezclas de azúcares empleadas preferiblemente se compone o bien componen, en general de  $\geq$  (al menos) 90% en peso, eventualmente de manera preferida de  $\geq$  95% en peso de uno o varios de los azúcares indicados, seleccionados del grupo de glucosa, sacarosa y fructosa (referido a la sustancia seca).

45 Si en un procedimiento de acuerdo con la invención se emplean mezclas a base de glicerol y glucosa o mezclas a base de glicerol y sacarosa, la proporción de glicerol en la mezcla asciende a  $\geq$  (al menos) 10% en peso,  $\geq$  20% en peso,  $\geq$  40% en peso,  $\geq$  50% en peso,  $\geq$  60% en peso o  $\geq$  80% en peso y  $\leq$  (a lo sumo) 90% en peso.

50 Si en un procedimiento de acuerdo con la invención se emplean mezclas a base de glicerol y una mezcla de azúcares a base de glucosa y fructosa, entonces la proporción de glicerol en la mezcla asciende a  $\geq$  (al menos) 10% en peso,  $\geq$  20% en peso,  $\geq$  40% en peso,  $\geq$  50% en peso,  $\geq$  60% en peso o  $\geq$  80% en peso y  $\leq$  (a lo sumo) 90% por ciento en peso. La proporción de glucosa en la mezcla de azúcares consistente en glucosa y fructosa asciende a  $\geq$  (al menos) 10% en peso,  $\geq$  20% en peso,  $\geq$  40% en peso,  $\geq$  50% en peso,  $\geq$  60% en peso o  $\geq$  80% en peso y  $\leq$  (a lo sumo) 90% en peso, preferiblemente 45 a 65% en peso, 50 a 65% en peso, 50 a 60% en peso, 55 a 65% en peso o 55 a 60% en peso.

55 Si en un procedimiento de acuerdo con la invención se emplean mezclas a base de glicerol y una mezcla de azúcares a base de sacarosa, glucosa y fructosa, la proporción de glicerol en la mezcla asciende a  $\geq$  (al menos) 10% en peso,  $\geq$  20% en peso,  $\geq$  40% en peso,  $\geq$  50% en peso,  $\geq$  60% en peso o  $\geq$  80% en peso y  $\leq$  (a lo sumo) 90% en peso. La proporción de sacarosa, glucosa y fructosa en la mezcla de azúcares asciende en cada caso a  $>$  (mayor que) 10% en peso y menos de 80% en peso.

60 Si en un procedimiento de acuerdo con la invención se emplea glicerol o bien glicerol bruto y uno o varios de los

## ES 2 519 016 T3

azúcares seleccionados del grupo de glucosa, sacarosa y fructosa como fuente de carbono, entonces el medio contiene, en el caso del procedimiento por lotes, de manera correspondiente, glicerol o glicerol y el o los azúcares indicados.

5 En el caso de un procedimiento por lotes alimentados, la fuente de carbono se puede introducir de distintas formas en el procedimiento.

En un primer aspecto, para la fase por lotes se dispone uno o varios de los azúcares indicados. En la fase de alimentación subsiguiente se emplea

10

a) glicerol o glicerol bruto, o

b) una mezcla a base de glicerol y uno o más de los azúcares indicados.

15 En un segundo aspecto, para la fase por lotes se dispone glicerol. En la fase de alimentación subsiguiente se emplea

a) glicerol o glicerol bruto, o

b) una mezcla a base de glicerol y uno o más de los azúcares indicados.

20

En un tercer aspecto, para la fase por lotes se dispone una mezcla a base de glicerol y uno o varios de los azúcares indicados. En la fase de alimentación subsiguiente se emplea

a) glicerol o glicerol bruto, o

25

b) una mezcla a base de glicerol y uno o más de los azúcares indicados.

En un cuarto aspecto, para la fase por lotes se dispone una fuente de carbono seleccionada del grupo

30

a) glicerol o glicerol bruto,

b) uno o varios de los azúcares indicados, y

35

c) una mezcla a base de glicerol y uno o varios de los azúcares, seleccionados preferiblemente del grupo de sacarosa, glucosa y fructosa.

En la fase de alimentación subsiguiente,

40

d) en al menos un período continuo de al menos una (1) hora y como máximo 100, preferiblemente como máximo 50, de manera particularmente preferida como máximo 30 horas se emplea glicerol y, a continuación, en al menos un período continuo de al menos una (1) hora y como máximo 100, preferiblemente como máximo 50, de manera particularmente preferida como máximo 30 horas se emplea uno o varios de los azúcares indicados, o

45

e) en al menos un período continuo de al menos una (1) hora y como máximo 100, preferiblemente como máximo 50, de manera particularmente preferida como máximo 30 horas se emplea uno o varios de los azúcares indicados y, a continuación, en al menos un período continuo de al menos una (1) hora y como máximo 100, preferiblemente como máximo 50, de manera particularmente preferida como máximo 30 horas se emplea glicerol,

50

en donde la proporción de glicerol en la fuente de carbono empleada asciende a  $\geq$  (al menos) 10% en peso,  $\geq$  20% en peso,  $\geq$  40% en peso,  $\geq$  50% en peso,  $\geq$  60% en peso o  $\geq$  80% en peso y  $\leq$  (a lo sumo) 90% en peso.

En el caso de un procedimiento por lotes alimentados repetidos, para las fases por lotes repetidos y las fases de alimentación se emplean las mismas fuentes de carbono a las descritas para el procedimiento por lotes y por lotes alimentados (véase más arriba).

55

En el caso de un cultivo continuo, se añaden continuamente glicerol o glicerol y uno o varios de los azúcares seleccionados del grupo de sacarosa, glucosa y fructosa.

60

Como fuente de nitrógeno pueden utilizarse mezclas de sustancias nitrogenadas orgánicas tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, líquido de maceración de maíz o harina de soja, compuestos orgánicos tales como urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno pueden utilizarse individualmente o en forma de una mezcla.

Como fuente de fósforo pueden utilizarse ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio, hidrógeno-fosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio, individualmente o en forma de mezcla.

5 La fermentación se lleva a cabo, por lo general, a un valor del pH de 5,5 a 9,0, en particular de 6,0 a 8,0. Para controlar el pH del cultivo, se emplean de manera adecuada compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o bien agua amoniacal, o compuestos de carácter ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para controlar la formación de espuma pueden emplearse agentes antiespumantes tales como, por ejemplo, ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para mantener la estabilidad de los plásmidos pueden añadirse al medio sustancias adecuadas, que actúan selectivamente, por ejemplo antibióticos. Para mantener las condiciones aerobias, se incorporan en el cultivo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno tales como, por ejemplo, aire. 10 La temperatura del cultivo se encuentra normalmente en 25°C a 45°C y preferiblemente a 30°C a 40°C. A través de la actividad de los microorganismos, se produce un enriquecimiento o bien una acumulación del L-aminoácido en la fermentación o bien caldo de cultivo. El cultivo se prolonga hasta que se forme un máximo en el L-aminoácido deseado. Este objetivo se alcanza normalmente en el espacio de 10 horas a 160 horas. En el caso de los procesos continuos, 15 son posibles tiempos de cultivo más largos.

Por un caldo de fermentación o bien caldo de cultivo se entiende un medio de fermentación en el que un microorganismo ha sido cultivado durante un tiempo determinado y a una determinada temperatura.

20 Al término de la fermentación, el caldo de fermentación resultante contiene de manera correspondiente a) la biomasa (masa celular) del microorganismo que resulta como consecuencia de la multiplicación de las células del microorganismo, b) el L-aminoácido formado en el transcurso de la fermentación, c) los productos secundarios orgánicos formados en el transcurso de la fermentación y d) los componentes del medio de fermentación / de los medios de fermentación no consumidos o bien de las sustancias de partida tales como, por ejemplo, vitaminas tales como tiamina o sales tales como sulfato de magnesio. 25

El caldo de cultivo o bien caldo de fermentación preparado se puede recoger a continuación y se puede obtener o aislar el L-aminoácido o bien el producto con contenido en L-aminoácido.

30 En una variante del procedimiento, el caldo de fermentación se concentra eventualmente y, a continuación, se purifica el L-aminoácido o bien se aísla en una forma pura o casi pura. Métodos típicos para la purificación de L-aminoácidos son la cromatografía de intercambio de iones, la cristalización, procedimientos de extracción y el tratamiento con carbón activado. Con ello se obtienen L-aminoácidos ampliamente puros con un contenido de  $\geq 90\%$  en peso,  $\geq 95\%$  en peso,  $\geq 96\%$  en peso,  $\geq 97\%$  en peso,  $\geq 98\%$  en peso o  $\geq 99\%$  en peso. 35

También es posible, en otra variante del procedimiento, preparar un producto a partir del caldo de fermentación producido, separando la biomasa de la bacteria contenida en el caldo de fermentación por completo (100%) o casi por completo, es decir, más de o mayor que ( $>$ ) 90%,  $> 95\%$ ,  $> 97\%$ ,  $> 99\%$  y dejando en el producto los componentes restantes del caldo de fermentación en gran parte, es decir en 30% - 100%, 40% - 100%, 50% - 100%, 60% - 100%, 70% - 100%, 80% - 100% o 90% - 100%, preferiblemente mayor que igual a ( $\geq$ ) 50%,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$ ,  $\geq 90\%$  o  $\geq 95\%$ , o también por completo (100%). 40

Para la eliminación o separación de la biomasa se emplean métodos de separación tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación, floculación o una combinación de éstos. 45

El caldo obtenido se espesa o bien se concentra a continuación por métodos conocidos tales como con ayuda de un evaporador rotatorio, evaporador de capa delgada, evaporador de película descendente, por ósmosis inversa, a través de nanofiltración o una combinación de los mismos.

50 Este caldo concentrado se elabora a continuación por métodos de liofilización, secado por pulverización, granulación por pulverización o por otros procedimientos para dar un polvo finamente dividido, capaz de fluir. Este polvo finamente dividido, capaz de fluir puede entonces transformarse de nuevo, por procedimientos de compactación o granulación adecuados, en un producto de grano grueso, que fluye bien, almacenable y ampliamente libre de polvo fino. El agua es separada con ello en total en más de 90%, de modo que el contenido de agua en el producto es menor que 10% en peso, menor que 5% en peso, menor que 4% en peso o menor que 3% en peso. 55

El análisis de los L-aminoácidos para la determinación de la concentración en uno o varios instantes puede tener lugar en el transcurso de la fermentación o en los diferentes productos mediante separación de los L-aminoácidos por medio de cromatografía de intercambio de aniones, preferiblemente cromatografía de intercambio de cationes, con subsiguiente derivatización en columna posterior utilizando ninhidrina tal como se describe por Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)). En lugar de ninhidrina puede utilizarse también orto-ftaldialdehído para la derivatización en columna posterior. Un artículo resumido para la cromatografía de intercambio de iones se encuentra en Fickering (LC+GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)). 60

Asimismo, es posible realizar una derivatización en antecolumna, por ejemplo utilizando orto-ftaldialdehído o fenilisotiocianato y separar los derivados de aminoácidos resultantes mediante cromatografía de fase inversa (RP), preferiblemente en forma de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Un método de este tipo se describe, por ejemplo, por Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

La detección tiene lugar fotométricamente (absorción, fluorescencia).

Una exposición recopilatoria respecto al análisis de aminoácidos se encuentra, entre otros, en el libro de texto "Bioanalytik" de Lottspeich y Zorbas (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1998).

La presente invención se explica con mayor detalle en lo que sigue con ayuda de ejemplos de realización.

Los medios mínimos (M9) y completos (LB) utilizados para *Escherichia coli* se describen por J. H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento del ADN del plásmido a partir de *Escherichia coli*, así como todas las técnicas para la restricción, ligamiento, tratamiento con Klenov y fosfatasa alcalina se llevan a cabo según Sambrook et al. (Molecular Cloning – A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). La transformación de *Escherichia coli* se lleva a cabo, si no se describe de otro modo, según Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA (1989) 86: 2172-2175).

La temperatura de incubación en la producción de cepas y transformantes es, si no se describe de otro modo, 37°C.

#### Ejemplo 1

Construcción del intercambio de aminoácido (G428D) en el gen *glpK*

Partes de las regiones de genes situadas aguas arriba y aguas abajo de las posiciones 1282-1284 de la secuencia codificadora del gen *glpK*, correspondientes a la posición de aminoácido 428, y una parte de la región 3' del gen *glpK* se amplificaron a partir de *Escherichia coli* K12 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de "gene SOEing" (Gene Splicing by Overlap Extension (corte y empalme del gen por extensión y solapamiento), Horton, Molecular Biotechnology 3: 93-98 (1995)), así como oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia de nucleótidos del gen *glpK* y de las secuencias situadas aguas abajo en *E. coli* K12 MG1655 (SEQ ID No. 7, Número de Acceso U00096 (región: 3557870-3558628)), se sintetizaron cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Los cebadores posibilitan la amplificación de un segmento de ADN de aprox. 1,5 kb de longitud que porta la mutación *glpK*(G427D). Las secuencias de los cebadores *glpK\_4\_SOEing* y *glpK\_5\_SOEing* se modificaron de manera que se suprime un lugar de reconocimiento para *Hae*II y, en su lugar, se forma un lugar de reconocimiento para la enzima de restricción *Bsp*E1, sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína en esta zona de la secuencia (en la secuencia de nucleótidos representada a continuación marcada mediante subrayado):

*glpK\_3*: 5' - CGATTACACCAACGCCTCTC - 3' (SEQ ID No. 9)

*glpK\_4\_SOEing*: 5' - TCCGGACGCTCAACGCGGGT **AT** CGAGA ATATCGGACTGGA  
- 3'

(SEQ ID No. 10)

*glpK\_5\_SOEing*: 5' - TCTCG **AT** ACCCGCGTTGAGCGTCCGGA AGTGCGCGAAGTC  
- 3'

(SEQ ID No. 11)

*glpK\_6*: 5' - GCCCGACAATCAGCTTCTCC - 3' (SEQ ID No. 12)

Los cebadores *glpK\_4\_SOEing* y *glpK\_5\_SOEing* son inversamente complementarios entre sí a lo largo de 27 nucleótidos, y en esta zona portan la mutación GC → AT, que determina el intercambio de aminoácido G428D.

El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655, empleado para la PCR, se aisló según los datos del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN 759 pb de tamaño procedente de la zona 5' de la mutación *glpK* (designado *glpK1*, producto de la PCR de los cebadores *glpK\_3* y *glpK\_4\_SOEing*) y un fragmento de ADN de 745 pb de tamaño procedente de la zona 3' de la mutación *glpK* (incluidas las secuencias situadas aguas abajo, designado *glpK2*, producto de la PCR de los cebadores *glpK\_6* y *glpK\_5\_SOEing*) puede ser amplificado con los cebadores específicos bajo condiciones de PCR estándares (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con la ADN polimerasa de fusión de alta fidelidad (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania). Los dos productos de la PCR, *glpK1* y *glpK2*, se purificaron según métodos habituales

después de un control en gel de agarosa al 0,8% (kit High Pure PCR Product Purification, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y luego se emplearon juntos como moldes en otra PCR utilizando los cebadores glpK\_3 y glpK\_6. De este modo se obtiene una casete de mutación de glpK de 1477 pares de bases que comprende el extremo 3' del gen glpK con la mutación, así como la zona limítrofe procedente de la región situada aguas abajo del gen glpK y presenta la secuencia representada en SEQ ID No. 13.

El alelo glpK descrito se aisló después de la separación en gel de agarosa al 0,8% (kit QIAGEN QIAquick Gel Extraction, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y se ligó con el vector pCR-BluntII-TOPO según los datos del fabricante (TOPO Cloning Kit Manual, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania).

La tanda de ligamiento se transformó en células TOP10 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania), y células portadoras de plásmidos se seleccionaron en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), que está mezclado con 25 µg/ml de canamicina, a 37°C.

La clonación eficaz se detectó después del aislamiento del ADN del plásmido (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) mediante disociación con la enzima HaeII. El vector resultante se denominó pCRBluntII-glpK(G428D) y se examinó mediante secuenciación (AGOWA GmbH, Berlín, Alemania).

Después, el vector pCRBluntII-glpK(G428D) se disoció con las endonucleasas de restricción XbaI y SpeI, se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, y el fragmento glpK(G428D) de aprox. 1,57 kb de tamaño se aisló del gel, se purificó con los métodos habituales (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden) y se ligó con el plásmido pKO3 (Link et al., Journal of Bacteriology 179: 6228-6237 (1997)), que ha sido digerido asimismo con la enzima XbaI y ha sido tratado con fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase, Boehringer, Mannheim, Alemania), mediante T4 ADN ligasa Ready To-Go (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania).

La tanda de ligamiento se transformó en DH5α (Grant et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) (Hanahan, En. DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. 1, IRL-Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y se seleccionaron a 30°C células portadoras de plásmido en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) que está mezclada con 20 µg/ml de cloranfenicol.

La clonación eficaz se detectó después del aislamiento del ADN del plásmido (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y disociación con la enzima Avall y AlwNI. El vector de intercambio pKO3-glpK(G428D) resultante está representado en la Figura 1.

## Ejemplo 2

Construcción del intercambio de aminoácido (G231D) en el gen glpK

Regiones de genes situadas aguas arriba y aguas abajo de las posiciones 691-693 de la secuencia codificadora del gen glpK, correspondientes a la posición de aminoácido 231 se amplificaron a partir de Escherichia coli K12 utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de "gene SOEing" (Gene Splicing by Overlap Extension (corte y empalme del gen por extensión y solapamiento), Horton, Molecular Biotechnology 3: 93-98 (1995)), así como oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia de nucleótidos del gen glpK en E. coli K12 MG1655 (SEQ ID No. 7, Número de Acceso U00096 (región: 3557870-3558628)), se sintetizaron cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Los cebadores posibilitan la amplificación de un segmento de ADN de aprox. 1,55 kb de longitud que porta el gen o bien alelo glpK(G231D). Las secuencias de los cebadores glpK\_7\_SOEing y glpK\_8\_SOEing se modificaron de manera que se suprime un lugar de reconocimiento para MluI y, en su lugar, se forma un lugar de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI, sin modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína en esta zona de la secuencia (en la secuencia de nucleótidos representada a continuación marcada mediante subrayado):

glpK\_1 5' - CGGTCGAC ATGACTACGG GACAATTAAC - 3' (SEQ ID No. 14)

glpK\_7\_SOEing: 5' - GAATTCGCCTGCCGCTTTGCC **AT** CAATG TTAGTCTGACC  
- 3'

(SEQ ID No. 15)

glpK\_8\_SOEing: 5' - CATTG **AT** GGCAAAGGCGGCACGC GAATTCCAATCTCCGGG  
- 3'

(SEQ ID No. 16)

glpFK\_2 5' - CGGTCGAC TTATTCGTCG TGTTCTTCCC - 3' (SEQ ID No. 17)

Los cebadores glpK\_7\_SOEing y glpk\_8\_SOEing son inversamente complementarios entre sí a lo largo de 29 nucleótidos, y en esta zona portan la mutación GC → AT, que determina el intercambio de aminoácido G231D.

5 El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655, empleado para la PCR, se aisló según los datos del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN 744 pb de tamaño procedente de la zona 5' de la mutación glpK (designado glpK5, producto de la PCR de los cebadores glpK\_1 y glpK\_7\_SOEing) y un fragmento de ADN de 827 pb de tamaño procedente de la zona 3' de la mutación glpK (designado glpK6, producto de la PCR de los cebadores glpFK\_2 y glpK\_8\_SOEing) puede ser amplificado con los cebadores específicos bajo condiciones de PCR estándares (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con la ADN polimerasa de fusión de alta fidelidad (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania). Los dos productos de la PCR, glpK5 y glpK6, se purificaron según métodos habituales después de un control en gel de agarosa al 0,8% (kit High Pure PCR Product Purification, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y luego se emplearon juntos como moldes en otra PCR utilizando los cebadores glpK\_1 y glpFK\_2. De este modo se obtiene una casete de mutación de glpK de 1546 pares de bases que comprende el gen glpK con la mutación G231D y presenta la secuencia representada en SEQ ID No. 18.

20 El alelo glpK descrito se aisló después de la separación en gel de agarosa al 0,8% (kit QIAGEN QIAquick Gel Extraction, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y se ligó con el vector pCR-BluntII-TOPO según los datos del fabricante (TOPO Cloning Kit Manual, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania).

La tanda de ligamiento se transformó en células TOP10 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania), y células portadoras de plásmidos se seleccionaron en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), que está mezclado con 25 µg/ml de canamicina, a 37°C.

25 La clonación eficaz se detectó después del aislamiento del ADN del plásmido (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) mediante disociación con la enzima MluI. El vector resultante se denominó pCRBluntII-glpK(G231D) y se examinó mediante secuenciación (AGOWA GmbH, Berlín, Alemania).

30 Después, el vector pCRBluntII- glpK(G231D) se disoció con la endonucleasa de restricción Sall, se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, y el fragmento glpK(G231D) de 1536 pb de tamaño se aisló del gel, se purificó con los métodos habituales (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden) y se ligó con el plásmido pKO3 (Link et al., Journal of Bacteriology 179: 6228-6237 (1997)), que ha sido digerido asimismo con la enzima Sall y ha sido tratado con fosfatasa alcalina (Alkaline Phosphatase, Boehringer, Mannheim, Alemania), mediante T4 ADN ligasa Ready To-Go (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania).

35 La tanda de ligamiento se transformó en DH5α (Grant et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) (Hanahan, En. DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. 1, IRL-Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) y se seleccionaron a 30°C células portadoras de plásmido en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) que está mezclada con 20 µg/ml de cloranfenicol.

40 La clonación eficaz se detectó después del aislamiento del ADN del plásmido (kit QIAprep Spin Miniprep, Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) y disociación con la enzima EcoRI y Avall. El vector de intercambio pKO3- glpK(G231D) resultante está representado en la Figura 2.

### 45 Ejemplo 3

Mutagénesis específica del lugar del gen glpK en la cepa MG442 de *E. coli*

50 La cepa MG442 de *E. coli* productora de L-treonina está descrita en el documento de patente US-A-4.278.765 y está depositada en la Asamblea Nacional Rusa para Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia) como CMIM B-1628 y en la Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) (DSMZ, Braunschweig, Alemania) de acuerdo con el Tratado de Budapest como DSM 16574.

55 Para el intercambio del gen glpK cromosómico por las construcciones de mutación codificadoras de plásmidos, se transformó MG442 con los plásmidos pKO3-glpK(G428D) y pKO3-glpK(G231D). El intercambio de genes tiene lugar con el procedimiento de selección descrito por Link et al. (Journal of Bacteriology 179: 6228-6237 (1997)) y se verificó mediante métodos de PCR estándares (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con los siguientes cebadores de oligonucleótidos y subsiguiente restricción con BspE1 o bien SpeI:

60 Para glpK(G428D):

glpK\_3: 5' - CGATTACACCAACGCCTCTC - 3' (SEQ ID No. 9)

glpK\_6: 5' - GCCCGACAATCAGCTTCTCC - 3' (SEQ ID No. 12)

Para glpK(G231D):

glpK\_1: 5' - CGGTCGAC ATGACTACGG GACAATTAAAC - 3'  
(SEQ ID No. 14)

5

glpFK\_2: 5' - CGGTCGAC TTATTCGTCG TGTTCTTCCC - 3'  
(SEQ ID No. 17)

Después de realizado el intercambio, en MG442 se presenta la forma representada en la SEQ ID No. 20 del alelo glpK(G428D) o bien la forma representada en la SEQ ID No. 19 del alelo glpK(G231D) (secuenciación por parte de AGOWA GmbH, Berlín, Alemania). Las cepas obtenidas se designan MG442glpK(G428D) o bien MG442glpK(G231D).

10

#### Ejemplo 4

Preparación de L-treonina con las cepas MG442glpK(G428D) y MG442glpK(G231D)

15

Las cepas MG442glpK(G428D) y MG442glpK(G231D) y MG442 se multiplicaron en medio mínimo con la siguiente composición: 3,5 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\* 2H<sub>2</sub>O, 1,5 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g/l de MgSO<sub>4</sub>\* 7H<sub>2</sub>O, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar. La formación de L-treonina se examinó en cultivos por lotes de 10 ml que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para ello, se inoculan 10 ml de medio de precultivo de la siguiente composición: 2 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>\* 7H<sub>2</sub>O, 15 g/l de CaCO<sub>3</sub>, 20 g/l de glicerol y se incuban durante 16 horas a 37°C y 180 rpm en una incubadora ESR de la razón social Kühner AG (Birsfelden, Suiza). 250 µl de este precultivo se sobreinoculan en 10 ml de medio de producción (25 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l de MgSO<sub>4</sub>\* 7H<sub>2</sub>O, 0,03 g/l FeSO<sub>4</sub>\* 7H<sub>2</sub>O, 0,018 g/l de MnSO<sub>4</sub>\* 1H<sub>2</sub>O, 30 g/l de CaCO<sub>3</sub>, 20 g/l de glicerol) y se incuban durante 48 horas a 37°C. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo con un fotómetro LP2W de la razón social Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una longitud de onda de medición de 660 nm.

20

25

A continuación, se determinó la concentración de L-treonina formada en el sobrenadante del cultivo filtrado en condiciones estériles con un analizador de aminoácidos de la razón social Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Alemania) mediante cromatografía de intercambio de iones y reacción en columna posterior con detección de ninhidrina.

30

En la Tabla 1 se representa el resultado del ensayo.

Tabla 1

35

Cepa	DO (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	6,0	1,8
MG442glpK(G428D)	5,9	2,8
MG442glpK(G231D)	6,3	2,7

#### Ejemplo 5

Mutagénesis específica del lugar del gen glpK en la cepa DM1831/pMU91 de E. coli

40

La cepa DM1831/pMU91 de E. coli productora de L-triptófano es un derivado trpS\* obtenible mediante transducción P1 de la cepa JP6015/pMU91 de Escherichia coli K-12 descrita en el documento de patente US-A-5.756.345. pMU91 es un plásmido derivado de pSC101 (Cohen et al., Journal of Bacteriology 132: 734-737 (1977)) que porta Tet<sup>R</sup>, trpE476DCBA y serA<sup>+</sup>. JP6015/pMU91 está depositada como DSM 10123 en la Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares) (DSMZ, Braunschweig, Alemania) de acuerdo con el Tratado de Budapest.

45

Después de la multiplicación en medio LB exento de antibióticos durante aproximadamente seis generaciones se aisló un derivado de la cepa DM1831/pMU91 que ya no porta el plásmido pMU91. La cepa obtenida es sensible a tetraciclina y se designa DM1831.

50

Para el intercambio del gen glpK cromosómico por las construcciones de mutación codificadoras de plásmidos, se transformó DM1831 con los plásmidos pKO3-glpK(G428D) y pKO3-glpK(G231D). El intercambio de genes tiene lugar con el procedimiento de selección descrito por Link et al. (Journal of Bacteriology 179: 6228-6237 (1997)) y se verificó mediante métodos de PCR estándares (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications,

55

Academic Press) con los siguientes cebadores de oligonucleótidos y subsiguiente restricción con BspE1 o bien SpeI:

Para glpK(G428D):

5 glpK\_3: 5' - CGATTACACCAACGCCTCTC - 3' (SEQ ID No. 9)

glpK\_6: 5' - GCCCGACAATCAGCTTCTCC - 3' (SEQ ID No. 12)

Para glpK(G231D):

10

glpK\_1: 5' - CGGTCGAC ATGACTACGG GACAATTAAAC - 3'  
(SEQ ID No. 14)

glpFK\_2: 5' - CGGTCGAC TTATTTCGTCG TGTTCTTCCC - 3'  
(SEQ ID No. 17)

15 Después de realizado el intercambio, en DM1831 se presenta la forma representada en la SEQ ID No. 20 del alelo glpK(G428D) o bien la forma representada en la SEQ ID No. 19 del alelo glpK(G231D) (secuenciación por parte de AGOWA GmbH, Berlín, Alemania). Las cepas obtenidas se designan DM1831glpK(G428D) o bien DM1831glpK(G231D).

20 El plásmido pMU91 descrito en el documento de patente US-A-5.756.345, que porta las informaciones genéticas para la producción de triptófano, se aisló de la cepa JP6015/pMU91. El plásmido está representado en la Figura 3. Las cepas DM1831glpK(G428D) y DM1831glpK(G231D) se transformaron con este plásmido. En cada caso uno de los transformantes obtenidos se designa DM1831glpK(G428D) / pMU91 o bien DM1831glpK(G231D) / pMU91.

#### 25 Ejemplo 6

Preparación de L-triptófano con las cepas DM1831glpK(G428D) / pMU91 y DM1831glpK(G231D) / pMU91

30 Las cepas DM1831glpK(G428D) / pMU91, DM1831glpK(G231D) / pMU91 y DM1831 / pMU91 se continuaron multiplicando en medio LB con la siguiente composición: 10 g/l de Bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl (ajuste del pH a 7,5 con NaOH), 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar y 5 mg/l de tetraciclina a 30°C. La formación de L-triptófano se examinó en cultivos por lotes de 10 ml que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para ello, se inoculan 10 ml de medio de cultivo previo de la siguiente composición: 1 g/l de extracto de levadura, 100 ml/l de tampón MOPS (10x), 10 g/l de glicerol y 5 mg/l de tetraciclina y se incuban durante 16 horas a 30°C y 150 rpm en un incubadora ESR de la razón social Kühner AG (Birsfelden, Suiza).

35

Tampón 10x MOPS se prepara a partir de las disoluciones A y B de manera correspondiente a las Tablas 2 a 4, dos volúmenes de disolución A se añaden en condiciones estériles a tres volúmenes de la disolución B.



Tabla 2: Disolución A para tampón 10xMOPS (filtrada en condiciones estériles)

Componente	Concentración
MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico)	419 g/L
KOH (sólido)	Para el ajuste del valor del pH a 7,4

5 Tabla 3: Disolución B para tampón 10xMOPS. Esterilizada mediante autoclave (30 minutos, 121°C)

Componente	Concentración
Citrato de Na <sub>3</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,35 g/l
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,22 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	32,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	6,7 g/l
KCl	4,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25 mg/l
Oligoelementos de la solución madre (Tabla 4)	3,33 ml/l

Tabla 4: Solución madre de los oligoelementos (en agua desmineralizada) para tampón 10xMOPS.

Componente	Concentración
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O	3,7 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	24,0 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	7,1 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	28,7 mg/l
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	15,8 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2,5 mg/l

10 En cada caso 250 µl de este precultivo se sobreinoculan en 10 ml de medio de producción PM1 de manera correspondiente a la Tabla 5 y se incuban durante 72 horas a 30°C y 150 rpm. Después de la incubación se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión del cultivo con un fotómetro LP2W de la razón social Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una longitud de onda de medición de 660 nm.

15 Tabla 5: Medio PM1: para ensayos de producción en matraces Erlenmeyer de 100 ml

Componente	Concentración
Tampón 10xMOPS	100 ml/l
Tiamina HCl (0,01%)	1,0 ml/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (15 mM)	10 ml/l
Glicerol	10 g/l
Tetraciclina	5 mg/l

20 A continuación se determinó la concentración de L-triptófano formado en el material sobrenadante del cultivo, filtrado en condiciones estériles mediante HPLC de fase inversa, tal como se describe por Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

En la Tabla 6 está representado el resultado del ensayo.

25 Tabla 6

Cepa	DO (660 nm)	L-triptófano g/l
DMpMU91	1,5	0,85
DM1831glpK(G428D) / pMU91	1,6	1,2
DM1831glpK(G231D) / pMU91	1,7	1,0

### Ejemplo 7

30 Construcción del plásmido de expresión pMW218glpK

El gen glpK de E. coli K12 se amplificó empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia de nucleótidos del gen glpK en E. coli K12 MG1655 (Número de Acceso U00096 (región: 4113737-4115245)) se sintetizaron cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania).

## ES 2 519 016 T3

Las secuencias de los cebadores se modificaron de manera que resultaban lugares de reconocimiento para enzimas de restricción. Para los dos cebadores se eligió la secuencia de reconocimiento para Sall que está marcada mediante subrayado en la secuencia de nucleótidos representada a continuación:

5 glpK\_1 5' - CGGTCGAC ATGACTACGG GACAATTAAC - 3' (SEQ ID No. 14)

glpFK 2 5' - CGGTCGAC TTATTCGTCG TGTTCTTCCC - 3' (SEQ ID No. 17)

10 El ADN cromosómico de E. coli K12 MG1655, empleado para la PCR, se aisló según los datos del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN 1546 pb de tamaño pudo ser amplificado con los cebadores específicos bajo condiciones de PCR estándares (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con la polimerasa de fusión de alta fidelidad (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania).

15 El producto de la PCR (la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente corresponde a la SEQ ID No. 2) se disoció con la enzima de restricción Sall y se ligó con el vector pMW218 (Nippon Gene, Toyama, Japón), que asimismo había sido digerido con la enzima Sall. La cepa TOP10 de E. coli (Invitrogen, Groningen, Holanda) se transformó con la tanda de ligamiento, y se seleccionaron células portadoras de plásmido en agar LB que estaba mezclado con 50 µg/ml de canamicina. La clonación eficaz pudo detectarse después del aislamiento del ADN del plásmido mediante la disociación control con las enzimas BamHI y Sall. El plásmido se designa pMW218glpK (Figura 4).

### Ejemplo 8

25 Construcción del plásmido de expresión pMW219glpK(G428D)

El gen glpK de E. coli K12 se amplificó empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como oligonucleótidos sintéticos, de manera que porta la mutación glpK(G427D). Partiendo de la secuencia de nucleótidos del gen glpK en E. coli K12 MG1655 (Número de Acceso U00096 (región: 4113737-4115245)) se sintetizaron cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania).

30 Las secuencias de los cebadores glpK\_1 y glpFK\_2 se modificaron de manera que resultaban lugares de reconocimiento para enzimas de restricción. Las secuencias de los cebadores glpK\_4\_SOEing y glpK\_5\_SOEing se modificaron de manera que se suprime un lugar de reconocimiento para HaeII y, en su lugar, se forma un lugar de reconocimiento para la enzima de restricción BspE1( marcada mediante subrayado en la secuencia de nucleótidos representada a continuación):

35 glpK\_1 5' - CGGTCGAC ATGACTACGG GACAATTAAC - 3' (SEQ ID No. 14)

glpK\_4\_SOEing: 5' - TCCGGACGCTCAACGCGGGT **AT** CGAGA ATATCGGACTGGA  
- 3'

(SEQ ID No. 10)

40 glpK\_5\_SOEing: 5' - TCTCG **AT** ACCCGCGTTGAGCGTTCCGGA AGTGCGCGAAGTC  
- 3'

(SEQ ID No. 11)

glpFK\_2 5' - CGGTCGAC TTATTCGTCG TGTTCTTCCC - 3' (SEQ ID No. 17)

45 Los cebadores glpK\_4\_SOEing y glpK\_5\_SOEing son inversamente complementarios entre sí a lo largo de 27 nucleótidos, y en esta zona portan la mutación GC → AT, que determina el intercambio de aminoácido G428D.

El ADN cromosómico de E. coli K12 MG1655, empleado para la PCR, se aisló según los datos del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN 1333 pb de tamaño procedente de la zona 5' de la mutación glpK (designado glpK3, producto de la PCR de los cebadores glpK\_1 y glpK\_4\_SOEing) y un fragmento de ADN de 240 pb de tamaño procedente de la zona 3' de la mutación glpK (designado glpK4, producto de la PCR de los cebadores glpFK\_2 y glpK\_5\_SOEing) puede ser amplificado con los cebadores específicos bajo condiciones de PCR estándares (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con la ADN polimerasa de fusión de alta fidelidad (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania). Los dos productos de la PCR, glpK3 y glpK4, se purificaron según métodos habituales después de un control en gel de agarosa al 0,8% (kit High Pure PCR Product Purification, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y luego se emplearon juntos como moldes en otra PCR utilizando los cebadores glpK\_1 y glpFK\_2. De este modo se obtiene un

alelo glpK de 1546 pares de bases.

El producto de la PCR (la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente corresponde a la SEQ ID No. 20) se disoció con la enzima de restricción Sall y se ligó con el vector pMW219 (Nippon Gene, Toyama, Japón), que asimismo había sido digerido con la enzima Sall. La cepa TOP10 de E. coli (Invitrogen, Groningen, Holanda) se transformó con la tanda de ligamiento, y se seleccionaron células portadoras de plásmido en agar LB que está mezclado con 50 µg/ml de canamicina. La clonación eficaz pudo detectarse después del aislamiento del ADN del plásmido mediante la disociación control con las enzimas BamHI y Sall. El plásmido se designa pMW219glpK(G428D) (Figura 5).

#### Ejemplo 9

Construcción del plásmido de expresión pMW219glpK(G231D)

El fragmento glpK(G231D) de aprox. 1,54 kb de tamaño, cortado con Sall (la secuencia se representa en la SEQ ID No. 18, la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente en la SEQ ID No. 19) del Ejemplo 2 se ligó con el vector pMW219 (Nippon Gene, Toyama, Japón) que asimismo ha sido digerida con la enzima Sall. La cepa TOP10 de E. coli (Invitrogen, Groningen, Holanda) se transformó con la tanda de ligamiento y se seleccionaron células portadoras de plásmidos en agar LB que está mezclado 50 µg/ml de canamicina. La clonación eficaz pudo detectarse después del aislamiento del ADN del plásmido mediante la disociación control con las enzimas BamHI y Sall. El plásmido se designa pMW219glpK(G231D) (Figura 6).

#### Ejemplo 10

Preparación de L-treonina con las cepas MG442/pMW218glpK, MG442/pMW219glpK(G428D) y MG442/pMW219glpK(G231D)

La cepa MG442 se transformó con los plásmidos de expresión pMW218glpK, pMW219glpK(G428D), pMW219glpK(G231D) descritos en los Ejemplos 7, 8 y 9, y con los vectores pMW218 y pMW219 (se diferencian únicamente en la orientación del sitio de clonación múltiple) y se seleccionaron en agar LB con 50 µg/ml de canamicina en células portadoras de plásmidos. La transformación eficaz pudo detectarse después del aislamiento del ADN del plásmido mediante la disociación control con las enzimas BamHI y Sall. De esta manera resultan las cepas MG442/pMW218glpK, MG442/pMW219glpK(G428D), MG442/pMW219glpK(G231D), MG442/pMW219 y MG442/pMW218. Colonias individuales elegidas se continuaron multiplicando a continuación en medio mínimo con la siguiente composición: 3,5 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\* 2H<sub>2</sub>O, 1,5 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g/l de MgSO<sub>4</sub>\* 7H<sub>2</sub>O, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar y 50 mg/l de canamicina. La formación de L-treonina se determinó tal como se describe en el Ejemplo 4.

En la Tabla 7 se representa el resultado del ensayo.

Tabla 7

Cepa	DO (660 nm)	L-treonina g/l
MG442 / pMW218	6,0	1,8
MG442 / pMW219	5,9	1,8
MG442 / pMW218glpK	4,6	2,0
MG442 / pMW219glpK(G428D)	5,8	3,1
MG442 / pMW219glpK(G231D)	6,1	2,8

#### Ejemplo 11

Preparación de L-triptófano con las cepas DM1831/pMU91/pMW218glpK, DM1831/pMU91/pMW219glpK(G428D) y DM1831/pMU91/pMW219glpK(G231D)

La cepa DM1831/pMU91 se transformó con los plásmidos de expresión pMW218glpK, pMW219glpK(G428D), pMW219glpK(G231D) descritos en los Ejemplos 7, 8 y 9, y con los vectores pMW218 y pMW219 (se diferencian únicamente en la orientación del sitio de clonación múltiple) y se seleccionaron en agar LB con 50 µg/ml de canamicina en células portadoras de plásmidos. La transformación eficaz pudo detectarse después del aislamiento del ADN del plásmido mediante la disociación control con la enzima HindIII. De esta manera resultan las cepas DM1831/pMU91/pMW218glpK, DM1831/pMU91/pMW219glpK(G428D), DM1831/pMU91/pMW219glpK(G231D), DM1831/pMU91/pMW218 y DM1831/pMU91/pMW219. Colonias individuales elegidas se continuaron multiplicando a continuación en medio LB con la siguiente composición: 10 g/l de Bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de NaCl (ajuste del pH a 7,5 con NaOH), 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar, 5 mg/l de tetraciclina y 50 mg/l de canamicina a 30°C. La formación de L-triptófano se determinó tal como se describe en el Ejemplo 6.

# ES 2 519 016 T3

En la Tabla 8 se representa el resultado del ensayo.

Tabla 8

Cepa	DO (660 nm)	L-treonina g/l
DM1831 / pMU91 / pMW218	1,2	0,7
DM1831 / pMU91 / pMW219	1,1	0,7
DM1831 / pMU91 / pMW218glpK	1,1	0,9
DM1831 / pMU91 / pMW219glpK (G428D)	1,0	1,1
DM1831 / pMU91 / pMW219glpK (G231D)	1,3	1,1

- 5 Breve descripción de las figuras:
- Figura 1: mapa del plásmido pKO3-glpK(G428D)
  - Figura 2: mapa del plásmido pKO3-glpK(G231D)
  - 10 • Figura 3: mapa del plásmido pMU91
  - Figura 4: mapa del plásmido pMW218glpK que contiene el gen glpK
  - Figura 5: mapa del plásmido pMW219glpK(G428D) que contiene el gen glpK
  - Figura 6: mapa del plásmido pMW219glpK(G231D) que contiene el gen glpK
- 15 Los datos de longitud están recogidos como datos aproximados. Las abreviaturas y denominaciones utilizadas tienen el siguiente significado:
- cat: gen de resistencia a cloranfenicol
  - M13 ori: origen de replicación
  - rep-ts: región de replicación sensible a la temperatura del plásmido pSC101
  - 20 • glpK1: parte de la región 5' del gen glpK
  - glpK2: parte de la región 3' del gen glpK y de la región situada aguas abajo
  - sacB: gen sacB
  - pSC101: fragmento de plásmido pSC101
  - serA: región codificadora del gen serA que codifica la D-3-fosfoglicerato-deshidrogenasa
  - 25 • trpE476DCBA: parte del operón de triptófano trpLEDCBA con alelo trpE476
  - tetA: gen de resistencia a tetraciclina
  - kan: gen que codifica la resistencia a canamicina
  - glpK: región codificadora del gen glpK
  - lacZ': fragmento de gen que codifica el péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa
- 30 Las abreviaturas de las enzimas de restricción tienen el siguiente significado
- HindIII: endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae*
  - Avall: endonucleasa de restricción de *Anabaena variabilis*
  - 35 • AlwNI: endonucleasa de restricción de *Acinetobacter lwoffii*
  - BspE1: endonucleasa de restricción de una especie de *Bacillus*
  - Sall: endonucleasa de restricción de *Streptomyces albus*
  - XhoI: endonucleasa de restricción de *Xanthomonas holcicola*
  - BamHI: endonucleasa de restricción de *Bacillus amyloliquefaciens* H
  - 40 • Haell: endonucleasa de restricción de *Haemophilus aegyptius*
  - SpeI: endonucleasa de restricción de una especie de *Sphaerotilus*
  - MluI: endonucleasa de restricción de *Micrococcus luteus*
- 45

# ES 2 519 016 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Evonik Degussa GmbH	
5	<120>	Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos utilizando cepas mejoradas de la familia Enterobacteriaceae	
	<130>	2007P00111	
10	<160>	20	
	<170>	PatentIn version 3.3	
	<210>	1	
15	<211>	1509	
	<212>	ADN	
	<213>	Escherichia coli	
	<220>		
20	<221>	CDS	
	<222>	(1) ..... (1509)	
	<223>	región codificadora de glpK	
	<400>	1	
		atg act gaa aaa aaa tat atc gtt gcg ctc gac cag ggc acc acc agc 48	
		Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser	
		1 5 10 15	
		tcc cgc gcg gtc gta atg gat cac gat gcc aat atc att agc gtg tcg 96	
		Ser Arg Ala Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser	
		20 25 30	
		cag cgc gaa ttt gag caa atc tac cca aaa cca ggt tgg gta gaa cac 144	
		Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His	
		35 40 45	
		gac cca atg gaa atc tgg gcc acc caa agc tcc acg ctg gta gaa gtg 192	
		Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Thr Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val	
		50 55 60	
		ctg gcg aaa gcc gat atc agt tcc gat caa att gca gct atc ggt att 240	
		Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile	
		65 70 75 80	
		acg aac cag cgt gaa acc act att gtc tgg gaa aaa gaa acc ggc aag 288	
		Thr Asn Gln Arg Glu Thr Thr Ile Val Trp Glu Lys Glu Thr Gly Lys	
		85 90 95	
		cct atc tat aac gcc att gtc tgg cag tgc cgt cgt acc gca gaa atc 336	
		Pro Ile Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Cys Arg Arg Thr Ala Glu Ile	
		100 105 110	
		tgc gag cat tta aaa cgt gac ggt tta gaa gat tat atc cgc agc aat 384	
		Cys Glu His Leu Lys Arg Asp Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Arg Ser Asn	
		115 120 125	
		acc ggt ctg gtg att gac ccg tac ttt tct ggc acc aaa gtg aag tgg 432	
		Thr Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp	
		130 135 140	
		atc ctc gac cat gtg gaa ggc tct cgc gag cgt gca cgt cgt ggt gaa 480	
		Ile Leu Asp His Val Glu Gly Ser Arg Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu	
		145 150 155 160	
		ttg ctg ttt ggt acg gtt gat acg tgg ctt atc tgg aaa atg act cag 528	
		Leu Leu Phe Gly Thr Val Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Met Thr Gln	
		165 170 175	

ES 2 519 016 T3

ggc cgt gtc cat gtg acc gat tac acc aac gcc tct cgt acc atg ttg 576  
 Gly Arg Val His Val Thr Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Arg Thr Met Leu  
 180 185 190

ttc aac atc cat acc ctg gac tgg gac gac aaa atg ctg gaa gtg ctg 624  
 Phe Asn Ile His Thr Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Glu Val Leu  
 195 200 205

gat att ccg cgc gag atg ctg cca gaa gtg cgt cgt tct tcc gaa gta 672  
 Asp Ile Pro Arg Glu Met Leu Pro Glu Val Arg Arg Ser Ser Glu Val  
 210 215 220

tac ggt cag act aac att ggc ggc aaa ggc gcc acg cgt att cca atc 720  
 Tyr Gly Gln Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Thr Arg Ile Pro Ile  
 225 230 235 240

tcc ggg atc gcc ggt gac cag cag gcc gcg ctg ttt ggt cag ttg tgc 768  
 Ser Gly Ile Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys  
 245 250 255

gtg aaa gaa ggg atg gcg aag aac acc tat gcc act gcc tgc ttt atg 816  
 Val Lys Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met  
 260 265 270

ctg atg aac act ggc gag aaa gcg gtg aaa tca gaa aac gcc ctg ctg 864  
 Leu Met Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu  
 275 280 285

acc acc atc gcc tgc ggc ccg act gcc gaa gtg aac tat gcg ttg gaa 912  
 Thr Thr Ile Ala Cys Gly Pro Thr Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu  
 290 295 300

ggt gcg gtg ttt atg gca ggc gca tcc att cag tgg ctg cgc gat gaa 960  
 Gly Ala Val Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu  
 305 310 315 320

atg aag ttg att aac gac gcc tac gat tcc gaa tat ttc gcc acc aaa 1008  
 Met Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys  
 325 330 335

gtg caa aac acc aat ggt gtg tat gtg gtt ccg gca ttt acc ggg ctg 1056  
 Val Gln Asn Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu  
 340 345 350

ggt gcg ccg tac tgg gac ccg tat gcg cgc ggg gcc att ttc ggt ctg 1104  
 Gly Ala Pro Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu  
 355 360 365

act cgt ggg gtg aac gct aac cac att ata cgc gcc acc ctg gag tct 1152  
 Thr Arg Gly Val Asn Ala Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser  
 370 375 380

att gct tat cag acg cgt gac gtg ctg gaa gcg atg cag gcc gac tct 1200  
 Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
 385 390 395 400

ggt atc cgt ctg cac gcc ctg cgc gtg gat ggt gcc gca gta gca aac 1248  
 Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
 405 410 415

aat ttc ctg atg cag ttc cag tcc gat att ctc gcc acc cgc gtt gag 1296  
 Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu  
 420 425 430

cgc ccg gaa gtg cgc gaa gtc acc gca ttg ggt gcg gcc tat ctc gca 1344  
 Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
 435 440 445

ggc ctg gcg gtt ggc ttc tgg cag aac ctc gac gag ctg caa gag aaa 1392

ES 2 519 016 T3

Gly Leu Ala Val Gly Phe Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
 450 455 460  
 gcg gtg att gag cgc gag ttc cgt cca ggc atc gaa acc act gag cgt 1440  
 Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg 480  
 465 470 475  
 aat tac cgt tac gca ggc tgg aaa aaa gcg gtt aaa cgc gcg atg gcg 1488  
 Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala 495  
 485  
 tgg gaa gaa cac gac gaa taa 1509  
 Trp Glu Glu His Asp Glu  
 500

<210> 2  
 <211> 502  
 <212> PRT  
 5 <213> Escherichia coli

<400> 2  
 Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Arg Ala Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser  
 20 25 30  
 Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His  
 35 40 45  
 Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Thr Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val  
 50 55 60  
 Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile  
 65 70 75 80  
 Thr Asn Gln Arg Glu Thr Thr Ile Val Trp Glu Lys Glu Thr Gly Lys  
 85 90 95  
 Pro Ile Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Cys Arg Arg Thr Ala Glu Ile  
 100 105 110  
 Cys Glu His Leu Lys Arg Asp Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Arg Ser Asn  
 115 120 125  
 Thr Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp  
 130 135 140  
 Ile Leu Asp His Val Glu Gly Ser Arg Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Phe Gly Thr Val Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Met Thr Gln  
 165 170 175  
 Gly Arg Val His Val Thr Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Arg Thr Met Leu  
 180 185 190

ES 2 519 016 T3

Phe Asn Ile His Thr Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Glu Val Leu  
 195 200 205  
 Asp Ile Pro Arg Glu Met Leu Pro Glu Val Arg Arg Ser Ser Glu Val  
 210 215 220  
 Tyr Gly Gln Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ile Pro Ile  
 225 230 235  
 Ser Gly Ile Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys  
 245 250 255  
 Val Lys Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met  
 260 265 270  
 Leu Met Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu  
 275 280 285  
 Thr Thr Ile Ala Cys Gly Pro Thr Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu  
 290 295 300  
 Gly Ala Val Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu  
 305 310 315 320  
 Met Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys  
 325 330 335  
 Val Gln Asn Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu  
 340 345 350  
 Gly Ala Pro Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu  
 355 360 365  
 Thr Arg Gly Val Asn Ala Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser  
 370 375 380  
 Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
 405 410 415  
 Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu  
 420 425 430  
 Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
 435 440 445  
 Gly Leu Ala Val Gly Phe Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
 450 455 460



ES 2 519 016 T3

Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg  
465 470 475 480

Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala  
485 490 495

Trp Glu Glu His Asp Glu  
500

<210> 3

<211> 1509

<212> ADN

5 <213> Salmonella typhimurium

<220>

<221> CDS

<222> (1) ..... (1509)

10 <223> región codificadora de glpK

<400> 3

atg act gaa aaa aaa tat atc gtt gcg ctc gac cag ggt acc acc agc 48  
Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser  
1 5 10 15

tcc cgc gcg gtc gtt atg gat cat gac gcg aat atc gtc agc gta tca 96  
Ser Arg Ala Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Val Ser Val Ser  
20 25 30

cag cgt gaa ttt gag caa att tat cct aag cca ggc tgg gta gaa cac 144  
Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His  
35 40 45

gac ccg atg gaa att tgg gcg tcc caa agc tca acg ctg gta gaa gtg 192  
Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Ser Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val  
50 55 60

ctg gct aag gcc gat atc agt tcc gat cag att gcc gct atc ggt atc 240  
Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile  
65 70 75 80

acc aac caa cgt gaa acc gcg atc gtc tgg gaa cgt gaa acc gcc aaa 288  
Thr Asn Gln Arg Glu Thr Ala Ile Val Trp Gln Glu Arg Glu Thr Gly Lys  
85 90 95

ccg ata tac aac gct att gtc tgg cag tgc cgt cgt acc gcc gat att 336  
Pro Ile Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Cys Arg Arg Thr Ala Asp Ile  
100 105 110

tgc gaa cag ctt aaa cgc gac ggc ctg gaa gat tac atc cgc gac aat 384  
Cys Glu Gln Leu Lys Arg Asp Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Arg Asp Asn  
115 120 125

acc ggt ctg gtc gtc gac ccg tac ttc tct ggc act aaa gtg aaa tgg 432  
Thr Gly Leu Val Val Asp Pro Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp  
130 135 140

atc ctt gac cat gtg gaa ggt tcg cgc gaa cgc gcg aag cgt gcc gag 480  
Ile Leu Asp His Val Glu Gly Ser Arg Glu Arg Ala Lys Arg Gly Glu  
145 150 155 160

ctg ctg ttc ggt acg gtg gat acc tgg ctt atc tgg aag atg acg cag 528  
Leu Leu Phe Gly Thr Val Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Met Thr Gln  
165 170 175

15

ES 2 519 016 T3

ggc cgc gtc cac gtt acg gat tac acc aac gcc tca cga acc atg ctg 576  
 Gly Arg Val His Val Thr Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Arg Thr Met Leu  
 180 185 190

ttc aac atc cat gat ttg gac tgg gac gat aag atg ctg gac gtg ctg 624  
 Phe Asn Ile His Asp Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Asp Val Leu  
 195 200 205

gat atc cca cgc gcg atg ctg ccc cag gta cgt aag tcc tcc gaa gtc 672  
 Asp Ile Pro Arg Ala Met Leu Pro Gln Val Arg Lys Ser Ser Glu Val  
 210 215 220

tac gcc cag acc aat att gcc ggt aaa gcc ggt aca cgt att cct atc 720  
 Tyr Gly Gln Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ile Pro Ile  
 225 230 235 240

gcc ggg att gcc ggg gat cag cag gcc gcg tta ttc ggt caa ctg tgc 768  
 Ala Gly Ile Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys  
 245 250 255

gta aag gaa gga atg gca aag aat acc tac gcc acc gcc tgc ttt atg 816  
 Val Lys Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met  
 260 265 270

ctg atg aac acc gcc gag aaa gcg gta aaa tcg gaa aac gcc ctg ctg 864  
 Leu Met Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu  
 275 280 285

atc acc atc gcc tgc gcc cca agc gcc gaa gtc aac tat gcc ctg gaa 912  
 Ile Thr Ile Ala Cys Gly Pro Ser Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu  
 290 295 300

gcc gcg gtg ttt atg gcg gga gcg tcc att caa tgg ctg cgt gat gaa 960  
 Gly Ala Val Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu  
 305 310 315 320

atg aag ctc atc agc gac gcg ttc gac tcc gaa tat ttc gcc acg aaa 1008  
 Met Lys Leu Ile Ser Asp Ala Phe Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys  
 325 330 335

gtg aaa gat acc aac ggt gtc tac gtg gtt ccg gcc ttc acc ggt ctg 1056  
 Val Lys Asp Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu  
 340 345 350

gcc gcg ccg tac tgg gac ccg tat gcc cgc gcc gcc att ttt gcc ctg 1104  
 Gly Ala Pro Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu  
 355 360 365

acc cgc gcc gtg aac tct aat cac att atc cgc gcg acg ctc gaa tcc 1152  
 Thr Arg Gly Val Asn Ser Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser  
 370 375 380

atc gct tac cag acc cgc gac gta ctg gaa gcg atg cag gcc gac tcc 1200  
 Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
 385 390 395 400

ggt atc cgc ctg cac gct ctg cgt gtg gac gcc gcc gca gtg gcc aac 1248  
 Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
 405 410 415

aac ttc ctg atg cag ttc cag tca gat att ctc gcc acg cgg gtg gaa 1296  
 Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu  
 420 425 430

cgc ccg gaa gtg cgc gaa gtg acc gcg ctg gcc gcc gcc tat ctg gct 1344  
 Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
 435 440 445

ggc ctg gcc gtc ggt tac tgg cag aac ctg gac gag ctg cag gaa aaa 1392

ES 2 519 016 T3

Gly Leu Ala Val Gly Tyr Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
 450 455 460  
 gcc gtc att gag cga gaa ttc cgc ccc ggc att gaa acc acc gag cgt 1440  
 Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg  
 465 470 475 480  
 aac tac cgt tac agc ggc tgg aag aaa gcg gtt aaa cgc gca atg gcg 1488  
 Asn Tyr Arg Tyr Ser Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala  
 485 490 495  
 tgg gaa gag cac gac aag taa  
 Trp Glu Glu His Asp Lys 1509

<210> 4  
 <211> 502  
 <212> PRT  
 <213> Salmonella typhimurium

5

<400> 4

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

10

ES 2 519 016 T3

Phe Asn Ile His Asp Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Asp Val Leu  
 195 200 205  
 Asp Ile Pro Arg Ala Met Leu Pro Gln Val Arg Lys Ser Ser Glu Val  
 210 215 220  
 Tyr Gly Gln Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ile Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Ala Gly Ile Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys  
 245 250 255  
 Val Lys Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met  
 260 265 270  
 Leu Met Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu  
 275 280 285  
 Ile Thr Ile Ala Cys Gly Pro Ser Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu  
 290 295 300  
 Gly Ala Val Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu  
 305 310 315 320  
 Met Lys Leu Ile Ser Asp Ala Phe Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys  
 325 330 335  
 Val Lys Asp Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu  
 340 345 350  
 Gly Ala Pro Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu  
 355 360 365  
 Thr Arg Gly Val Asn Ser Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser  
 370 375 380  
 Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
 405 410 415  
 Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu  
 420 425 430  
 Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
 435 440 445  
 Gly Leu Ala Val Gly Tyr Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
 450 455 460

ES 2 519 016 T3

Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg  
465 470 475 480

Asn Tyr Arg Tyr Ser Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala  
485 490 495

Trp Glu Glu His Asp Lys  
500

<210> 5  
<211> 1509  
<212> ADN

5 <213> Shigella flexneri

<220>  
<221> CDS  
<222> (1) ..... (1509)

10 <223> región codificadora de glpK

<400> 5  
atg act gaa aaa aaa tat atc gtt gcg ctc gac cag ggc acc acc agc 48  
Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser  
1 5 10 15  
tcc cgc gcg gtc gta atg gat cac gat gcc aat atc att agc gtg tcg 96  
Ser Arg Ala Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser  
20 25 30  
cag cgc gaa ttt gag caa atc tac cca aaa cca ggt tgg gta gaa cac 144  
Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His  
35 40 45  
gac cca atg gaa atc tgg gcc acc caa agc tcc acg ctg gta gaa gtg 192  
Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Thr Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val  
50 55 60  
ctg gcg aaa gcc gat atc agt tcc gat caa att gca gct atc ggt att 240  
Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile  
65 70 75 80  
acg aac cag cgt gaa acc act att gtc tgg gaa aaa gaa acc ggc aag 288  
Thr Asn Gln Arg Glu Thr Thr Ile Val Trp Glu Lys Glu Thr Gly Lys  
85 90 95  
cct atc tat aac gcc att gtc tgg cag tgc cgt cgt acc gca gaa atc 336  
Pro Ile Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Cys Arg Arg Thr Ala Glu Ile  
100 105 110  
tgc gag cat tta aaa cgt gac ggt tta gaa gat tat atc cgc agc aat 384  
Cys Glu His Leu Lys Arg Asp Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Arg Ser Asn  
115 120 125  
acc ggt ctg gtg att gac ccg tac ttt tct ggc acc aaa gtg aag tgg 432  
Thr Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp  
130 135 140  
atc ctc gac cat gtg gaa ggc tct cac gag cgt gca cgt cgt ggt gaa 480  
Ile Leu Asp His Val Glu Gly Ser His Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu  
145 150 155 160  
ttg ctg ttt ggt acg gtt gat acg tgg ctt atc tgg aaa atg act cag 528  
Leu Leu Phe Gly Thr Val Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Met Thr Gln  
165 170 175

ES 2 519 016 T3

ggc cgt gtc cat gtg acc gat tac acc aac gcc tct cgt acc atg ttg 576  
 Gly Arg Val His Val Thr Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Arg Thr Met Leu  
 180 185 190

ttc aac atc cat acc ctg gac tgg gac gac aaa atg ctg gaa gtg ctg 624  
 Phe Asn Ile His Thr Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Glu Val Leu  
 195 200 205

gat att ccg cgc gag atg ctg cca gaa gtg cgt cgt tct tcc gaa gta 672  
 Asp Ile Pro Arg Glu Met Leu Pro Glu Val Arg Arg Ser Ser Glu Val  
 210 215 220

tac ggt cag act aac att ggc gcc aaa gcc gcc acg cgt att cca atc 720  
 Tyr Gly Gln Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ile Pro Ile  
 225 230 235 240

tcc ggg atc gcc ggt gac cag cag gcc gcc ctg ttt ggt cag ttg tgc 768  
 Ser Gly Ile Ala Gly Met Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys  
 245 250 255

gtg aaa gaa ggg atg gcg aag aac acc tat gcc act gcc tgc ttt atg 816  
 Val Lys Glu Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met  
 260 265 270

ctg atg aac act gcc gag aaa gcg gtg aaa tca gaa aac gcc ctg ctg 864  
 Leu Met Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu  
 275 280 285

acc acc atc gcc tgc gcc ccg act gcc gaa gtg aac tat gcg ttg gaa 912  
 Thr Thr Ile Ala Cys Gly Pro Thr Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu  
 290 295 300

ggt gcg gtg ttt atg gca gcc gca tcc att cag tgg ctg cgc gat gag 960  
 Gly Ala Val Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu  
 305 310 315 320

atg aag ttg att aac gac gcc tac gat tcc gaa tat ttc gcc acc aaa 1008  
 Met Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys  
 325 330 335

gtg caa aac acc aat ggt gtg tat gtg gtt ccg gca ttt acc ggg ctg 1056  
 Val Gln Asn Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu  
 340 345 350

ggt gcg ccg tac tgg gac ccg tat gcg cgc ggg gcc att ttc ggt ctg 1104  
 Gly Ala Pro Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu  
 355 360 365

act cgt ggg gtg aac gct aac cac att ata cgc gcc acg ctg gag tct 1152  
 Thr Arg Gly Val Asn Ala Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser  
 370 375 380

att gct tat cag acg cgt gac gtg ctg gaa gcg atg cag gcc gac tct 1200  
 Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
 385 390 395 400

ggt atc cgt ctg cac gcc ctg cgc gtg gat ggt gcc gca gta gca aac 1248  
 Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
 405 410 415

aat ttc ctg atg cag ttc cag tcc gat att ctc gcc acc cgc gtt gag 1296  
 Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu  
 420 425 430

cgc ccg gaa gtg cgc gaa gtc acc gca ttg ggt gcg gcc tat ctc gca 1344  
 Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
 435 440 445

ggc ctg gcg gtt ggc ttc tgg cag aac ctc gac gag ctg caa gag aaa 1392

ES 2 519 016 T3

Gly Leu Ala Val Gly Phe Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
 450 455 460  
 gcg gtg att gag cgc gag ttc cgt cca ggc atc gaa acc act gag cgt 1440  
 Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg  
 465 470 475  
 aat tac cgt tac gca ggc tgg aaa aaa gcg gtc aaa cgc gcg atg gcg 1488  
 Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala  
 485 490 495  
 tgg gaa gaa cac gac gag taa 1509  
 Trp Glu Glu His Asp Glu  
 500

<210> 6  
 <211> 502  
 <212> PRT  
 <213> Shigella flexneri

5

<400> 6  
 Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Arg Ala Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser  
 20 25 30  
 Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His  
 35 40 45  
 Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Thr Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val  
 50 55 60  
 Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile  
 65 70 75 80  
 Thr Asn Gln Arg Glu Thr Thr Ile Val Trp Glu Lys Glu Thr Gly Lys  
 85 90 95  
 Pro Ile Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Cys Arg Arg Thr Ala Glu Ile  
 100 105 110  
 Cys Glu His Leu Lys Arg Asp Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Arg Ser Asn  
 115 120 125  
 Thr Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp  
 130 135 140  
 Ile Leu Asp His Val Glu Gly Ser His Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Phe Gly Thr Val Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Met Thr Gln  
 165 170 175  
 Gly Arg Val His Val Thr Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Arg Thr Met Leu  
 180 185 190

10

ES 2 519 016 T3

Phe Asn Ile His Thr Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Glu Val Leu  
 195 200 205  
 Asp Ile Pro Arg Glu Met Leu Pro Glu Val Arg Arg Ser Ser Glu Val  
 210 215 220  
 Tyr Gly Gln Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ile Pro Ile  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Ile Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys  
 245 250 255  
 Val Lys Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met  
 260 265 270  
 Leu Met Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu  
 275 280 285  
 Thr Thr Ile Ala Cys Gly Pro Thr Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu  
 290 295 300  
 Gly Ala Val Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu  
 305 310 315 320  
 Met Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys  
 325 330 335  
 Val Gln Asn Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu  
 340 345 350  
 Gly Ala Pro Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu  
 355 360 365  
 Thr Arg Gly Val Asn Ala Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser  
 370 375 380  
 Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
 405 410 415  
 Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu  
 420 425 430  
 Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
 435 440 445  
 Gly Leu Ala Val Gly Phe Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
 450 455 460



ES 2 519 016 T3

Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg  
465 470 475 480

Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala  
485 490 495

Trp Glu Glu His Asp Glu  
500

<210> 7  
<211> 2150  
5 <212> ADN  
<213> Escherichia coli

<220>  
10 <221> CDS  
<222> (109) ..... (1617)  
<223> región codificadora de glpK

<400> 7  
tgattggtcg ccatttgcct tgcgatatct gtgttggtgga agaaaaggaa accacaactc 60  
cttcagaaca aaaagcttcg ctgtaatatg actacgggac aattaaac atg act gaa 117  
Met Thr Glu  
1  
aaa aaa tat atc gtt gcg ctc gac cag ggc acc acc agc tcc cgc gcg 165  
Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser Ser Arg Ala  
5 10 15  
gtc gta atg gat cac gat gcc aat atc att agc gtg tgc cag cgc gaa 213  
Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser Gln Arg Glu  
20 25 30 35  
ttt gag caa atc tac cca aaa cca ggt tgg gta gaa cac gac cca atg 261  
Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His Asp Pro Met  
40 45 50  
gaa atc tgg gcc acc caa agc tcc acg ctg gta gaa gtg ctg gcg aaa 309  
Glu Ile Trp Ala Thr Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val Leu Ala Lys  
55 60 65  
gcc gat atc agt tcc gat caa att gca gct atc ggt att acg aac cag 357  
Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile Thr Asn Gln  
70 75 80  
cgt gaa acc act att gtc tgg gaa aaa gaa acc ggc aag cct atc tat 405  
Arg Glu Thr Thr Ile Val Trp Glu Lys Glu Thr Gly Lys Pro Ile Tyr  
85 90 95  
aac gcc att gtc tgg cag tgc cgt cgt acc gca gaa atc tgc gag cat 453  
Asn Ala Ile Val Trp Gln Cys Arg Arg Thr Ala Glu Ile Cys Glu His  
100 105 110 115  
tta aaa cgt gac ggt tta gaa gat tat atc cgc agc aat acc ggt ctg 501  
Leu Lys Arg Asp Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Arg Ser Asn Thr Gly Leu  
120 125 130  
gtg att gac ccg tac ttt tct ggc acc aaa gtg aag tgg atc ctc gac 549  
Val Ile Asp Pro Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp Ile Leu Asp  
135 140 145  
cat gtg gaa ggc tct cgc gag cgt gca cgt cgt ggt gaa ttg ctg ttt 597  
His Val Glu Gly Ser Arg Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu Leu Leu Phe

15

ES 2 519 016 T3

150	155	160	
ggt acg gtt gat acg tgg ctt atc tgg aaa atg act cag ggc cgt gtc Gly Thr Val Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Met Thr Gln Gly Arg Val			645
165	170	175	
cat gtg acc gat tac acc aac gcc tct cgt acc atg ttg ttc aac atc His Val Thr Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Arg Thr Met Leu Phe Asn Ile			693
180	185	190	195
cat acc ctg gac tgg gac gac aaa atg ctg gaa gtg ctg gat att ccg His Thr Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Glu Val Leu Asp Ile Pro			741
200	205	210	
cgc gag atg ctg cca gaa gtg cgt cgt tct tcc gaa gta tac ggt cag Arg Glu Met Leu Pro Glu Val Arg Arg Ser Ser Glu Val Tyr Gly Gln			789
215	220	225	
act aac att ggc ggc aaa ggc ggc acg cgt att cca atc tcc ggg atc Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ile Pro Ile Ser Gly Ile			837
230	235	240	
gcc ggt gac cag cag gcc gcg ctg ttt ggt cag ttg tgc gtg aaa gaa Ala Gly Asp Gln Gln Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys Val Lys Glu			885
245	250	255	
ggg atg gcg aag aac acc tat ggc act ggc tgc ttt atg ctg atg aac Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met Leu Met Asn			933
260	265	270	275
act ggc gag aaa gcg gtg aaa tca gaa aac ggc ctg ctg acc acc atc Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu Thr Thr Ile			981
280	285	290	
gcc tgc ggc ccg act ggc gaa gtg aac tat gcg ttg gaa ggt gcg gtg Ala Cys Gly Pro Thr Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu Gly Ala Val			1029
295	300	305	
ttt atg gca ggc gca tcc att cag tgg ctg cgc gat gaa atg aag ttg Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu Met Lys Leu			1077
310	315	320	
att aac gac gcc tac gat tcc gaa tat ttc gcc acc aaa gtg caa aac Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys Val Gln Asn			1125
325	330	335	
acc aat ggt gtg tat gtg gtt ccg gca ttt acc ggg ctg ggt gcg ccg Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu Gly Ala Pro			1173
340	345	350	355
tac tgg gac ccg tat gcg cgc ggg gcg att ttc ggt ctg act cgt ggg Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu Thr Arg Gly			1221
360	365	370	
gtg aac gct aac cac att ata cgc gcg acg ctg gag tct att gct tat Val Asn Ala Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser Ile Ala Tyr			1269
375	380	385	
cag acg cgt gac gtg ctg gaa gcg atg cag gcc gac tct ggt atc cgt Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser Gly Ile Arg			1317
390	395	400	
ctg cac gcc ctg cgc gtg gat ggt ggc gca gta gca aac aat ttc ctg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn Asn Phe Leu			1365
405	410	415	
atg cag ttc cag tcc gat att ctc ggc acc cgc gtt gag cgc ccg gaa Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu Arg Pro Glu			1413
420	425	430	435

ES 2 519 016 T3

gtg cgc gaa gtc acc gca ttg ggt gcg gcc tat ctc gca ggc ctg gcg 1461  
Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Leu Ala  
440 445 450

gtt ggc ttc tgg cag aac ctc gac gag ctg caa gag aaa gcg gtg att 1509  
Val Gly Phe Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys Ala Val Ile  
455 460 465

gag cgc gag ttc cgt cca ggc atc gaa acc act gag cgt aat tac cgt 1557  
Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg Asn Tyr Arg  
470 475 480

tac gca ggc tgg aaa aaa gcg gtt aaa cgc gcg atg gcg tgg gaa gaa 1605  
Tyr Ala Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala Trp Glu Glu  
485 490 495

cac gac gaa taa tgtaaagcc gaatgaagcg tttatgccgc atccggtagt 1657  
His Asp Glu  
500

cccgaaacgt gcgggggcaa ccccgcacac atcaataatc cctcccttcc cctgtgtctac 1717  
atttcgcgcc attccttact gcttagagtt tgctatgaga cgagaacttg ccatcgaatt 1777  
ttcccgctc accgaatcag cggcgctggc tggctacaaa tggttaggac gcggcgataa 1837  
aaacaccgcg gacggcgcg cggtaaacgc catgctgatt atgctcaacc aggtcaacat 1897  
tgacggcacc atcgtcattg gtgaaggtga aatcgacgaa gcaccgatgc tctacattgg 1957  
tgaaaaagtc ggtactggtc gcggcgacgc ggtagatatt gctgttgatc cgattgaagg 2017  
cacgcgcatg acggcgatgg gccaggctaa cgcgctggcg gtgctggcag taggcgataa 2077  
aggctgcttc ctcaatgctc cggatatgta tatggagaag ctgattgtcg ggccgggagc 2137  
caaaggcacc att 2150

<210> 8  
<211> 502  
<212> PRT  
5 <213> Escherichia coli

<400> 8  
Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser  
1 5 10 15  
Ser Arg Ala Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser  
20 25 30  
Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His  
35 40 45  
Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Thr Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val  
50 55 60  
Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile  
65 70 75 80  
Thr Asn Gln Arg Glu Thr Thr Ile Val Trp Glu Lys Glu Thr Gly Lys  
85 90 95

ES 2 519 016 T3

Pro Ile Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Cys Arg Arg Thr Ala Glu Ile  
 100 105 110

Cys Glu His Leu Lys Arg Asp Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Arg Ser Asn  
 115 120 125

Thr Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp  
 130 135 140

Ile Leu Asp His Val Glu Gly Ser Arg Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu  
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Gly Thr Val Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Met Thr Gln  
 165 170 175

Gly Arg Val His Val Thr Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Arg Thr Met Leu  
 180 185 190

Phe Asn Ile His Thr Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Glu Val Leu  
 195 200 205

Asp Ile Pro Arg Glu Met Leu Pro Glu Val Arg Arg Ser Ser Glu Val  
 210 215 220

Tyr Gly Gln Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Gly Thr Arg Ile Pro Ile  
 225 230 235 240

Ser Gly Ile Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys  
 245 250 255

Val Lys Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met  
 260 265 270

Leu Met Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu  
 275 280 285

Thr Thr Ile Ala Cys Gly Pro Thr Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu  
 290 295 300

Gly Ala Val Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu  
 305 310 315 320

Met Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys  
 325 330 335

Val Gln Asn Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu  
 340 345 350

Gly Ala Pro Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu  
 355 360 365

ES 2 519 016 T3

Thr Arg Gly Val Asn Ala Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser  
 370 375 380

Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
 385 390 395 400

Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
 405 410 415

Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu  
 420 425 430

Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
 435 440 445

Gly Leu Ala Val Gly Phe Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
 450 455 460

Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg  
 465 470 475 480

Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala  
 485 490 495

Trp Glu Glu His Asp Glu  
 500

- <210> 9
- <211> 20
- <212> ADN
- 5 <213> Escherichia coli
  
- <220>
- <221> cebador
- <222> (1) ..... (20)
- 10 <223> glpK\_3
  
- <400> 9
- cgattacacc aacgcctctc 20
- <210> 10
- <211> 40
- 15 <212> ADN
- <213> secuencia artificial
  
- <220>
- <223> cebador "gene-SOEing"
- 20
- <220>
- <221> cebador
- <222> (1) ..... (40)
- <223> glpK\_4\_SOEing
- 25
- <400> 10
- tccggacgct caacgcgggt atcgagaata tcggactgga 40
  
- 30 <210> 11
- <211> 40
- <212> ADN
- <213> secuencia artificial

ES 2 519 016 T3

<220>  
 <223> cebador "gene-SOEing"

5 <220>  
 <221> cebador  
 <222> (1) ..... (40)  
 <223> glpK\_5\_SOEing

10 <400> 11  
 tctcgatacc cgcgttgagc gtccggaagt gcgcgaagtc 40  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli

15 <220>  
 <221> cebador  
 <222> (1) ..... (20)  
 <223> glpK\_6

20 <400> 12  
 gcccgacaat cagcttctcc 20  
 <210> 13  
 <211> 1477  
 <212> ADN

25 <213> Escherichia coli

<220>  
 <221> mutación  
 <222> (738) ..... (739)  
 <223> transiciones gc → at

30 <400> 13  
 cgattacacc aacgcctctc gtaccatggt gttcaacatc cataccctgg actgggacga 60  
 caaaatgctg gaagtgctgg atattccgcg cgagatgctg ccagaagtgc gtcgttcttc 120  
 cgaagtatac ggtcagacta acattggcgg caaaggcggc acgcgtattc caatctccgg 180  
 gatcgccggg gaccagcagg ccgcgctggt tggtcagttg tgcgtgaaag aagggatggc 240  
 gaagaacacc tatggcactg gctgctttat gctgatgaac actggcgaga aagcggtgaa 300  
 atcagaaaac ggcctgctga ccaccatcgc ctgcggcccg actggcgaag tgaactatgc 360  
 gttggaaggt gcggtgttta tggcaggcgc atccattcag tggctgcgcg atgaaatgaa 420  
 gttgattaac gacgcctacg attccgaata tttcgccacc aaagtgcaaa acaccaatgg 480  
 tgtgtatgtg gttccggcat ttaccgggct gggcgcgccg tactgggacc cgtatgcgcg 540  
 cggggcgatt ttcggtctga ctcgtggggg gaacgctaac cacattatac gcgacgacgct 600  
 ggagtcctatt gcttatcaga cgcgtgacgt gctggaagcg atgcaggccg actctgggat 660  
 ccgtctgcac gccctgcccg tggatggtgg cgcagtagca aacaatttcc tgatgcagtt 720

ES 2 519 016 T3

ccagtcgat attctcgata cccgcgttga gcgtccgaa gtgcgcaag tcaccgcatt 780  
 ggggtcggcc tatctcgag gcctggcggg tggcttctgg cagaacctcg acgagctgca 840  
 agagaaagcg gtgattgagc gcgagttccg tccaggcatc gaaacctg agcgtaatta 900  
 ccgttacgca ggctggaaaa aagcgggtaa acgcgcatg gcgtgggaag aacacgacga 960  
 ataatgtaaa tgccgaatga agcgtttatg ccgcatccgg tagtcccgaa acgtgcgggg 1020  
 gcaacccgc acacatcaat aatccctccc ttccctgtg ctacacttcg cgccattcct 1080  
 tactgcttag agtttgctat gagacgagaa cttgccatcg aattttcccg cgtcaccgaa 1140  
 tcagcggcgc tggctggcta caaatgggta ggacgggcg ataaaaacac cgcggacggc 1200  
 ggggcggtaa acgccatgcg tattatgctc aaccagggtca acattgacgg caccatcgtc 1260  
 attggtgaag gtgaaatcga cgaagcaccg atgctctaca ttggtgaaaa agtcggtact 1320  
 ggtcgcggcg acgcggtaga tattgctggt gatccgattg aaggcacgcg catgacggcg 1380  
 atgggccagg ctaacgcgct ggcggtgctg gcagtaggcg ataaaggctg cttcctcaat 1440  
 gcgccggata tgtatatgga gaagctgatt gtcgggc 1477  
 <210> 14  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 5 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador con sitio de reconocimiento de sales  
 10 <220>  
 <221> cebador  
 <222> (1) ..... (29)  
 <223> glpK\_1  
 <400> 14  
 15 cggtcgcacat gactacggga caattaaac 29  
 <210> 15  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 20 <213> secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador "gene-SOEing"  
 25 <220>  
 <221> cebador  
 <222> (1) ..... (40)  
 <223> glpK\_7\_SOEing  
 <400> 15  
 30 gaattcgcgt gccgcctttg ccatcaatgt tagtctgacc 40  
 <210> 16  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> cebador "gene-SOEing"  
 40 <220>  
 <221> cebador

ES 2 519 016 T3

<222> (1) ..... (40)  
 <223> glpK\_8\_SOEng

<400> 16  
 cattgatggc aaaggcggca cgcgattcc aatctccggg 40

5 <210> 17  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador con sitio de reconocimiento de sales

<220>  
 <221> cebador

15 <222> (1) ..... (28)  
 <223> glpFK\_2

<400> 17  
 cggtcgactt attcgtcgtg ttcttccc 28

20 <210> 18  
 <211> 1546  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (30) ... (1538)  
 <223> región codificadora de glpK

25 <220>  
 <221> mutación  
 <222> (721) ..... (722)  
 <223> transiciones gc → at

30 <400> 18  
 cggtcgacat gactacggga caattaaac atg act gaa aaa aaa tat atc gtt 53  
 Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val  
 1 5

gcg ctc gac cag gcc acc acc agc tcc cgc gcg gtc gta atg gat cac 101  
 Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser Ser Arg Ala Val Val Met Asp His  
 10 15 20

gat gcc aat atc att agc gtg tcg cag cgc gaa ttt gag caa atc tac 149  
 Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr  
 25 30 35 40

cca aaa cca ggt tgg gta gaa cac gac cca atg gaa atc tgg gcc acc 197  
 Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Thr  
 45 50 55

caa agc tcc acg ctg gta gaa gtg ctg gcg aaa gcc gat atc agt tcc 245  
 Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser  
 60 65 70

gat caa att gca gct atc ggt att acg aac cag cgt gaa acc act att 293

35



ES 2 519 016 T3

Asp	Gln	Ile	Ala	Ala	Ile	Gly	Ile	Thr	Asn	Gln	Arg	Glu	Thr	Thr	Ile		
		75					80					85					
gtc	tgg	gaa	aaa	gaa	acc	ggc	aag	cct	atc	tat	aac	gcc	att	gtc	tgg		341
Val	Trp	Glu	Lys	Glu	Thr	Gly	Lys	Pro	Ile	Tyr	Asn	Ala	Ile	Val	Trp		
	90					95					100						
cag	tgc	cgT	cgT	acc	gca	gaa	atc	tgc	gag	cat	tta	aaa	cgT	gac	ggT		389
Gln	Cys	Arg	Arg	Thr	Ala	Glu	Ile	Cys	Glu	His	Leu	Lys	Arg	Asp	Gly		
105					110					115					120		
tta	gaa	gat	tat	atc	cgC	agc	aat	acc	ggT	ctg	gtg	att	gac	ccg	tac		437
Leu	Glu	Asp	Tyr	Ile	Arg	Ser	Asn	Thr	Gly	Leu	Val	Ile	Asp	Pro	Tyr		
				125					130					135			
ttt	tct	ggc	acc	aaa	gtg	aag	tgg	atc	ctc	gac	cat	gtg	gaa	ggc	tct		485
Phe	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Lys	Trp	Ile	Leu	Asp	His	Val	Glu	Gly	Ser		
			140					145					150				
cgC	gag	cgT	gca	cgT	cgT	ggT	gaa	ttg	ctg	ttt	ggT	acg	gTt	gat	acg		533
Arg	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	Gly	Glu	Leu	Leu	Phe	Gly	Thr	Val	Asp	Thr		
		155					160					165					
tgg	ctt	atc	tgg	aaa	atg	act	cag	ggc	cgT	gtc	cat	gtg	acc	gat	tac		581
Trp	Leu	Ile	Trp	Lys	Met	Thr	Gln	Gly	Arg	Val	His	Val	Thr	Asp	Tyr		
	170					175					180						
acc	aac	gcc	tct	cgT	acc	atg	ttg	ttc	aac	atc	cat	acc	ctg	gac	tgg		629
Thr	Asn	Ala	Ser	Arg	Thr	Met	Leu	Phe	Asn	Ile	His	Thr	Leu	Asp	Trp		
185					190					195					200		
gac	gac	aaa	atg	ctg	gaa	gtg	ctg	gat	att	ccg	cgC	gag	atg	ctg	cca		677
Asp	Asp	Lys	Met	Leu	Glu	Val	Leu	Asp	Ile	Pro	Arg	Glu	Met	Leu	Pro		
				205					210					215			
gaa	gtg	cgT	cgT	tct	tcc	gaa	gta	tac	ggT	cag	act	aac	att	gat	ggc		725
Glu	Val	Arg	Arg	Ser	Ser	Glu	Val	Tyr	Gly	Gln	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly		
				220				225					230				
aaa	ggc	ggc	acg	cga	att	cca	atc	tcc	ggg	atc	gcc	ggT	gac	cag	cag		773
Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	Ile	Pro	Ile	Ser	Gly	Ile	Ala	Gly	Asp	Gln	Gln		
		235					240					245					
gcc	gcg	ctg	ttt	ggT	cag	ttg	tgc	gtg	aaa	gaa	ggg	atg	gcg	aag	aac		821
Ala	Ala	Leu	Phe	Gly	Gln	Leu	Cys	Val	Lys	Glu	Gly	Met	Ala	Lys	Asn		
	250					255					260						
acc	tat	ggc	act	ggc	tgc	ttt	atg	ctg	atg	aac	act	ggc	gag	aaa	gcg		869
Thr	Tyr	Gly	Thr	Gly	Cys	Phe	Met	Leu	Met	Asn	Thr	Gly	Glu	Lys	Ala		
				270						275					280		
gtg	aaa	tca	gaa	aac	ggc	ctg	ctg	acc	acc	atc	gcc	tgc	ggc	ccg	act		917
Val	Lys	Ser	Glu	Asn	Gly	Leu	Leu	Thr	Thr	Ile	Ala	Cys	Gly	Pro	Thr		
				285					290					295			
ggc	gaa	gtg	aac	tat	gcg	ttg	gaa	ggT	gcg	gtg	ttt	atg	gca	ggc	gca		965
Gly	Glu	Val	Asn	Tyr	Ala	Leu	Glu	Gly	Ala	Val	Phe	Met	Ala	Gly	Ala		
			300					305					310				
tcc	att	cag	tgg	ctg	cgC	gat	gaa	atg	aag	ttg	att	aac	gac	gcc	tac		1013
Ser	Ile	Gln	Trp	Leu	Arg	Asp	Glu	Met	Lys	Leu	Ile	Asn	Asp	Ala	Tyr		
		315					320						325				
gat	tcc	gaa	tat	ttc	gcc	acc	aaa	gtg	caa	aac	acc	aat	ggT	gtg	tat		1061
Asp	Ser	Glu	Tyr	Phe	Ala	Thr	Lys	Val	Gln	Asn	Thr	Asn	Gly	Val	Tyr		
		330				335					340						
gtg	gTt	ccg	gca	ttt	acc	ggg	ctg	ggT	gcg	ccg	tac	tgg	gac	ccg	tat		1109
Val	Val	Pro	Ala	Phe	Thr	Gly	Leu	Gly	Ala	Pro	Tyr	Trp	Asp	Pro	Tyr		

ES 2 519 016 T3

345		350		355		360	
gcg cgc ggg gcg att ttc ggt ctg act cgt ggg gtg aac gct aac cac		Ile Phe Gly Leu Thr Arg Gly Val Asn Ala Asn His					1157
Ala Arg Gly Ala Ile 365				370		375	
att ata cgc gcg acg ctg gag tct att gct tat cag acg cgt gac gtg		Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val					1205
Ile Ile Arg Ala Thr 380				385		390	
ctg gaa gcg atg cag gcc gac tct ggt atc cgt ctg cac gcc ctg cgc		Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg					1253
Leu Glu Ala Met 395				400		405	
gtg gat ggt ggc gca gta gca aac aat ttc ctg atg cag ttc cag tcc		Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser					1301
Val Asp Gly Gly Ala Val 415				420			
gat att ctc ggc acc cgc gtt gag cgc ccg gaa gtg cgc gaa gtc acc		Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr					1349
Asp Ile Leu Gly Thr 425				430		440	
gca ttg ggt gcg gcc tat ctc gca ggc ctg gcg gtt ggc ttc tgg cag		Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Leu Ala Val Gly Phe Trp Gln					1397
Ala Leu Gly Ala Ala Tyr 445				450		455	
aac ctc gac gag ctg caa gag aaa gcg gtg att gag cgc gag ttc cgt		Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg					1445
Asn Leu Asp Glu Leu Gln 460				465		470	
cca ggc atc gaa acc act gag cgt aat tac cgt tac gca ggc tgg aaa		Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Trp Lys					1493
Pro Gly Ile Glu Thr Thr 475				480		485	
aaa gcg gtt aaa cgc gcg atg gcg tgg gaa gaa cac gac gaa taa		Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala Trp Glu Glu His Asp Glu					1538
Lys Ala Val Lys Arg Ala Met 490				495		500	
gtcgaccg							1546
<210> 19							
<211> 502							
<212> PRT							
5 <213> Escherichia coli							
<400> 19							
Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser							
1 5 10 15							
Ser Arg Ala Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser							
20 25 30							
Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His							
35 40 45							
Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Thr Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val							
50 55 60							
Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile							
65 70 75 80							
Thr Asn Gln Arg Glu Thr Thr Ile Val Trp Glu Lys Glu Thr Gly Lys							

ES 2 519 016 T3

85				90				95							
Pro	Ile	Tyr	Asn	Ala	Ile	Val	Trp	Gln	Cys	Arg	Arg	Thr	Ala	Glu	Ile
			100					105					110		
Cys	Glu	His	Leu	Lys	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Asp	Tyr	Ile	Arg	Ser	Asn
		115					120					125			
Thr	Gly	Leu	Val	Ile	Asp	Pro	Tyr	Phe	Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Lys	Trp
	130					135					140				
Ile	Leu	Asp	His	Val	Glu	Gly	Ser	Arg	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	Gly	Glu
145					150					155					160
Leu	Leu	Phe	Gly	Thr	Val	Asp	Thr	Trp	Leu	Ile	Trp	Lys	Met	Thr	Gln
				165					170					175	
Gly	Arg	Val	His	Val	Thr	Asp	Tyr	Thr	Asn	Ala	Ser	Arg	Thr	Met	Leu
			180					185						190	
Phe	Asn	Ile	His	Thr	Leu	Asp	Trp	Asp	Asp	Lys	Met	Leu	Glu	Val	Leu
		195					200					205			
Asp	Ile	Pro	Arg	Glu	Met	Leu	Pro	Glu	Val	Arg	Arg	Ser	Ser	Glu	Val
	210					215					220				
Tyr	Gly	Gln	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Lys	Gly	Gly	Thr	Arg	Ile	Pro	Ile
225					230					235					240
Ser	Gly	Ile	Ala	Gly	Asp	Gln	Gln	Ala	Ala	Leu	Phe	Gly	Gln	Leu	Cys
				245					250					255	
Val	Lys	Glu	Gly	Met	Ala	Lys	Asn	Thr	Tyr	Gly	Thr	Gly	Cys	Phe	Met
			260					265					270		
Leu	Met	Asn	Thr	Gly	Glu	Lys	Ala	Val	Lys	Ser	Glu	Asn	Gly	Leu	Leu
		275					280					285			
Thr	Thr	Ile	Ala	Cys	Gly	Pro	Thr	Gly	Glu	Val	Asn	Tyr	Ala	Leu	Glu
	290					295					300				
Gly	Ala	Val	Phe	Met	Ala	Gly	Ala	Ser	Ile	Gln	Trp	Leu	Arg	Asp	Glu
305					310					315					320
Met	Lys	Leu	Ile	Asn	Asp	Ala	Tyr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Phe	Ala	Thr	Lys
				325					330					335	
Val	Gln	Asn	Thr	Asn	Gly	Val	Tyr	Val	Val	Pro	Ala	Phe	Thr	Gly	Leu
			340					345					350		
Gly	Ala	Pro	Tyr	Trp	Asp	Pro	Tyr	Ala	Arg	Gly	Ala	Ile	Phe	Gly	Leu
		355					360					365			

ES 2 519 016 T3

Thr Arg Gly Val Asn Ala Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser  
370 375 380

Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
385 390 395 400

Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
405 410 415

Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Gly Thr Arg Val Glu  
420 425 430

Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
435 440 445

Gly Leu Ala Val Gly Phe Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
450 455 460

Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg  
465 470 475 480

Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala  
485 490 495

Trp Glu Glu His Asp Glu  
500

<210> 20

<211> 502

<212> PRT

5 <213> Escherichia coli

<400> 20

Met Thr Glu Lys Lys Tyr Ile Val Ala Leu Asp Gln Gly Thr Thr Ser  
1 5 10 15

Ser Arg Ala Val Val Met Asp His Asp Ala Asn Ile Ile Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Arg Glu Phe Glu Gln Ile Tyr Pro Lys Pro Gly Trp Val Glu His  
35 40 45

Asp Pro Met Glu Ile Trp Ala Thr Gln Ser Ser Thr Leu Val Glu Val  
50 55 60

Leu Ala Lys Ala Asp Ile Ser Ser Asp Gln Ile Ala Ala Ile Gly Ile  
65 70 75 80

Thr Asn Gln Arg Glu Thr Thr Ile Val Trp Glu Lys Glu Thr Gly Lys  
85 90 95

10

ES 2 519 016 T3

Pro Ile Tyr Asn Ala Ile Val Trp Gln Cys Arg Arg Thr Ala Glu Ile  
 100 105 110

Cys Glu His Leu Lys Arg Asp Gly Leu Glu Asp Tyr Ile Arg Ser Asn  
 115 120 125

Thr Gly Leu Val Ile Asp Pro Tyr Phe Ser Gly Thr Lys Val Lys Trp  
 130 135 140

Ile Leu Asp His Val Glu Gly Ser Arg Glu Arg Ala Arg Arg Gly Glu  
 145 150 155 160

Leu Leu Phe Gly Thr Val Asp Thr Trp Leu Ile Trp Lys Met Thr Gln  
 165 170 175

Gly Arg Val His Val Thr Asp Tyr Thr Asn Ala Ser Arg Thr Met Leu  
 180 185 190

Phe Asn Ile His Thr Leu Asp Trp Asp Asp Lys Met Leu Glu Val Leu  
 195 200 205

Asp Ile Pro Arg Glu Met Leu Pro Glu Val Arg Arg Ser Ser Glu Val  
 210 215 220

Tyr Gly Gln Thr Asn Ile Gly Gly Lys Gly Gly Thr Ser Ile Pro Ile  
 225 230 235 240

Ser Gly Ile Ala Gly Asp Gln Gln Ala Ala Leu Phe Gly Gln Leu Cys  
 245 250 255

Val Lys Glu Gly Met Ala Lys Asn Thr Tyr Gly Thr Gly Cys Phe Met  
 260 265 270

Leu Met Asn Thr Gly Glu Lys Ala Val Lys Ser Glu Asn Gly Leu Leu  
 275 280 285

Thr Thr Ile Ala Cys Gly Pro Thr Gly Glu Val Asn Tyr Ala Leu Glu  
 290 295 300

Gly Ala Val Phe Met Ala Gly Ala Ser Ile Gln Trp Leu Arg Asp Glu  
 305 310 315 320

Met Lys Leu Ile Asn Asp Ala Tyr Asp Ser Glu Tyr Phe Ala Thr Lys  
 325 330 335

Val Gln Asn Thr Asn Gly Val Tyr Val Val Pro Ala Phe Thr Gly Leu  
 340 345 350

Gly Ala Pro Tyr Trp Asp Pro Tyr Ala Arg Gly Ala Ile Phe Gly Leu  
 355 360 365

Thr Arg Gly Val Asn Ala Asn His Ile Ile Arg Ala Thr Leu Glu Ser

ES 2 519 016 T3

370 375 380  
Ile Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Val Leu Glu Ala Met Gln Ala Asp Ser  
385 390 395 400  
Gly Ile Arg Leu His Ala Leu Arg Val Asp Gly Gly Ala Val Ala Asn  
405 410 415  
Asn Phe Leu Met Gln Phe Gln Ser Asp Ile Leu Asp Thr Arg Val Glu  
420 425 430  
Arg Pro Glu Val Arg Glu Val Thr Ala Leu Gly Ala Ala Tyr Leu Ala  
435 440 445  
Gly Leu Ala Val Gly Phe Trp Gln Asn Leu Asp Glu Leu Gln Glu Lys  
450 455 460  
Ala Val Ile Glu Arg Glu Phe Arg Pro Gly Ile Glu Thr Thr Glu Arg  
465 470 475 480  
Asn Tyr Arg Tyr Ala Gly Trp Lys Lys Ala Val Lys Arg Ala Met Ala  
485 490 495  
Trp Glu Glu His Asp Glu  
500

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos, caracterizado por que se llevan a cabo las siguientes etapas:
  - 5 1.1 fermentación de microorganismos recombinantes secretores de L-aminoácidos de la familia Enterobacteriaceae o de las bacterias corineformes que contienen un gen glpK que codifica un polipéptido con actividad de glicerol quinasa (ATP-dependiente), cuya secuencia de aminoácidos es al menos un 95% idéntica a la de SEQ ID NO: 2, 4 ó 6, en donde el polipéptido posee una longitud de 502 aminoácidos, conteniendo el polipéptido en la posición 428 cualquier aminoácido
    - 10 1.1.1 proteínogénico, exceptuada glicina, en un medio a una temperatura deseada, empleándose como fuente de carbono, en esencia, glicerol o, en esencia, glicerol y uno o más de los azúcares seleccionados del grupo de glucosa, sacarosa y fructosa, y
    - 1.1.2 acumulación en el caldo de fermentación del L-aminoácido producido.
  - 1.2 acumulación en el caldo de fermentación del L-aminoácido producido.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el aminoácido proteínogénico en la posición 428 es ácido L-glutámico, ácido L-aspartico, L-isoleucina, L-histidina, L-triptófano o L-fenilalanina.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que en el caso del aminoácido proteínogénico en la posición 428 se trata de ácido L-aspartico.
- 20 4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el polipéptido codificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO: 6, incluido el intercambio de aminoácidos mencionado en la posición 428, teniendo la secuencia de aminoácidos adicionalmente una o varias de las características elegidas del grupo uno o a lo sumo 10 intercambios de aminoácidos conservativos, una prolongación en el extremo C de uno hasta a lo sumo 20 aminoácidos.
- 25 5. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el polipéptido codificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO: 6, incluido el intercambio de aminoácidos mencionado en la posición 428.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 4 ó 5, caracterizado por que el polipéptido codificado comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, incluido el intercambio de aminoácidos mencionado en la posición 428.
7. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que para la preparación de los L-aminoácidos se fermentan microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en los que adicionalmente se debilita al mismo tiempo el gen glpR que codifica el represor del regulón glp.
- 35 8. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que para la preparación de los L-aminoácidos se fermentan microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en los que se refuerzan, en particular sobre-expresan, al mismo tiempo uno o más de los genes seleccionados del grupo:
  - 40 a) el gen glpA que codifica la subunidad grande de la sn-glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (anaerobia),
  - b) el gen glpB que codifica la subunidad para el anclaje a membrana de la sn-glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (anaerobia),
  - 45 c) el gen glpC que codifica la subunidad pequeña de la sn-glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (anaerobia),
  - d) el gen glpD que codifica la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (aerobia),
  - 50 e) el gen glpE que codifica la azufre-transferasa,
  - f) el gen glpF que codifica el facilitador del glicerol GlpF,
  - g) el gen glpG,
  - 55 h) el gen glpQ que codifica la glicerolfosfodiesterasa periplasmática,
  - i) el gen glpT que codifica la glicerol-3-fosfato-permeasa,
  - 60 j) el gen glpX que codifica la fructosa-1,6-bisfosfatasa II,
  - k) el gen tpiA que codifica la triosafofosfato-isomerasa,

- l) el gen *gldA* que codifica la glicerol-deshidrogenasa (NAD-dependiente),
  - m) el gen *dhaK* que codifica el dominio N-terminal de la dihidroxiacetona-quinasa,
  - 5 n) el gen *dhaL* que codifica el dominio C-terminal de la dihidroxiacetona-quinasa,
  - o) el gen *dhaM* que codifica la subunidad de la proteína PTS de la dihidroxiacetona-quinasa,
  - 10 p) el gen *dhaR* que codifica el activador del operón *dha*,
  - q) el gen *fsa* que codifica la fructosa-6-fosfato aldolasa I, y
  - r) el gen *talC* que codifica la fructosa-6-fosfato aldolasa II.
- 15 9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que en el caso de los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae se trata de un microorganismo seleccionado de los géneros *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*.
- 20 10. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que como fuente de carbono se emplea esencialmente glicerol.
- 25 11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que como fuente de carbono se emplea esencialmente glicerol y uno o varios de los azúcares seleccionados del grupo de glucosa, sacarosa y fructosa, ascendiendo la proporción de glicerol a al menos 10%.
- 30 12. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que se trata de un procedimiento por lotes, un procedimiento por lotes alimentados, un procedimiento por lotes alimentados repetidos o un procedimiento continuo.
13. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que se purifica y aísla el L-aminoácido deseado.
14. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que se obtiene un producto con contenido en L-aminoácidos, en el que los componentes del caldo de fermentación y/o la biomasa permanecen en el producto en su totalidad o en proporciones (> 0 a 100%) del mismo.



Figura 1: Mapa del plásmido pKO3-glpK(G428D)

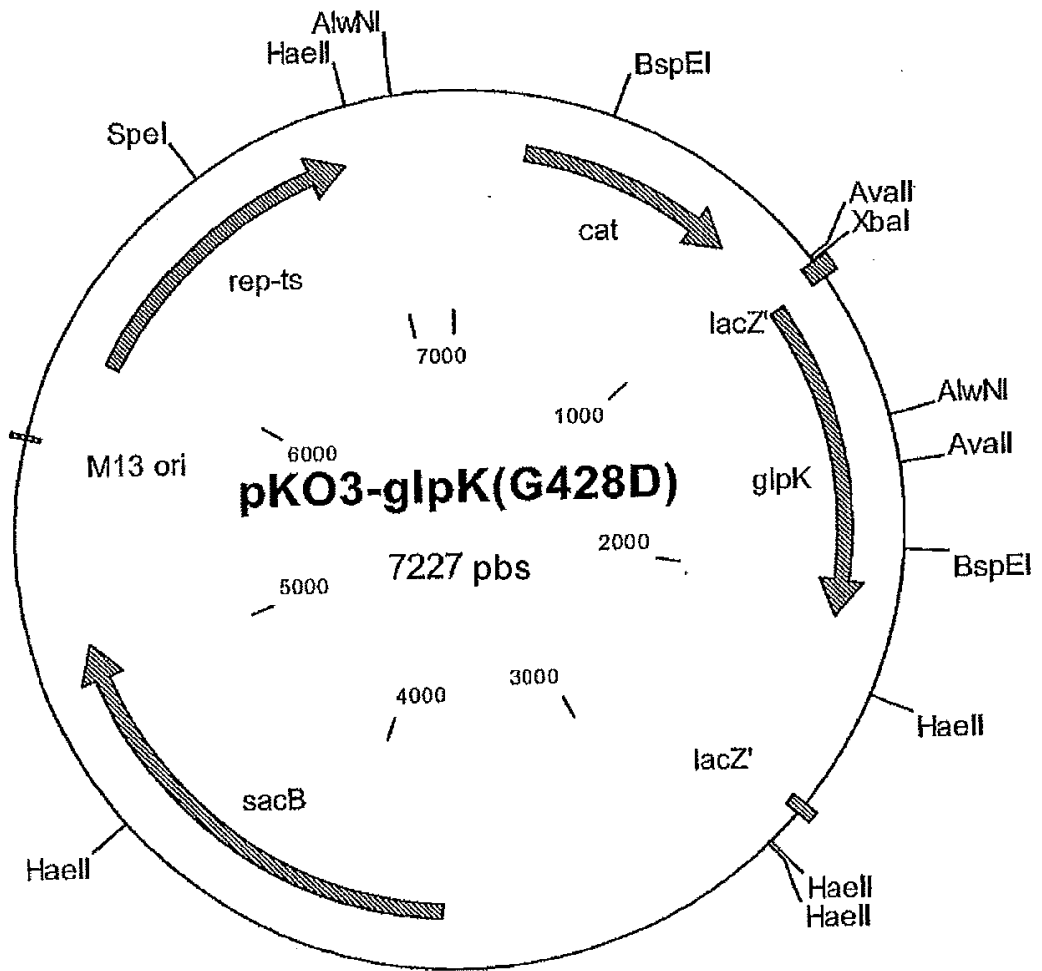


Figura 2: Mapa del plásmido pKO3-glpK(G231D)

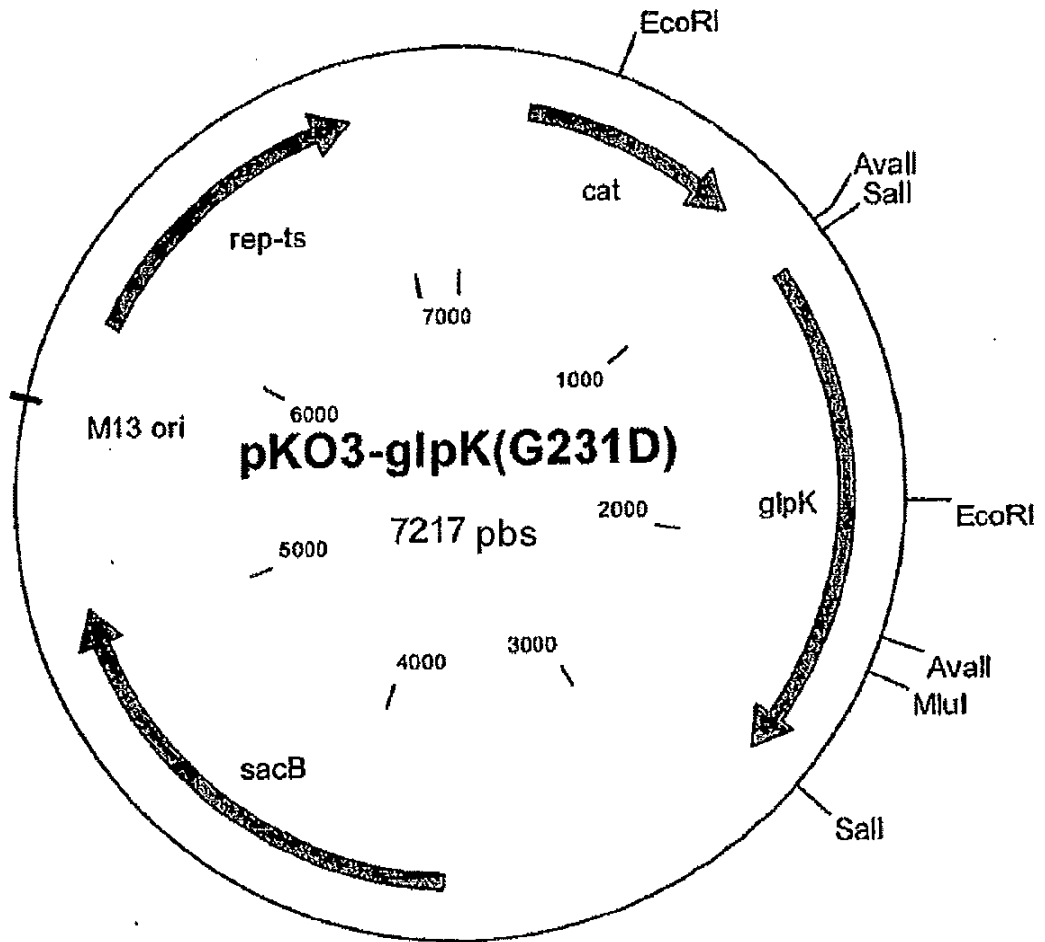


Figura 3: Mapa del plásmido pMU91

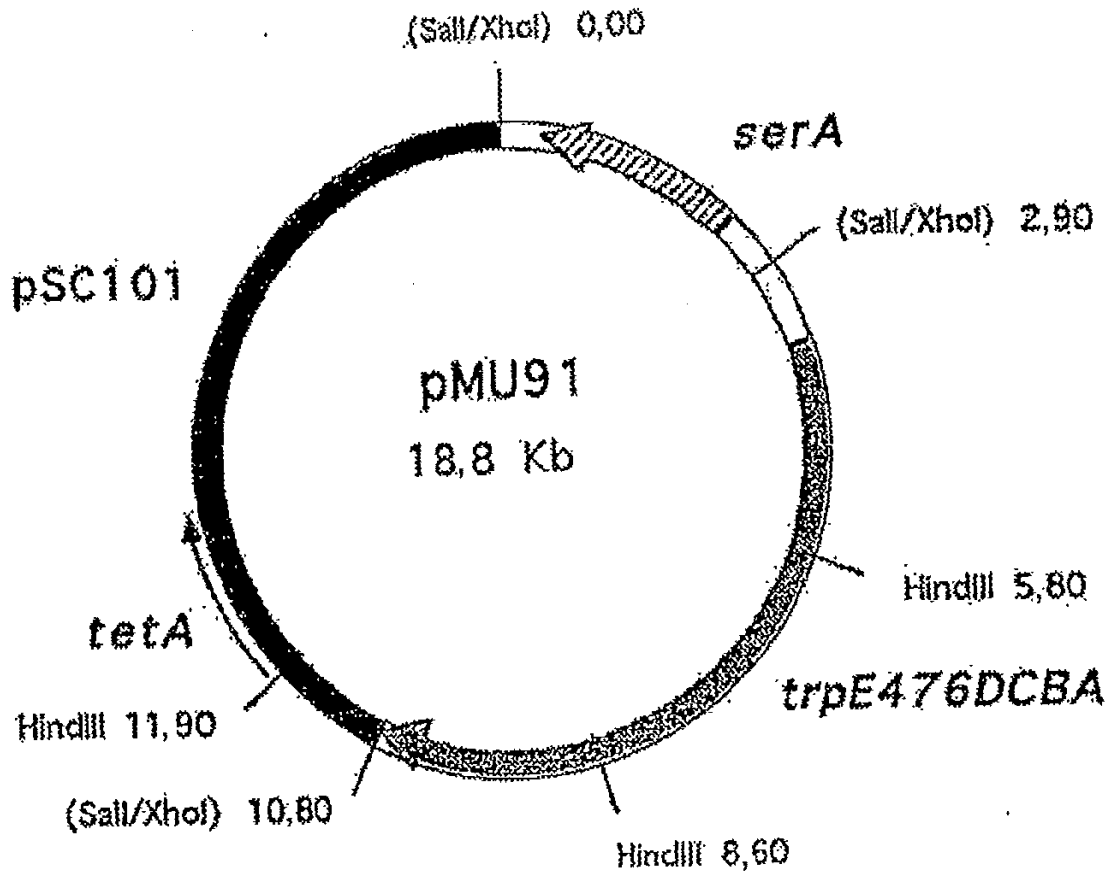


Figura 4: Mapa del plásmido pMW218glpK

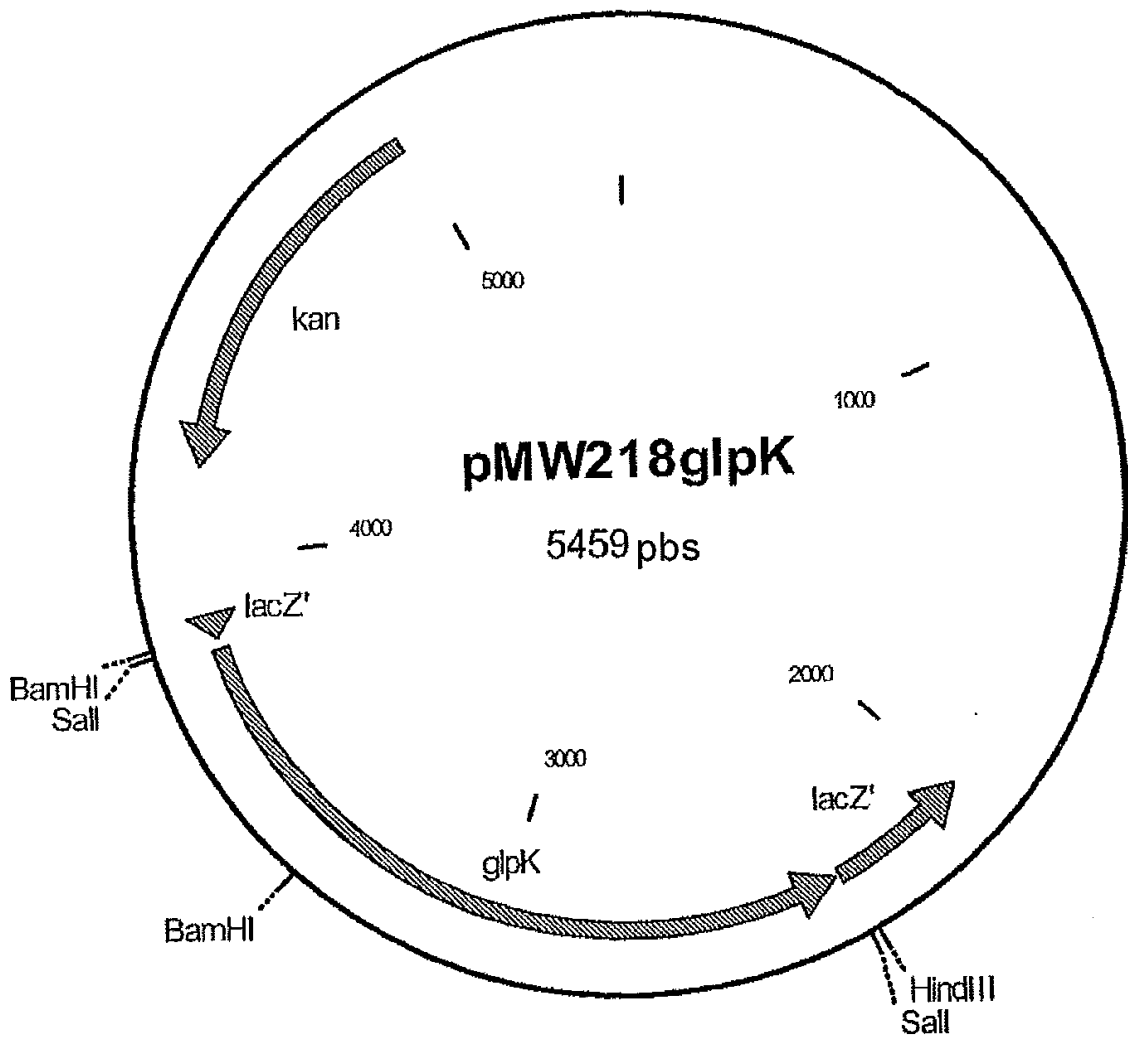


Figura 5: Mapa del plásmido pMW219glpK (G428D)

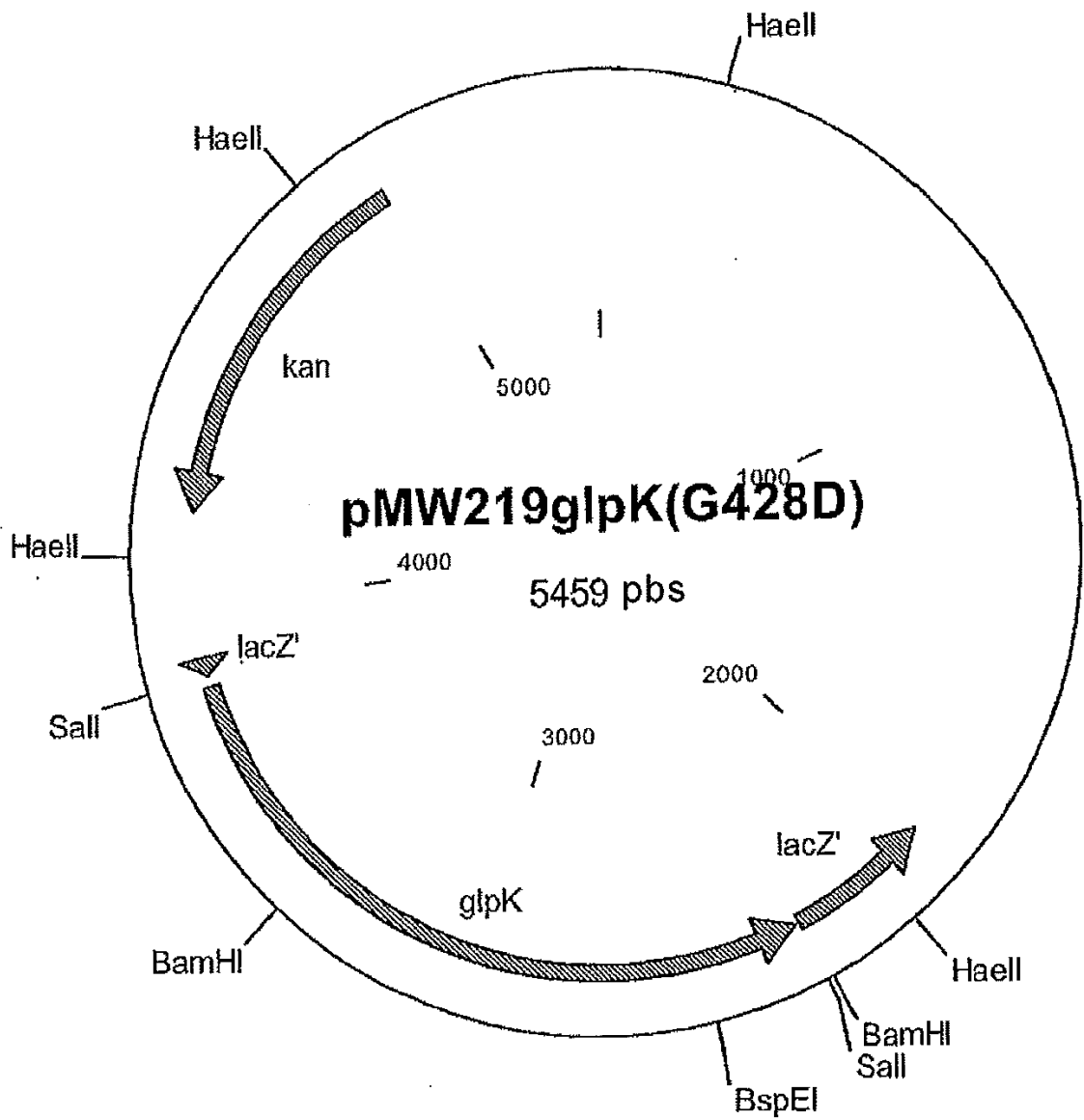


Figura 6: Mapa del plásmido pMW219glpK (G231D)

