

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 405**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/08** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12N 1/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2009 PCT/GB2009/001265**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2009 WO09141607**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2009 E 09750085 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2297329**

54 Título: **Método de producción de L-lisina**

30 Prioridad:

**20.05.2008 GB 0809169**

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

**25.07.2017**

73 Titular/es:

**SINVENT AS (100.0%)  
Postboks 4764 Sluppen  
7465 Trondheim, NO**

72 Inventor/es:

**BRAUTASET, TRYGVE;  
JAKOBSEN, OYVIND, MEJDELL y  
ELLINGSEN, TROND**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 626 405 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

Método de producción de L-lisina

5 La presente invención se refiere a métodos de producción microbiana de L-lisina a partir de metanol y otros sustratos, y particularmente mejorando la producción de L-lisina a partir de tales sustratos. En particular, los métodos de la invención implican una sobreexpresión de una enzima aspartoquinasa III (AKIII) en el microorganismo productor *Bacillus methanolicus*. Esto puede conseguirse modificando el microorganismo para expresar un gen que codifica AKIII, por ejemplo bajo el control de un promotor que puede ser no nativo (o heterólogo) para ese gen. Por lo tanto, a pesar de que el microorganismo puede expresar naturalmente un AKIII (endógeno), puede expresarse una copia adicional (o más) de ese AKIII, o de otro AKIII, o el microorganismo puede modificarse de otro modo para sobreexpresar AKIII, por ejemplo, por mutagénesis, seguido de una selección apropiada.

15 Los aminoácidos están entre los principales productos de la biotecnología tanto en volumen como en valor, y el mercado global está creciendo. Se utilizan como complementos alimenticios y alimentarios, productos farmacéuticos, cosméticos, materiales poliméricos y productos químicos agrícolas (Ikeda (2003) Amino Acid Production Processes In: Faurie et al., (Eds) Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: Volume 79, Microbial Production of L-amino acids. Springer: Berlin, Heidelberg, New York; Marx et al., (2006) Protein line and amino acid-based product family trees. In: Kamm et al., Biorefineries - industrial processes and products. Status quo and future directions. Wiley-VCH: Weinheim pp. 201-216). La fermentación microbiana es el método dominante utilizado para la producción industrial, y hoy en día los microorganismos más importantes utilizados son *Corynebacteria*, que utilizan azúcares. El productor de aminoácidos industrial más importante de la actualidad es la bacteria *Corynebacterium glutamicum*, que produce aproximadamente 2 millones de toneladas de aminoácidos por año, por encima de 1 y 0.6 millones de toneladas de L-glutamato y L-lisina, respectivamente (Eggeling et al., (2005), Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. Taylor and Francis: Boca Raton). El sustrato para la fermentación de *C. glutamicum* es generalmente azúcar de cultivos agrícolas.

30 Existe una creciente demanda global de aminoácidos, y las posibilidades de utilizar sustratos alternativos como materia prima en la fermentación es también de interés considerable. Los compuestos de un átomo de carbono (C<sub>1</sub>) se producen abundantemente en toda la naturaleza, y el metano y el metanol son dos de los compuestos C<sub>1</sub> más importantes desde un punto de vista biotecnológico y químico a granel (Linton et al., (1987), Antonie Van Leeuwenhoek, 53: 55-63). En comparación con la melaza, por ejemplo, el metanol es una materia prima pura que se puede utilizar completamente durante las fermentaciones bacterianas.

35 Los metilotróficos comprenden el gran número de microorganismos tanto aeróbicos como anaeróbicos que pueden crecer en compuestos reducidos que carecen de enlaces C-C, tales como metano y metanol (Anthony (1982), The Biochemistry of methylotrophs. Academic Press: New York; Large et al., (1988) Methylotrophy and biotechnology. Wiley: New York). Los metilotrofos obligatorios pueden utilizar exclusivamente compuestos C<sub>1</sub> como fuente única de carbono y energía, mientras que los metilotrofos facultativos pueden utilizar tanto compuestos C<sub>1</sub> como compuestos multicarbonados. Se han establecido herramientas genéticas para muchos metilotrofos y se ha descrito la ingeniería de los metilotrofos que conducen a la sobreproducción de diferentes aminoácidos, incluyendo la L-serina (Izumi et al., (1993) Appl. Microbiol. Biotechnol., 39: 427-432; Hagishita et al. (1996) Biosci Biotechnol. Biochem., 60: 1604 - 1610), L-treonina (Motoyama et al., (1994) Appl. Microbiol. Biotechnol., 42: 67-72), L-glutamato (Motoyama et al., (1993) Biotechnol. Biochem., 57: 82-87) y L-lisina (Motayama et al., (2001) Appl. Environ. Microbiol., 67: 3064-3070). Por ejemplo, en el metilotrófico obligatorio Gram-negativo *Methylophilus methylotrophus*, la expresión de un gen mutante que codifica la dihidrodipicolinato sintasa desregulada en la inhibición de L-lisina provocó una síntesis aumentada de L-lisina a aproximadamente 1 g/l a 37°C (Tsujimoto et al. (2006) J. Biotechnol., 124: 327-337). Mediante la coexpresión de un gen mutante que codifica un transportador de L-lisina, se obtuvo una cepa recombinante AS1 (pSEA10), que secreta 11.3 g/l de L-lisina a partir de metanol (Gunji et al., J. Biotechnol. 127(1): 1-13). Se informó que un mutante recombinante, AL119 (pDYOM4-2), del metilotrófico obligado Gram-negativo *Methylobacillus glycozenes*, que sobreexpresa una dihidrodipicolinato sintasa parcialmente desregulada en la inhibición de la L-lisina, produce aproximadamente 8 g/l de L-lisina y 37 g/l de 1-glutamato a partir de metanol a 37°C (Motayama et al., (2001), supra). No obstante lo anterior, actualmente no se cree que exista un proceso de producción industrial basado en metanol comercial para cualquier aminoácido.

55 La bacteria termotolerante metilotrófica *B. methanolicus* puede representar un candidato prometedor para la bioconversión de metanol en aminoácidos (Brautaset et al., (2007) App. Microbiol., 74: 22-34). Las propiedades favorables de *B. methanolicus* incluyen la falta de esporulación a altas temperaturas, la utilización de metanol como fuente de energía y carbono, una alta tasa de conversión de metanol y una temperatura óptima de crecimiento de 50°C. Se ha informado que los mutantes de *B. methanolicus* producidos por mutagénesis química aleatoria producen hasta 37 g/l de L-lisina (Schendel et al., (1990) Appl. Environ. Microbiol., 56: 963-970). Aunque el metanol puede representar un sustrato atractivo, *B. methanolicus* puede utilizar otros sustratos incluyendo sustratos de carbono múltiples tales como azúcares (por ejemplo manitol). Por consiguiente, *B. methanolicus* tiene interés como "huésped" u organismo para la producción de L-lisina, independientemente del sustrato (es decir, no necesariamente usando metanol como sustrato).

La L-lisina se sintetiza a partir de L-aspartato como parte de la ruta aspartato que también incluye las rutas biosintéticas para L-metionina y L-treonina (Figura 1). El primer paso de la ruta de aspartato es controlado por aspartoquinasa ("AK", ATP: 4-L-aspartato-4-fosfotransferasa). Esta enzima está generalmente regulada fuertemente por la retroalimentación de los productos de la ruta del aspartato, tanto con respecto a la actividad enzimática (inhibición) como a la síntesis enzimática (represión). Se ha informado que la desregulación de AK (es decir, la eliminación de la inhibición de la actividad enzimática) es el paso más importante en el desarrollo de cepas productoras de L-lisina comercial (Pfefferle et al., (2003) *Biotechnological manufacture of lysine*. In: Faurie et al., (Eds) *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: Volume 79, Microbial Production of L-amino acids*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York, pp. 59-112), y se ha afirmado que la ingeniería metabólica sigue mejorando L-lisina de *B. methanolicus* debe centrarse en la desregulación de enzimas clave en la ruta de biosíntesis de L-lisina (Brautaset et al., (2007) *supra*). De hecho, se han descrito varias mutaciones favorables que provocan la desregulación de la inhibición de retroalimentación de AK (es decir, resistencia a la inhibición alostérica) en el productor comercial de L-lisina *C. glutamicum* (Ohnishi et al., (2002) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58: 217-223, Eggeling et al., (2005) *supra*, Jakobsen et al., (2006) *J. Bacteriol.*, 188 (8): 3063-3072; Cremer et al., (1991) *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(6): 1746-1752; Jetten et al., (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43(1): 76-82).

Aunque *C. glutamicum* tiene una única enzima AK, se sabe que la bien estudiada *B. subtilis* posee tres isoenzimas AK, AKI, AKII y AKIII. En general, se ha prestado poca atención a los estudios de los efectos de las manipulaciones que implican AK sobre la producción de L-lisina en *B. subtilis*. El análogo de L-lisina S-(2-aminoetil) cisteína (AEC) se ha utilizado ampliamente para generar sobreproductores microbianos de L-lisina, mediante mutagénesis clásica seguida de selección. Aunque se demostró una disminución de la inhibición de retroalimentación de AKI y AKII en *B. subtilis*, no se informó producción mejorada de L-lisina (Zhang et al., (1990) *J. Bacteriol.*, 172(8): 4690-4693). Las mutaciones en algunos mutantes de *B. subtilis* resistentes a AEC se mapearon al líder de ARN no traducido 5' de lysC (que codifica AKII), y se correlacionaron con una represión disminuida y un aumento en la producción de L-lisina. Sin embargo, no se ha descrito una producción significativa de L-lisina (no se ha reportado superior a 1 g/l por tales mutantes) (Vold et al., (1975) *J. Bacteriol.*, 121(3): 970-974). Los inventores no tienen conocimiento de ningún informe que describa mutaciones en AKIII en *B. subtilis* que conduzcan a una mayor producción de L-lisina.

Hasta ahora, en *B. methanolicus* sólo se conocía la codificación de AKII por lysC (Schendel et al., (1992) *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (9): 2806-2814). La presente invención ha sido facilitada por la clonación y secuenciación por parte de los presentes inventores de los genes que codifican AKI (dapG) y AKIII (yclM) de *B. methanolicus*, como se describe con más detalle a continuación.

Como se discutió anteriormente, los esfuerzos para aumentar la producción microbiana de L-lisina se han concentrado principalmente en la desregulación de AK usando mutantes AK resistentes a la inhibición alostérica por productos de la ruta. No se han reportado casos de uso exitoso de AK de tipo salvaje en aumentar significativamente la producción de L-lisina. Cuando el gen de *C. glutamicum* que codifica AK de tipo salvaje se expresó a partir de un plásmido en *C. glutamicum*, no se produjo L-lisina. Sin embargo, la Lisina se produjo en un *C. glutamicum* transformado con un plásmido que expresaba un AK mutante, resistente a la retroalimentación, lo que sugiere que en el primer caso la sensibilidad a la retroalimentación del AK de tipo salvaje era responsable de la falta de producción de L-lisina (Cremer et al., (1991), *supra*). En otro estudio, los plásmidos portadores de *C. glutamicum* de los que el gen codificador de AK de tipo salvaje se expresa a partir de un promotor heterólogo fue incapaz de crecer en un medio definido (Koffas et al., (2003) *Metab. Eng.*, 5(1): 32-41). En experimentos que implican la sobreexpresión del gen codificadora de *C. glutamicum* de tipo salvaje (pero referido como *B. flavum*) de su promotor nativo, mientras que se observó un aumento de 33% en la producción de L-lisina en un resistente a AEC, una cepa de *C. glutamicum* superproductora de L-lisina, no se informó aumento alguno cuando se usó una cepa de tipo salvaje (Lu et al., (1994) *Biotechnol. Lett.*, 16(5): 449-454). Se observó un aumento del 20% en el flujo de síntesis de L-lisina cuando se sobreexpresó un gen que codificaba un AK resistente a la retroalimentación en una cepa de *C. glutamicum* que expresaba nativamente un AK sensible a la retroalimentación de tipo salvaje (Hua et al., (2000) *J. Biosc Bioeng.*, 90(2): 184-192). Por lo tanto, se creía previamente que, de acuerdo con la opinión anteriormente mencionada en la técnica, de que la desregulación de AK es la etapa más importante en el desarrollo de cepas sobreexpresoras de L-lisina, la sobreexpresión de AK de tipo salvaje no sería suficiente para lograr una reducción significativa en la producción de L-lisina debido, por ejemplo, a los efectos inhibitorios de retroalimentación de los productos de ruta sobre la actividad de la enzima AK. Como se mencionó anteriormente, a pesar de que se produjo una represión reducida, no se demostró una producción alta de L-lisina para los mutantes resistentes a AEC de *B. subtilis* en los que las mutaciones se correlacionaron con la 5' UTR de lysC (que codifica AKII) (Vold et al., (1975) *supra*, Mattioli et al., (1979) *J. Gen. Microbiol.*, 114: 223-225).

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado ahora que la sobreexpresión de un gen yclM que codifica AKIII da lugar a un aumento significativo de la producción de L lisina. Significativamente, este resultado se puede lograr usando un gen que codifica una enzima de tipo salvaje, que es una enzima que está sujeta a la inhibición de retroalimentación. Mediante la sobreexpresión de yclM mediante la expresión de un gen yclM (es decir, un gen yclM introducido exógenamente) usando un promotor fuerte, no nativo del gen AKIII, se ha logrado un aumento de 60 veces en la producción de L-lisina, sin necesidad de utilizar un mutante de AKIII resistente a la inhibición de la retroalimentación. No se observó un aumento tan significativo con AKI (dapG) o AKII (lysC), con lo que se observaron aumentos mucho menores en la producción de L-lisina (2 veces y 10 veces, respectivamente). El

efecto es, por lo tanto, particular para la isoforma de AKIII. El efecto de la sobreexpresión de AKIII se demuestra particularmente en *B. methanolicus* incluyendo tanto metanol como sustratos de azúcar. Por lo tanto, se propone que la sobreexpresión de AKIII, sea cual fuere el logro, representa un mecanismo para aumentar la producción de lisina microbiana.

Como se discute más adelante, la presente invención surge en parte de la clonación por parte de los inventores de los genes *yclM* (que codifican AKIII) y *dapG* (que codifican AKI) de *B. methanolicus*. El AKIII de *B. methanolicus* puede usarse para conseguir sobreexpresión tanto en un organismo huésped de *B. methanolicus* como en otros organismos. Se observó un aumento particularmente notable en la producción de L-lisina cuando se sobreexpresó *B. methanolicus* AKIII de tipo salvaje a partir de un promotor no nativo fuerte en *B. methanolicus* de tipo salvaje. Es sorprendente que la sobreexpresión de un solo gen (*yclM*) pueda lograr este efecto; el aumento puede observarse en un huésped de tipo salvaje que no contiene otras modificaciones o mutaciones de relevancia para la ruta de producción de L-lisina. Este es el primer informe de la expresión de la isoforma de AKIII en particular para incrementar la producción de L-lisina y la exitosa sobreexpresión de cualquier gen en *B. methanolicus* para aumentar la producción de L-lisina.

La magnitud del aumento que se puede obtener, por ejemplo hasta 60 veces, como se observa en un huésped de tipo salvaje, es sorprendente y no podría haber sido predicho. Antes de la presente invención, se alcanzaron incrementos en la producción de L-lisina de sólo 33% y 20% (es decir, menos de 1.5 veces) en *C. glutamicum*.

Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de un gen AKIII da como resultado un aumento mayor de magnitud en la producción de L-lisina, que no podría haber sido previsto. La presente invención sería, por tanto, claramente de gran valor para ayudar a satisfacer la creciente necesidad de L-lisina. En particular, se puede utilizar *B. methanolicus* de manera beneficiosa como huésped para producir L-lisina, usando tanto metanol como otros sustratos (es decir, otras fuentes de carbono tales como azúcares) como materia prima.

Un método para producir L-lisina en *B. methanolicus* puede comprender la sobreexpresión de una enzima AKIII en dicho *B. methanolicus*. La enzima AKIII puede definirse como una enzima que tiene actividad AK que está codificada por un gen *yclM*.

Visto alternativamente, un método para aumentar la producción de L-lisina en *B. methanolicus* puede comprender la sobreexpresión de una enzima AKIII en dicho *B. methanolicus*. La presente invención proporciona un método para producir L-lisina en *B. methanolicus*, comprendiendo dicho método introducir en dicho *B. methanolicus* una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima AKIII, de manera que se sobreexpresa una enzima AKIII, en la que dicha secuencia nucleotídica

(i) es todo o parte de una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO. 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con SEQ ID NO. 3 (o más particularmente al menos 77, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 95, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3) o una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de SEQ ID NO. 3 bajo condiciones de alta restricción (0.1x SSC, SDS al 0.1%, 65°C, y condiciones de lavado: SSC 2x, SDS al 0.1%, 65°C, seguido por 0.1 x SSC, SDS al 0.1%, 65°C) o una secuencia de nucleótidos que está degenerada con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 3;

(ii) codifica todo o parte de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 4 o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 (o más particularmente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 4).

En los métodos de la invención, el *B. methanolicus* se cultiva o crece utilizando cualquier fuente de carbono deseable como sustrato, incluyendo, pero sin limitarse a, metanol, bajo condiciones en las que se puede producir lisina. Se usa una célula huésped de *B. methanolicus* que ha sido modificada para expresar excesivamente AKIII (por ejemplo, manipulada de tal manera que se sobreexpresa AKIII en la célula huésped, introduciendo en una célula huésped de *B. methanolicus* un gen que codifica una enzima AKIII). El método de la invención puede así, en una realización, comprender cultivar o cultivar una célula huésped de *B. methanolicus* que contiene un gen que codifica AKIII introducido exógenamente (es decir, un *B. methanolicus* que se transforma con un gen que codifica AKIII), y más específicamente un gen *yclM*. La presente invención también proporciona un microorganismo de *B. methanolicus* que sobreexpresa una enzima AKIII en la que dicho *B. methanolicus* ha sido modificado introduciendo una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima AKIII, en la que dicha secuencia nucleotídica

(i) es total o parcialmente una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO. 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con SEQ ID NO. 3 (o más particularmente al menos 77, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 95, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3) o una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de SEQ ID NO. 3 bajo condiciones de alta restricción (0.1x SSC, SDS al 0.1%, 65°C, y condiciones de lavado: SSC 2x, SDS al 0.1%, 65°C, seguido por 0.1 x SSC, SDS al

0.1%, 65°C) o una secuencia de nucleótidos que está degenerada con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 3; o

(ii) codifica todo o parte de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 4 o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 (o más particularmente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4).

Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona un organismo de *B. methanolicus* que sobreexpresa una enzima AKIII.

Más particularmente, este aspecto de la invención proporciona un organismo de *B. methanolicus* que ha sido modificado para sobreexpresar una enzima AKIII introduciendo en dicho organismo un gen (o dicho de forma más general, una molécula de ácido nucleico) que codifica una enzima AKIII, más específicamente un gen yclM.

La enzima AKIII usada en la presente invención es como se define en las reivindicaciones. Sin embargo, las enzimas AKIII son conocidas o están disponibles a partir de otras fuentes, incluyendo tanto las enzimas conocidas que se conocen en la bibliografía como las enzimas aún desconocidas clonadas a partir de una fuente deseada, y la referencia a AKIII incluye cualquier enzima que tenga la función o actividad de *B. methanolicus* AKIII o cualquier enzima que se considera que corresponde homológamente a *B. methanolicus* AKIII sobre la base de la identidad o similitud de la secuencia de aminoácidos, o en virtud de la identidad o similitud de la secuencia de ácido nucleico que codifica para yclM de *B. methanolicus*. En un aspecto, la enzima AKIII es una enzima que tiene actividad AK que está codificada por un gen yclM. Por lo tanto, el AKIII de *B. methanolicus* puede usarse como se detalla a continuación, incluyendo tanto el AKIII/yclM nativo ("tipo salvaje") de *B. methanolicus* como se expone en las SEQ ID Nos 3 y 4 o las secuencias AKIII/yclM que son funcionalmente equivalente a SEQ ID NO: 3 y/o 4, por ejemplo, secuencias que son homólogas a la misma (por ejemplo, expresadas por el % de similitud de secuencia o identidad como se expone a continuación) y representan o codifican un polipéptido que tiene actividad de AKIII. Esto incluye "variantes" de yclM/AKIII, por ejemplo, que codifican o son proteínas mutantes que retienen actividad AKIII, por ejemplo, mutantes de retroalimentación resistentes a la inhibición de AKIII. Resultará evidente que, si bien la actividad de la aspartoquinasa es un requisito previo de la proteína sobreexpresada de acuerdo con la invención, pueden obtenerse ventajas en términos del grado de aumento en la producción de L-lisina mediante el uso de secuencias de proteínas AKIII de tipo no salvaje que tienen propiedades alteradas pero que retienen actividad AK, por ejemplo, mutantes resistentes a la inhibición de retroalimentación de AKIII. Así, aunque una ventaja sorprendente de la invención es que se puede obtener un aumento inesperado en la producción de L-lisina por sobreexpresión de una secuencia de AKIII de tipo salvaje, a saber, un AKIII que tiene las características funcionales de un AKIII de tipo salvaje y más particularmente un AKIII que es sensible a la inhibición de la retroalimentación (por ejemplo, por un producto de la ruta aspartato, por ejemplo lisina y/o treonina, etc.), puede ser deseable aumentar este efecto mediante el uso de "variantes" AKIII particulares, por ejemplo una variante que es resistente a la inhibición de la retroalimentación. Se puede obtener un AKIII o derivar de cualquier organismo apropiado, más particularmente un organismo microbiano o bacteriano y en particular de un *Bacillus*. Un AKIII representativo puede obtenerse o derivarse de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. amyloliquefaciens* o *Listeria innocua* (véase por ejemplo el AKIII de *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* str., 168, como se describe en Kunst et al., 1997, Nature, 390, 249-256 (número de acceso a GenBank: NC\_000964) (SEQ ID NO: 5); *Bacillus licheniformis* ATCC 14580 (DSM 13) como se describe en Rey, et al., 2004, Genome Biol., 5, R77 (número de acceso de GenBank: NC\_006270) (SEQ ID NO: 6); *Bacillus halodurans* C-125 como se describe en Takami et al., 2000, Nucleic Acids Res., 28, 4317-4331 (número de acceso a GenBank: NC\_002570) (SEQ ID NO: 7), *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 como se describe en Chen, et al., 2007, Nat. Biotechnol., 25, 1007-1014 (número de acceso a GenBank: CP000560) (SEQ ID NO: 8) o *Listeria innocua* Clip112b2 como se describe en Glaser et al., 2001, Science 294, 849-852 (número de acceso a GenBank: AL596172) (SEQ ID NO: 9) (SEQ ID NO: 9). Se observará que los números de acceso de GenBank que se citan más arriba son para el genoma completo y, en consecuencia, en términos de referencia a las secuencias de AKIII, se hace referencia particularmente a las partes que codifican AKIII, a saber, los genes codificadores de AKIII o las secuencias de nucleótidos contenidas en los depósitos de GenBank.

Un AKIII "derivado de" un AKIII conocido puede incluir, por ejemplo, una enzima codificada por una variante o fragmento (parte) de ese gen o secuencia de nucleótidos, por ejemplo una variante que tiene al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% o más de identidad de secuencia con la secuencia publicada o con una secuencia depositada. Alternativamente, dicho AKIII puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos publicada/depositada, o con la traducción de aminoácidos de la secuencia de nucleótidos publicada/depositada. Una "parte" de la secuencia de nucleótidos o aminoácidos publicada/depositada puede incluir o comprender al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% o más nucleótidos o aminoácidos contiguos. Más particularmente, puede ser un AKIII que es, o que se deriva de, el *B. methanolicus* AKIII, como se detalla anteriormente o más abajo. Particularmente preferente, el AKIII es de tipo salvaje o sensible a la inhibición de retroalimentación, es decir, no es una enzima desregulada en términos de actividad enzimática. También se prefiere que la enzima AKIII sea termoestable, por ejemplo capaz de funcionar a temperaturas de hasta 40°C, 50°C, 60°C, 70°C u 80°C.

Aunque se utiliza *B. methanolicus* en la presente invención para la producción de lisina, el efecto de la sobreexpresión de AKIII en el aumento de la producción de lisina se puede conseguir en cualquier huésped microbiano.

5 Por lo tanto, un método para producir L-lisina en un microorganismo puede comprender sobreexpresar en dicho microorganismo un gen AKIII endógeno de ese microorganismo o una enzima AKIII definida como sigue:

10 (i) un AKIII codificado por todo o parte de una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO. 3 o por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 50% de identidad con SEQ ID NO. 3 (o más particularmente al menos 55, 60, 65, 70 o 75% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3) o una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de SEQ ID NO. 3 bajo condiciones de alta restricción (0.1x SSC, SDS al 0.1%, 65°C, y condiciones de lavado: SSC 2x, SDS al 0.1%, 65°C, seguido por 0,1 x SSC, SDS al 0.1%, 65°C) o una secuencia de nucleótidos que está degenerada con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 3; o

15 (ii) un AKIII que comprende todo o parte de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 4 o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 (o más particularmente al menos 55, 60, 65, 70, 75 u 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4).

20 Este método es, por tanto, un método en el que el microorganismo deseado que expresa en exceso la enzima AKIII se cultiva o crece utilizando cualquier fuente/sustrato de carbono deseable bajo condiciones en las que se puede producir lisina. El microorganismo puede ser modificado para sobreexpresar AKIII introduciendo en la célula huésped una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos como se ha definido anteriormente, o que codifica un AKIII como se ha definido anteriormente. El microorganismo puede entonces cultivarse o desarrollarse en condiciones en las que se expresa la secuencia de nucleótidos. Un microorganismo que sobreexpresa un gen AKIII endógeno de ese microorganismo o una enzima AKIII puede definirse como sigue:

30 (i) un AKIII codificado por todo o parte de una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO. 3 o por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 50% de identidad con SEQ ID NO. 3 (o más particularmente al menos 55, 60, 65, 70 o 75% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3) o una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de SEQ ID NO. 3 bajo condiciones de alta restricción (0.1x SSC, SDS al 0.1%, 65°C, y condiciones de lavado: SSC 2x, SDS al 0.1%, 65°C, seguido por 0.1 x SSC, SDS al 0.1%, 65°C) o una secuencia de nucleótidos que está degenerada con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 3; o

35 (ii) un AKIII que comprende todo o parte de la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 4 o de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 (o más particularmente al menos 55, 60, 65, 70, 75 u 80% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4).

40 Un microorganismo puede modificarse para sobreexpresar un gen o enzima AKIII como se ha definido anteriormente. Dicha modificación incluye la introducción en dicho microorganismo de una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima AKIII como se ha definido anteriormente.

45 Por lo tanto, tal molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de AKIII y puede comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos que es

(i) una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO. 3;

50 (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 50% de identidad de secuencia, más particularmente al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 77, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 93, 95, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO. 3;

55 (iii) una secuencia de nucleótidos que hibridiza el complemento de SEQ ID NO. 3 en condiciones de hibridación de alta restricción (0.1x SSC, SDS al 0.1%, 65°C, y condiciones de lavado: SSC 2x, SDS al 0.1%, 65°C, seguido por SSC 0.1x, SDS al 0.1%, 65°C);

(iv) una secuencia de nucleótidos que está degenerada con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3;

60 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50% de identidad de secuencia o preferiblemente al menos 50, 60, 65, 70, 75, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 4;

65 (vi) una secuencia de nucleótidos que es una parte de la secuencia de nucleótidos de (i) o (ii) o (iv) o (v).

A continuación se definen adicionalmente partes de las moléculas de ácido nucleico/secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de AKIII.

Por tanto, el microorganismo modificado (o manipulado) para sobreexpresar AKIII puede contener una molécula de ácido nucleico codificadora de AKIII introducida exógenamente como se ha definido anteriormente (el organismo puede transformarse con una molécula de ácido nucleico codificadora de AKIII). La molécula de ácido nucleico puede codificar una enzima AKIII que es homóloga o heteróloga (es decir, nativa o no nativa) a ese huésped. De este modo, puede introducirse una copia adicional (o más) de un gen que es nativo del huésped. La molécula de ácido nucleico que se introduce puede comprender una secuencia de nucleótidos derivada del gen nativo, o de una fuente diferente.

Alternativamente, el AKIII "endógeno" del microorganismo productor puede ser sobreexpresado. Por "endógeno" se entiende el AKIII que se produce como resultado de la expresión del gen que codifica AKIII endógeno en ese microorganismo (es decir, el gen que está presente en ese organismo). Así pues, en este caso no se introduce una molécula de ácido nucleico exógena que codifica el AKIII y sólo se expresa la secuencia génica naturalmente presente en el microorganismo (aunque, por supuesto, puede modificarse por mutagénesis aleatoria o dirigida). Es posible conseguir una sobreexpresión mediante mutagénesis y selección aleatorias -se puede obtener un mutante que sobreexpresa el gen AKIII nativo (cuya secuencia no se modifica o muta)-. Así, los microorganismos que sobreexpresan AKIII pueden modificarse (por ejemplo, por mutación) de tal manera que se logre una sobreexpresión del gen nativo que está naturalmente contenido en el genoma de ese organismo (cuya secuencia puede o no ser modificado). Esto puede ser, por ejemplo, por mutación de elementos reguladores (por ejemplo, promotores u otros elementos de control de transcripción o traducción o proteínas reguladoras, etc.) en el microorganismo, lo que puede conducir, por ejemplo, a una transcripción aumentada del gen nativo de AKIII (por ejemplo, el gen *yclM*) de ese organismo.

Como se discutió anteriormente, el AKIII que está sobreexpresado puede ser una variante de una secuencia salvaje o nativa que incluye un mutante resistente a la inhibición de retroalimentación.

Un microorganismo productor puede ser cualquier microorganismo, eucariótico o procariótico, particularmente una bacteria, por ejemplo de las siguientes clases o géneros: *Bacillus*, *Geobacillus*, *Methanomonas*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Pseudomonas*, *Protaminobacter*, *Methylococcus* y *Listeria*. El género *Bacillus* es de particular interés y puede incluir específicamente, pero no se limita a *B. methanolicus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. halodurans*, *B. sp.* NRRL B-14911 y *B. licheniformis*.

El organismo puede ser termotolerante o termófilo, por ejemplo, capaz de crecer a 50-70° C, por ejemplo 50-60°C.

En la presente invención el microorganismo es, como se ha indicado anteriormente, *B. methanolicus*. El *B. methanolicus* en el que la enzima AKIII se sobreexpresa de acuerdo con la invención puede ser cualquier cepa de *B. methanolicus*. Así, puede ser una cepa de tipo nativo o salvaje o puede ser una cepa modificada o mutante. El *B. methanolicus* puede, por lo tanto, ser de cualquier fondo genético incluyendo por ejemplo auxotróficos o mutantes resistentes a análogos de lisina tales como AEC. Se apreciará fácilmente que la producción de L-lisina puede aumentarse ventajosamente mediante el uso de la invención en un fondo genético particular, por ejemplo en una cepa en la que la producción de L-lisina ya está elevada, por ejemplo en una cepa resistente a AEC o en un mutante de sobreproducción de lisina obtenido por mutagénesis clásica, o que ha sido modificado de otra manera. Sin embargo, como se ha discutido anteriormente, la invención permite de manera beneficiosa el uso de microorganismos de tipo salvaje, específicamente *B. methanolicus* de tipo salvaje como cepa huésped. Las cepas representativas de *B. methanolicus* incluyen *B. methanolicus* MGA3. Otras cepas de tipo *B. methanolicus* incluyen PB1 (NCIMB 13113), NOA2 (Schendel et al., (1990) supra), HEN9, TSL32, DFS2, CFS, RCP, SC6, NIWA, BVD, DGS, JCP, N2 Brautaset et al., (2004) J. Bacteriol., 186 (5): 1229-1238) y mutante de *B. methanolicus* 13A52-8A66 (Hanson et al., (1996). Production of L-lysine and some other amino acids by mutants of *B. methanolicus*. In: Lidstrom et al., Microbial growth on C1 compounds. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht., Países Bajos). Como se ha indicado anteriormente, los mutantes sobreproductores de lisina pueden obtenerse por mutagénesis clásica, como se conoce o se describe en la técnica.

El AKIII también puede ser sobreexpresado en combinación con la expresión o sobreexpresión de otros genes en el microorganismo. Tales otros genes pueden ser otros genes de la ruta de biosíntesis de lisina como se muestra en la Figura 1, por ejemplo *asd*, *dapA*, *lysA*. La producción de lisina puede mejorarse adicionalmente de esta manera, como se muestra en el Ejemplo 2 a continuación.

Como se hace referencia en el presente documento, "sobreexpresar" significa que la expresión del gen que codifica el AKIII se incrementa en comparación con el nivel de expresión que se produce en un microorganismo que no se ha modificado de acuerdo con la invención, por ejemplo el nivel de expresión impulsado desde el locus genómico nativo de AKIII (*yclM*) (por ejemplo, cromosómico) del microorganismo (por ejemplo, *B. methanolicus*) (si es un expresador AKIII nativo), o el nivel de expresión visto en una cepa control, por ejemplo una cepa que ha sido modificada como un control pero que no sobreexpresa el gen AKIII (por ejemplo una cepa que contiene cualquier vector "vacío" o un vector con una secuencia de control). La expresión génica debe considerarse en términos de la cantidad de producto

proteico (enzima AKIII) producida, que puede determinarse mediante cualquier método conveniente conocido en la técnica. Por ejemplo, la expresión puede determinarse midiendo la actividad proteica (es decir, la actividad de la proteína AKIII expresada). Alternativamente, la cantidad de proteína producida puede medirse para determinar el nivel de expresión, por ejemplo inmunoprecipitación Western u otros sistemas de detección de anticuerpos, o incluso por cualquier método de evaluación o cuantificación de proteína. También se puede utilizar PCR en tiempo real. El ensayo puede ser un ensayo *in vivo* o *in vitro*. Por tanto, la expresión (determinada, por ejemplo, mediante la detección de la actividad específica de AKIII) puede ser de 2, 3 o 4 veces o más superior a la que resulta del gen de codificación AKIII nativo (es decir endógeno), pero puede ser menor en otros sistemas o bajo otras condiciones.

La actividad de AKIII se puede determinar ensayando la actividad de la aspartoquinasa mediante procedimientos conocidos en la técnica y descritos en la bibliografía, por ejemplo como se detalla en los Ejemplos siguientes. Por tanto, la actividad de AK de una proteína codificada se puede determinar ensayando la formación de hidroxamato de aspartilo a partir de hidroxilamina como se describe por Black and Wright (Black et al., (1955) J. Biol. Chem., 213: 27-38).

Según la presente invención, la "sobrexpresión" puede significar simplemente que un gen AKIII adicional se expresa en el huésped más allá del gen nativo AKIII (*ycIM*) presente endógenamente en ese huésped pero no se limita a dicho mecanismo. Puede incluir la expresión de un gen AKIII en un organismo en el que no contiene naturalmente tal gen.

Como se define aquí, la sobreexpresión de una enzima AKIII puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, tal como introducir un gen (o poner, más generalmente, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos) que codifica un AKIII, por ejemplo una copia del gen, por ejemplo, expresada a partir de un promotor más fuerte o no regulado con relación al gen nativo, y/o introducir múltiples copias de una molécula/gen de ácido nucleico que codifica AKIII.

La invención en una realización puede proporcionar, por tanto, un método en el que se expresa un gen AKIII que no está sujeto a la represión transcripcional, por ejemplo por un producto de la ruta del aspartato o por un represor del gen AKIII endógeno.

El gen o genes introducidos pueden modificarse para hacer que se libere de la represión transcripcional, por ejemplo mediante la mutación o eliminación de elementos de reconocimiento para los represores transcripcionales o mediante el uso de elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotores) que no están sujetos a regulación transcripcional por el regulador o reguladores transcripcionales que normalmente controlan la expresión del gen AKIII, por ejemplo que controlan la expresión en su situación nativa, por ejemplo, los represores transcripcionales que son productos de la ruta del aspartato. El gen endógeno de codificación de AKIII puede alternativamente o adicionalmente ser modificado de esta manera, o mediante la adición de un promotor más fuerte. Por lo tanto, la mutagénesis (incluyendo tanto aleatoria como dirigida) puede ser utilizada, por ejemplo, para mutar los elementos endógenos de control o reguladores para aumentar la expresión del gen AKIII endógeno (por ejemplo, aumentar la transcripción y/o la traducción). Alternativamente, el organismo puede ser diseñado para introducir elementos reguladores adicionales o alternativos.

En una realización particular, un gen que codifica AKIII puede expresarse a partir de un promotor no nativo o heterólogo (que es un promotor que es heterólogo con el gen que codifica AKIII, es decir, no es el promotor del gen AKIII nativo) y particularmente un promotor fuerte, no nativo o heterólogo. Por tanto, en esta realización el gen que codifica AKIII no se usa con su promotor nativo. Se puede introducir un gen que codifica AKIII que está bajo el control de un promotor no nativo. Como se hace referencia en la presente memoria, un promotor fuerte es uno que expresa un gen a un nivel alto, o al menos a un nivel más alto que el efectuado por su promotor nativo. El término "promotor fuerte" es un término bien conocido y ampliamente utilizado en la técnica y muchos promotores fuertes son conocidos en la técnica o pueden identificarse mediante experimentación rutinaria.

El uso de un promotor no nativo puede tener ventajosamente el efecto de aliviar el gen codificador de AKIII de la represión transcripcional, ya que al menos algunos de los elementos represivos estarán localizados en la región promotora nativa. Al reemplazar el promotor nativo con un promotor no nativo carente de elementos represivos que responden a los efectos de los productos de la vía, el gen que codifica AKIII se aliviará al menos parcialmente de la represión transcripcional.

En una realización preferida, el promotor no nativo es nativo de *B. methanolicus*. Alternativamente, dicho promotor es un promotor de metanol deshidrogenasa (*mdh*).

En una realización particularmente preferida, el promotor no nativo es el promotor de metanol deshidrogenasa (*mdh*) de *B. methanolicus*. Otros promotores funcionales en *B. methanolicus* incluyen cualquiera de los promotores de genes conocidos de *B. methanolicus*. A partir de la secuencia previamente publicada de pBM19 (Brautaset et al., (2004) supra) se han caracterizado experimentalmente los promotores siguientes: *glpX*, *fba*, *pfk*, promotores de *rpe*. A partir de la secuencia publicada anteriormente del operón *hps* + *phi* (Brautaset et al., (2004) supra): promotor *hps*. Para *Bacillus* generalmente se pueden usar promotores de especies estrechamente relacionadas (por ejemplo,

bacilos). Los promotores de otros microorganismos que pueden usarse tanto en *B. methanolicus* como en otros microorganismos son bien conocidos en la técnica y están ampliamente descritos en la literatura.

Alternativamente, un gen AKIII puede expresarse usando un promotor nativo. La invención abarca el uso de *B. methanolicus* que expresa endógenamente un gen AKIII. Se pueden introducir una o más copias adicionales del gen nativo o una variante del mismo o de otro gen AKIII o molécula de ácido nucleico que codifica, y éstas pueden introducirse bajo el control de un promotor nativo o no nativo. Con un promotor nativo puede usarse, por ejemplo, sin embargo, se apreciará que esto puede variar significativamente, dependiendo del sistema preciso utilizado, y del nivel "basal" de la producción de L-lisina. Por lo tanto, puede ser alcanzable un aumento en la producción de L-lisina de 60-, 70-, 80-, 90- o 100 veces, o más. De manera similar, si el nivel basal de la producción de L-lisina es relativamente alto, por ejemplo en el contexto de un fondo no productor de L-lisina, el aumento de repliegues obtenible puede ser menos dramático mientras que permanece prácticamente valioso. Por consiguiente, el aumento de la producción de L-lisina puede ser del orden de 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 12-, 15-, 20-, 25, 30, 40 o 50 veces o más.

Como se mencionó anteriormente, se puede obtener un aumento en la producción de L-lisina de hasta 60 veces o más por sobreexpresión de *B. methanolicus* AKIII de tipo salvaje a partir del promotor mdh de *B. methanolicus* en un huésped *B. methanolicus* de tipo salvaje. En relación con un control que carece del constructo AKIII exógeno. Sin embargo, se apreciará que esto puede variar significativamente, dependiendo del sistema preciso utilizado, y del nivel "basal" de la producción de L-lisina. Por lo tanto, puede ser alcanzable un aumento en la producción de L-lisina de 60-, 70-, 80-, 90- o 100 veces, o más. De manera similar, si el nivel basal de la producción de L-lisina es relativamente alto, por ejemplo en el contexto de un fondo no productor de L-lisina, el aumento de repliegues obtenible puede ser menos dramático mientras que permanece prácticamente valioso. Por consiguiente, el aumento de la producción de L-lisina puede ser del orden de 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 12-, 15-, 20-, 25, 30, 40 o 50 veces o más.

Por lo tanto, la presente invención permite obtener altos aumentos en la producción de lisina, particularmente cuando se usa un huésped de tipo salvaje donde pueden observarse aumentos particularmente altos. También se ha encontrado sorprendentemente que la L-lisina se produce exclusivamente cuando se sobreexpresa en un microorganismo AKIII, en particular el AKIII de *B. methanolicus* como se describe aquí, (o de hecho AKI o AKII). Esto se demuestra en los Ejemplos a continuación en *B. methanolicus* usando el gen AKIII de *B. methanolicus* (yclM). Como la L-treonina y la L-metionina también se producen por la ruta de L-aspartato, la única síntesis de L-lisina por los métodos de la invención fue inesperada y no pudo predecirse antes de la invención. Sin desear estar limitado por la teoría, una posible explicación para el aumento sorprendentemente alto de la producción de L-lisina de acuerdo con la invención es que el AKIII, particularmente el AKIII de *B. methanolicus*, puede requerir L-lisina y L-treonina para la inhibición de la retroalimentación. Se ha informado que AKIII en *B. subtilis* requiere tanto L-lisina como L-treonina para inhibición de retroalimentación (Schendel et al., (1992) supra). Mientras que *B. methanolicus* AKIII no ha sido purificado y caracterizado bioquímicamente, y por lo tanto no puede afirmarse con certeza que este es el caso, y si es entonces en vista de la observación sorprendente que la L-lisina se produce exclusivamente por sobreexpresión de la *B. Methanolicus* AKs, incluyendo AKIII, puede ser que no se produzca la inhibición de retroalimentación a pesar del uso de un gen yclM de tipo salvaje.

Los métodos para introducir genes o moléculas de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica y están ampliamente descritos en la bibliografía y puede usarse cualquier método deseado. El gen (molécula de ácido nucleico) puede ser introducido usando un vector, que puede ser un vector de replicación autónoma o un vector que permita integrar el gen (molécula de ácido nucleico) en el genoma del huésped (por ejemplo, el cromosoma). El gen (molécula de ácido nucleico) que se ha de expresar puede introducirse así en un vector de expresión y el vector de expresión puede entonces introducirse en la célula huésped. Los métodos para construir vectores de expresión y su introducción en células huésped son bien conocidos en la técnica. Convenientemente, el gen que codifica AKIII puede introducirse usando un vector plasmídico y un microorganismo huésped, por ejemplo el *B. methanolicus* huésped, puede transformarse con el plásmido por ejemplo por electroporación. Los métodos para introducir ácidos nucleicos y vectores en microorganismos son bien conocidos y están ampliamente descritos en la bibliografía. La elección del método puede depender del microorganismo utilizado. Como se describe en Brautaset et al., 2007 (supra), se conocen y están disponibles en la técnica métodos para introducir genes en *B. metanolicus* y plásmidos adecuados, etc., para su uso en tales métodos. Se pueden mencionar en particular vectores basados en el plásmido de lanzadera de *E. coli-B.subtilis* pHP13 como se describe por Jakobsen et al., 2006 (supra). También se puede hacer referencia a los plásmidos PDQ503, PDQ507, PDQ508 y PEN1 descritos en Cue et al., 1997 (Appl. Environ. Microbiol., 63: 1406-1420). Como se ejemplifica en el presente documento, en el caso de un huésped de *B. methanolicus*, el plásmido pTB1.9mdh que contiene el gen mdh puede usarse convenientemente como un vector para la introducción del gen bajo el control del promotor mdh.

Con el fin de producir lisina, el huésped *B. metanolicus* modificado de acuerdo con la presente invención puede crecer o cultivarse bajo condiciones que permitan producir lisina usando un sustrato deseado o apropiado. Las células huésped pueden crecer así en presencia del sustrato o fuente, por ejemplo en medio de crecimiento que contiene el sustrato o al que se ha añadido el sustrato. Los métodos y condiciones para el cultivo de *B. metanolicus* se conocen y describen en la técnica y se ejemplifican en el Ejemplo 1 a continuación. El sustrato, o fuente de carbono, que se utiliza para la producción de lisina puede ser cualquier sustrato adecuado de elección y puede depender del microorganismo que se utiliza. Así, los sustratos adecuados pueden ser cualquiera de las fuentes de carbono conocidas y utilizadas en la técnica de hoy, por ejemplo poli- o monosacáridos (por ejemplo glucosa, otros azúcares de hexosa, azúcares de pentosa), ácidos (por ejemplo, acetato), aminoácidos (por ejemplo, glutamato),

compuestos de un carbono (por ejemplo metanol, metano) y materias primas complejas (por ejemplo, melazas, hidrolizados de proteínas). El sustrato se puede proporcionar en forma purificada o "aislada" o como parte de una mezcla cruda, no refinada o parcialmente refinada, por ejemplo un subproducto de otro proceso comercial o industrial. En el caso de un metilotróforo tal como *B. methanolicus*, se puede usar metanol como sustrato. Sin embargo, *B. methanolicus* crece también sobre otras sustancias, tales como azúcares, que pueden usarse, por ejemplo manitol, glucosa, maltosa, ribosa, acetato, glutamato,  $\alpha$ -cetoglutarato (Schendel et al., 1990, supra). A continuación se muestra el uso de manitol como sustrato para *B. methanolicus* diseñado para sobreexpresar AKIII. Se observará que pueden alcanzarse altos niveles de producción de lisina, superando incluso los niveles de lisina alcanzables usando metanol.

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se ha hecho posible en parte por la clonación, por primera vez, por los presentes inventores de los genes que codifican AKIII de *B. methanolicus*, yclM. Los inventores también han clonado por primera vez el gen que codifica AKI de *B. methanolicus*, dapG. Esto no se había logrado previamente, a pesar de los esfuerzos que dieron lugar a la identificación de lysC, que codifica AKII, de *B. methanolicus* (Schendel et al., (1992) supra). La secuencia de ácido nucleico de *B. methanolicus* dapG e yclM se exponen en las SEQ ID NO: 1 y 3, respectivamente, mientras que la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas se muestra en SEQ ID NO: 2 y 4, respectivamente.

Por lo tanto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico, preferiblemente una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica un polipéptido (o proteína) que tiene actividad de AK, o que es el complemento de la misma, que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de:

(i) una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 1 o 3,

(ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, más particularmente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos como se expone En SEQ ID NO: 1,

(iii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia, más particularmente al menos 77, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 95, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia, con una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 3,

(iv) una secuencia de nucleótidos que está degenerada con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 1 o 3;

(v) una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (i) a (vi).

Alternativamente, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico, preferiblemente una molécula de ácido nucleico aislada, que codifica un polipéptido que tiene actividad de AK o que es el complemento de la misma que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se expone en SEQ ID NO: 2 o 4;

(ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, preferiblemente una identidad de secuencia de 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 2;

(iii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% identidad de secuencia, con una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO. 4;

(iv) una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (i) a (iii).

La molécula de ácido nucleico codifica preferiblemente un polipéptido o proteína que es una AKI o una AKIII o una parte de la misma que tiene actividad AK.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico definida en las partes (i)-(iv) o (i) a (iii) anteriores codifica un polipéptido o proteína que tiene o retiene la función o actividad o propiedades de las enzimas AKI y AKIII como lo definen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 y 4.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria e incluyen cualquier longitud de cadena de aminoácidos (es decir, cualquier polímero u oligómero de aminoácidos).

Como se ha indicado anteriormente, en ciertos aspectos la invención abarca el uso de partes o fragmentos funcionales de las secuencias de nucleótidos definidas en la presente memoria, por lo que se entiende partes o fragmentos que codifican una proteína o polipéptido que tiene la misma o sustancialmente la misma actividad que la

5 proteína de longitud completa como se ha definido anteriormente. Los ensayos para determinar si una  
 proteína/polipéptido codificado por dicha parte o fragmento tiene la misma o sustancialmente la misma actividad (por  
 ejemplo, actividad catalítica o enzimática) como el polipéptido/proteína de longitud completa como se ha definido  
 anteriormente incluyen los tratados anteriormente. Normalmente, partes o fragmentos funcionales de moléculas de  
 10 ácido nucleico sólo tendrán pequeñas eliminaciones relativas a la molécula de ácido nucleico de longitud completa,  
 por ejemplo, las eliminaciones de menos de 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos, por ejemplo en el extremo 5' que  
 codifica el extremo N de la proteína, el extremo 3' codifica el extremo C-terminal de la proteína o internamente dentro  
 de la región codificadora, aunque también pueden llevarse a cabo las eliminaciones más grandes, por ejemplo de al  
 15 menos 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 o 700 nucleótidos, o eliminaciones de menos de 60, 70, 80,  
 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 o 700 nucleótidos, si el fragmento tiene la misma o sustancialmente la misma  
 actividad (por ejemplo, actividad catalítica o enzimática) como la proteína de longitud completa como se ha definido  
 anteriormente. La actividad del polipéptido o proteína codificados se puede probar fácilmente para determinar si  
 comparte la misma actividad que el polipéptido o proteína de longitud completa, por ejemplo como se ha expuesto  
 anteriormente.

15 Las partes o fragmentos representativos pueden comprender al menos un 50%, y preferiblemente al menos 60, 70,  
 75, 80, 85, 90 o 95% de nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 1 o  
 3. Por lo tanto, por ejemplo, en el caso de la secuencia yclM de SEQ ID NO: 3, la parte o fragmento puede tener al  
 20 menos 684, 821, 957, 1026, 1094, 1163, 1231 o 1300 nucleótidos de longitud. En el caso de la secuencia dapG de  
 SEQ ID NO: 1, la parte o fragmento puede tener al menos 621, 745, 869, 931, 994, 1056, 1118 o 1178 nucleótidos  
 de longitud. Por lo tanto, los tamaños de parte o fragmento ejemplares incluyen al menos 620, 700, 800, 850, 900,  
 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250 y 1300 nucleótidos.

25 Pueden usarse fragmentos más cortos de la molécula de ácido nucleico de la invención como sondas, por ejemplo  
 para PCR o protocolos de hibridación. Los fragmentos más cortos pueden ser por ejemplo 10-30, 20-25 nucleótidos  
 de longitud. Tales sondas son útiles en protocolos para identificar moléculas de ácido nucleico adicionales que  
 comparten homología con las moléculas de ácido nucleico de la invención.

30 El término "molécula de ácido nucleico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un polímero de ARN o  
 ADN que es de cadena sencilla o doble, incluyendo opcionalmente bases de nucleótidos sintéticas, no naturales o  
 alteradas. Ejemplos de tales polinucleótidos incluyen ADNc, ADN genómico y ARNds, *inter alia*. Preferiblemente, la  
 molécula de ácido nucleico es ADN.

35 Aunque las secuencias de ácido nucleico a las que se hace referencia en la presente memoria comprenden  
 nucleótidos timidina ("t"), se entenderá que la invención también se refiere a secuencias correspondientes en las que  
 la timidina se reemplaza por uridina ("u").

40 La invención incluye, por lo tanto, moléculas de ácido nucleico que son variantes de las moléculas de ácido nucleico  
 de las SEQ ID NO 1 y 3, particularmente variantes funcionalmente equivalentes. Las moléculas de ácido nucleico  
 "variantes" pueden tener así cambios de nucleótidos únicos o múltiples en comparación con las moléculas de ácido  
 nucleico de las SEQ ID NOS. 1 y 3. Por ejemplo, las variantes pueden tener 1, 2, 3, 4, o 5 o más adiciones,  
 sustituciones, inserciones o eliminaciones de nucleótidos.

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona una proteína (o polipéptido) que tiene actividad AK y que  
 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 2 o 4,
- 50 (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, preferiblemente una  
 identidad de secuencia de al menos 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% con una secuencia de aminoácidos como se  
 expone en SEQ ID NO: 2 ; y
- (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, preferiblemente una  
 55 identidad de secuencia de al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% con una secuencia de  
 aminoácidos como establece en la SEQ ID NO: 4.

60 La proteína o polipéptido preferiblemente es un AKI o AKIII o una parte del mismo que tiene actividad de AK. Más  
 particularmente, la parte retiene la función o actividad de las propiedades del AKI o AKIII del que deriva (tal como se  
 define por referencia a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS .2 y 4).

La proteína o polipéptido puede definirse alternativamente con referencia a las secuencias de ácido nucleico que  
 codifican y, como tal, la proteína o polipéptido de la invención puede codificarse por cualquiera de las moléculas de  
 ácido nucleico de la invención, como se ha descrito anteriormente.

65 La invención se extiende a partes funcionales o fragmentos de las moléculas de proteína de longitud completa, por  
 lo que se entiende partes o fragmentos que tienen la misma o sustancialmente la misma actividad que las proteínas

de longitud completa como se definieron anteriormente, es decir, deben considerarse variantes funcionalmente equivalentes. Como se ha indicado en otra parte del presente documento, la propiedad puede probarse de varias maneras de una forma directa. Normalmente, estos fragmentos funcionales sólo tendrán pequeñas eliminaciones con respecto a la molécula de proteína de longitud completa, por ejemplo de menos de 50, 40, 30, 20 o 10 aminoácidos, aunque como se ha indicado anteriormente en relación con moléculas de ácido nucleico, eliminaciones mayores, por ejemplo de hasta 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 aminoácidos o al menos 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 aminoácidos. En todos los casos, los fragmentos deben tener la misma o sustancialmente la misma actividad que las proteínas de longitud completa como se han definido anteriormente, es decir, deben considerarse como variantes funcionalmente equivalentes. Estas eliminaciones pueden estar en el término N, el extremo C o pueden ser eliminaciones internas.

Las partes o fragmentos representativos pueden comprender al menos un 50%, y preferiblemente al menos 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID No. 2 o 4. Así, por ejemplo, en el caso de la secuencia YclM de SEQ ID NO: 4, la parte o fragmento puede tener por lo menos 227, 318, 341, 364, 387, 409 o 432 aminoácidos de longitud. En el caso de la secuencia DapG de SEQ ID NO: 2, la parte o fragmento puede tener al menos 206, 248, 289, 310, 330, 351, 372 o 392 aminoácidos de longitud. Los tamaños de parte o fragmento ejemplares incluyen, por tanto, al menos 200, 220, 230, 250, 300, 330, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420 y 430 aminoácidos.

La proteína de la invención tal como se define anteriormente incluye por lo tanto variantes de las secuencias de las SEQ ID Nos. 2 y 4, por ejemplo, secuencias que tienen ciertos niveles de identidad de secuencia con las secuencias citadas. Tales variantes podrían ser variantes naturales, tales como proteínas o homólogos comparables encontradas en otras especies o más particularmente variantes encontradas dentro de otros microorganismos, (que comparten las propiedades funcionales de la proteína codificada como se define en otra parte en esta memoria).

También pueden generarse sintéticamente variantes de la proteína de origen natural tal como se define en la presente memoria, por ejemplo utilizando técnicas de biología molecular convencionales que son conocidas en la técnica, por ejemplo, técnicas de mutagénesis estándar tales como mutagénesis dirigida o aleatoria (por ejemplo, usando mezcla genética o PCR propensa a error). Tales técnicas de mutagénesis se pueden usar para desarrollar enzimas que tienen propiedades catalíticas mejoradas o diferentes.

También pueden usarse derivados de la proteína como se define en la presente memoria. Por derivado se entiende una proteína como la descrita anteriormente o una variante de la misma que en lugar del aminoácido natural, contiene un análogo estructural de ese aminoácido. También puede producirse la derivación o modificación (por ejemplo, marcaje, glicosilación, metilación de los aminoácidos en la proteína) siempre y cuando la función de la proteína no se vea afectada negativamente.

Por "análogo estructural" se entiende un aminoácido no estándar. Ejemplos de tales aminoácidos análogos no estándar o estructurales que se pueden usar son aminoácidos D, isoésteres amídicos (tales como N-metilamida, amida retroinversa, tioamida, tioéster, fosfonato, cetometileno, hidroximetileno, fluorovinilo, (E)-vinilo, metilnamino, metilenotio o alcanos), L-N metilaminoácidos, D- $\alpha$ -metilaminoácidos, D-N-metilaminoácidos.

La identidad de la secuencia se puede evaluar por cualquier método conveniente. Sin embargo, para determinar el grado de identidad de secuencia entre secuencias, son útiles programas informáticos que hacen múltiples alineaciones de secuencias, por ejemplo Clustal W (Thompson et al., (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680). Programas que comparan y alinean pares de secuencias, como ALIGN (Myers et al., (1988) *CABIOS*, 4: 11-17), FASTA (Pearson et al., 1988) *PNAS*, 85: 2444-2448; Pearson (1990), *Methods Enzymol.*, 183: 63-98) y BLAST con brechas (Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402) también son útiles para este propósito. Además, el servidor Dali del European Bioinformatics institute ofrece alineaciones basadas en estructura de secuencias de proteínas (Holm (1993) *J. Mol. Biol.*, 233: 123-38; Holm (1995) *Trends Biochem. Sci.*, 20: 478-480; Holm (1998) *Nucleic Acid Res.*, 26: 316-9).

Los alineamientos de secuencias múltiples y los cálculos de porcentaje de identidad se pueden determinar usando los parámetros estándar BLAST, (utilizando secuencias de todos los organismos disponibles, matriz Blosum 62, costes de brecha: existencia 11, extensión 1). Alternativamente, se pueden utilizar los siguientes programas y parámetros: Programa: Align Plus 4, versión 4.10 (Sci Ed Central Clone Manager Professional Suite). Comparación de ADN: comparación global, matriz de puntuación lineal estándar, penalización de no coincidencia = 2, penalidad de brecha abierta = 4, penalización de brecha de extensión = 1. Comparación de aminoácidos: comparación global, matriz de puntuación BLOSUM 62.

Una realización adicional de la invención proporciona una construcción que comprende la molécula de ácido nucleico que codifica AKIII aislada de la invención (es decir, el ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 y secuencias relacionadas o derivadas como se ha definido anteriormente) unidas operativamente a un promotor no nativo, particularmente un promotor no nativo fuerte, preferiblemente el promotor mdh de *B. methanolicus*. Opcionalmente, la construcción puede contener adicionalmente uno o más genes, y/o una o más secuencias reguladoras adecuadas. Los otros uno o más genes opcionales pueden estar bajo el control del mismo promotor que la molécula

de ácido nucleico que codifica AKIII de la invención. La una o más de las secuencias reguladoras opcionales pueden ser secuencias reguladoras no nativas.

En el contexto de esta invención, el término "unido operativamente" se refiere a la asociación de dos o más moléculas de ácido nucleico sobre un solo fragmento de ácido nucleico de manera que la función de uno es afectada por la otra. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificadora cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificadora (es decir, la secuencia codificadora está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias de codificación pueden estar operativamente ligadas a secuencias reguladoras en orientación sentido o antisentido.

El término "secuencias reguladoras" se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas corriente arriba (secuencias no codificadoras 5'), dentro o corriente abajo (secuencias no codificadoras 3') de una secuencia codificadora, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN o traducción de la secuencia de codificación asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, operadores, potenciadores y secuencias líderes de traducción. Como se usa en la presente memoria, el término "promotor" se refiere a una secuencia de nucleótidos capaz de controlar la expresión de una secuencia codificadora o ARN. En general, una secuencia codificadora se localiza 3' con respecto a una secuencia promotora. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de nucleótidos sintéticos. Se reconoce además que, puesto que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no han sido completamente definidos, fragmentos de ácido nucleico de diferentes longitudes pueden tener actividad promotora idéntica.

Una realización adicional de la invención proporciona un vector que comprende una molécula o constructo de ácido nucleico como se definió anteriormente.

Más particularmente, pueden construirse vectores que comprenden la molécula de ácido nucleico que codifica AKIII de la invención (o constructo de la invención). La elección del vector puede depender del microorganismo, del método que se utilizará para transformar células huésped, del método que se usa para la expresión de proteínas o de otro uso previsto del vector. El experto en la materia conoce bien los elementos genéticos que deben estar presentes en el vector con el fin de transformar, seleccionar y propagar con éxito células hospedadoras que contienen la molécula o construcción de ácido nucleico que codifica AKIII de la invención. El experto en la materia también reconocerá que diferentes sucesos de transformación independientes darán lugar a diferentes niveles y patrones de expresión y, por tanto, que se deben examinar múltiples eventos para obtener células que muestren el nivel y patrón de expresión deseados. Dicho tamizaje puede realizarse mediante análisis Southern de ADN, análisis Northern de expresión de ARNm, análisis Western de expresión de proteínas, *inter alia*.

La invención proporciona adicionalmente un *B. methanolicus* que contiene una o más de las moléculas de ácido nucleico, constructos o vectores de la invención, particularmente una molécula de ácido nucleico o un vector o construcción que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica AKIII que es por tanto capaz de sobreexpresando AKIII. El huésped *B. methanolicus* contiene endógenamente un ácido nucleico que codifica AKIII de la invención; se manipula genéticamente para alterar la expresión de AKIII. Esto se puede lograr por ejemplo mediante la introducción de una o más copias adicionales del ácido nucleico que codifica AKIII de la invención bajo el control de un promotor no nativo, preferiblemente fuerte. El material genético está presente en el organismo huésped que no está presente en el organismo natural (es decir, el material genético exógeno está presente).

En general, el material genético exógeno se introduce usando el proceso de transformación. La transformación implicará típicamente un plásmido u otro vector que contendrá también un marcador (por ejemplo, un gen) para permitir la identificación de microorganismos transformados con éxito, por ejemplo un gen para la resistencia a antibióticos (por ejemplo contra ampicilina). Otros métodos para seleccionar transformantes son conocidos por el experto en la materia e incluyen el uso de un vector sensible a la luz, un gen lux, que hace que las colonias positivas se iluminen en la oscuridad. Otros vehículos adecuados para la transformación de las bacterias incluyen cósmidos y moléculas de bacteriófagos.

Como se ha indicado anteriormente, los métodos de la invención encuentran utilidad particular en la producción comercial o industrial de L-lisina. En un aspecto preferido, por lo tanto, los métodos para producir L-lisina o para aumentar la expresión de L-lisina se refieren a procesos a escala de producción, es decir, se realizan a escala de producción o a escala industrial, en lugar de un experimento de laboratorio. Los procedimientos pueden ser preferidos en un biorreactor o fermentador, particularmente un biorreactor o fermentador a escala de producción.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes Ejemplos no limitativos, en los que:

La Figura 1 presenta una visión general de la ruta aspartato (Paulus (1993) Biosíntesis de la Familia de Aspartato de aminoácidos. En: Sonenshein (Ed) *Bacillus subtilis* y otras bacterias grampositivas: bioquímica, fisiología y genética molecular Sociedad Americana de Microbiología: Washington DC). Las principales funciones metabólicas de los productos finales se indican entre paréntesis. Se subrayan los genes de *B. methanolicus* secuenciados y presentados en este trabajo;

La Figura 2 muestra la organización genética del operón de dap parcial e yclM de *B. methanolicus* MGA3 en comparación con los genes correspondientes de *B. subtilis*;

La Figura 3 muestra la actividad AK específica de extractos brutos de cultivos matraz de agitación de MGA3 de *B. methanolicus* y cepas recombinantes que sobreexpresan dapG, lysC e yclM. Todas las actividades enzimáticas específicas se miden *in vitro* y son relativas a la de la cepa de control MGA3(pHP13) (definida como 1). La actividad AK específica medida de MGA3 (pHP13) fue de 0.05 U/mg de proteína; y

La Figura 4 muestra el crecimiento y la producción de L-lisina en ensayos de fermentación de: A, MGA3 de tipo salvaje y la cepa de control MGA3(pHP13); B, cepas MGA3 recombinantes que sobreexpresan dapG, lysC o yclM. Símbolos rellenos, peso de células secas; símbolos vacíos, producción de L-lisina (valores corregidos de volumen). A lo largo de las fermentaciones, el nivel de metanol en el medio se mantuvo a 150 mM por alimentación automática de metanol.

## Ejemplo 1

### Materiales y métodos

#### Materiales biológicos, manipulación del ADN y condiciones de crecimiento

Las cepas y plásmidos bacterianos utilizados en este estudio se enumeran en la Tabla 1. Se usó *Escherichia coli* DH5a como huésped de clonación estándar y se cultivaron cepas recombinantes a 37°C en medio Luria-Bertani líquido o sólido suplementado con cloranfenicol (15 µg/ml) cuando sea apropiado. Los procedimientos recombinantes de *E. coli* se realizaron como se describe en otro lugar (Sambrook et al., (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York). La transformación de *B. methanolicus* se realizó por electroporación como se ha descrito previamente (Jakobsen et al., (2006) supra).

Para cultivos en matraces de agitación, las cepas de *B. methanolicus* se cultivaron a 50°C en 100 ml de medio MeOH<sub>200</sub> que contenía metanol 200 mM (Jakobsen et al., (2006) supra), y el crecimiento bacteriano se monitorizó midiendo la densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>).

Las fermentaciones se realizaron en fermentadores Applikon 3 1 con un volumen inicial de 0.91. El medio, definido como medio UMN1, contenía K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.09 g/l; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.30 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.11 g/l; extracto de levadura (Difco), 0.25 g/l; d-Biotina, 6 mg/l; Vitamina B12, 0.01 mg/l; MgSO<sub>4</sub>, 1 mM; solución concentrada de metales (Lee et al., 1996), 1 ml/l; metanol, 150 mM. Se añadió cloranfenicol (5 µg/ml) cuando fue apropiado. Se usaron cultivos de matraz de agitación en medio MeOH<sub>200</sub> como inóculo y se colectaron a OD<sub>600</sub> = 1.1-1.3. Los fermentadores se inocularon con un volumen de cultivo igual a 75 ml dividido por la OD<sub>600</sub> del inóculo en el momento de la cosecha (1.1-1.3). Las fermentaciones se realizaron a 50°C con agitación inicial de 400 rpm y aireación de 05 WM. La aireación se incrementó paso a paso hasta 1.0 VVM y el aire se enriqueció paso a paso hasta 60% de O<sub>2</sub>, a medida que aumentaba la demanda de oxígeno. En todo momento, el oxígeno disuelto se mantuvo al 30% de saturación por ajuste automático de la velocidad de agitación hasta 2.000 rpm. El pH se mantuvo a 6.5 mediante adición automática de NH<sub>3</sub> al 12.5% (p/v) (típicamente 200-250 ml). Se añadió antiespumante (Sigma Antifoam 204) a una concentración inicial de 0.005% (v/v), y se añadió a demanda durante toda la fermentación (típicamente 3 ml). La concentración de metanol en el fermentador se monitorizó mediante análisis en línea del gas del espacio de cabeza mediante un espectrómetro de masas (Balzers Omnistar GSD 300 02). El gas del espacio de cabeza se llevó desde el fermentador al espectrómetro de masas en tubo de acero inoxidable aislado calentado a 60°C, con un caudal de aproximadamente 30 ml/min. La concentración de metanol en el medio se mantuvo a 150 mM mediante adición automática de a demanda de metanol. La MeOH Feed Solution contiene 50 ml KKNFD Trace Metals por litro de metanol. LA KKNFD Trace Metals contiene MgCl<sub>2</sub>, 344 mM; FeCl<sub>2</sub>, 78.5 mM; MnCl<sub>2</sub>, 50.5 mM; CuCl<sub>2</sub>, 1.53 mM; CoCl<sub>2</sub>, 1.60 mM; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 1.57 mM; ZnCl<sub>2</sub>, 3.23 mM; HCl, 100 ml/l. El peso de células secas se calculó basándose en un factor de conversión de 0.31 g/l de peso de células secas por OD<sub>600</sub> (calculado como un valor medio basado en las mediciones de OD<sub>600</sub> y el peso de células secas de los ensayos de fermentación informados). La tasa de crecimiento específico se calculó mediante regresión lineal de las parcelas semilogarítmicas de la concentración de biomasa en función del tiempo, basándose en los datos del periodo de crecimiento exponencial (concentración de biomasa inferior a 15 g/l). Las fermentaciones se llevaron a cabo hasta que el contenido de CO<sub>2</sub> del gas agotado era cercano a cero (sin respiración celular).

Debido al aumento significativo del volumen de cultivo a lo largo de la fermentación, se han corregido todas las concentraciones de biomasa y aminoácidos para el aumento de volumen y la posterior dilución multiplicando la concentración medida con el volumen de cultivo al muestreo dividido por el volumen de cultivo original. Los factores de corrección utilizados para las muestras de punto final están entre 1.5 y 1.7 y, por consiguiente, las concentraciones reales de aminoácidos y de biomasa medidas en los biorreactores son menores.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa o plásmido	Descripción <sup>a</sup>	Referencia
<i>B. methanolicus</i>		
MGA3	Cepa de tipo salvaje	Schendel et al. 1990
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	Huésped de clonación general	Bethesda Research Laboratories
Plásmidos		
pTB1.9mdhL	Vector lanzadera <i>E. coli</i> - <i>B. methanolicus</i> pTB1.9 portador del gen mdh; Amp <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	Brautaset et al. 2004
pHP13	Vector lanzadera <i>E. coli</i> - <i>B. methanolicus</i> ; Clm <sup>r</sup>	Haima y col. 1987; Jakobsen et al. 2006
pHP13mp-dapG	pHP13 que lleva la región de codificación dapG bajo control de promotor mdh	Este estudio
pHP13mp-lysC	pHP13 que lleva la región de codificación lysC bajo control de promotor mdh	Este estudio
pHP13mp-yclM	pHP13 que lleva la región de codificación yclM bajo control de promotor mdh	Este estudio

<sup>a</sup> Amp<sup>r</sup> resistencia a ampicilina; Neo<sup>r</sup>, resistencia a neomicina; Glm<sup>r</sup>, resistencia al cloranfenicol.

#### Medición de aminoácidos y amoniaco

5 Los aminoácidos se cuantificaron según Skjerdal et al., 1996 (Appl. Micro. Biotechnol., 44(5): 635-642), utilizando un regulador que contenía acetato de Na 0.02 M y 2% de tetrahidrofurano, pH 5.9. La estimación de la concentración intracelular de aminoácidos se realizó como se ha descrito previamente (Brautaset et al., (2003) Appl. Environ. Microbiol., 69(7): 3986-3995), basándose en la determinación del contenido de aminoácidos en un cultivo de células brevemente lavado y sometido a lisis, estimación teórica del volumen intracelular y un factor de conversión determinado experimentalmente de  $2.2 \times 10^8$  células/ml por OD<sub>600</sub>. El amoniaco se midió con el kit de prueba de amoniaco Spectroquant (Merck), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (las muestras se diluyeron 1:1000 y 1:10 000 antes del análisis).

#### 15 Clonación asistida por PCR de genes de *B. methanolicus* asd, dapG, dapA y lysC

Los genes putativos que codifican AKI y AKIII se amplificaron por PCR a partir del ADN total de *B. methanolicus* MGA3 utilizando cebadores degenerados basados en secuencias de ADN de yclM, mlpA, asd, dapG e ymfA de *B. licheniformis*, *B. halodurans*, *B. cereus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes* y *B. subtilis* (números de acceso GenBank AE017333, BA000004, NC\_004722, AL592022, AL591824 y AL009126, respectivamente). Los fragmentos de ADN de MGA3 que cubrían asd, dapG y dapA se amplificaron por PCR como fragmentos solapantes usando pares de cebadores (Tabla 2) mlpA-PPS-1F junto con asd-PPS-1R (que daba un fragmento de 3.9 kb) y asd-PPS-1F juntos con ymfA-PPS-1R (produciendo un fragmento de 3.3 kb). Estos fragmentos se secuenciaron por desplazamiento de cebador.

25 Una región central de yclM fue amplificada por PCR y en parte secuenciada usando cebadores degenerados basados en regiones conservadas dentro de yclM. El ADN total de MGA3 se digirió con EcoRI, seguido de inactivación por calor de la enzima de restricción. El material se diluyó y se ligó durante 72 horas a 4°C. Los cebadores yclM-PPS-1F y yclM-PPS-1R, ambos apuntando hacia fuera desde la región yclM previamente amplificada por PCR se usaron para amplificar por PCR un fragmento de ADN de 3 kb usando la mezcla de ligación como molde. Este fragmento de ADN se secuenció por desplazamiento de cebador.

#### Construcción de vectores

35 El fragmento de ADN A que incluía la región codificadora de metanol deshidrogenasa (mdh) se amplificó por PCR a partir de pTB1.9mdhL utilizando los cebadores mdh-CDS-F1 y pTB1.9-R1. La región del promotor mdh putativo se amplificó por PCR a partir de la misma plantilla utilizando los cebadores mdh-prom-F1 y mdh-prom-R1, dando el

fragmento de ADN B. El pTB1.9mdhL se digirió con PstI y BamHI y el fragmento de la cadena principal del vector se ligó con fragmento B de ADN digerido con BamHI/PciI y fragmento de A de ADN digerido con PciI/PstI. Se retiraron dos sitios PciI del vector resultante por amplificación por PCR del vector como dos fragmentos: Fragmento 1 usando los cebadores mp-mdh-P2-F1 y mp-mdh-P2-R2, y Fragmento 2 utilizando los cebadores mp-mdh-P2-F2 y mp-mdh-P2-R1. Los dos fragmentos se digirieron con SphI y KpnI y se ligaron para producir pTB1.9mp-mdh, que lleva un sitio PciI entre las regiones mdh corriente arriba y codificadoras para la fusión simplificada de regiones codificadoras al promotor mdh. La inserción del sitio PciI cambió los cuatro nucleótidos corriente arriba del codón de inicio mdh del AAGA original a CATG.

Las regiones codificadoras de dapG, lysC e yclM se amplificaron por PCR a partir del ADN total de *B. methanolicus* MGA3 utilizando los cebadores dapG-CDS-F1 y dapG-CDS-R1, lysC-CDS-F1 y lysC-CDS-R1, yclM-CDS-F1 e yclM-CDS-R1, respectivamente. Los fragmentos de PCR resultantes que llevaban todo un sitio PciI que solapan parcialmente un codón de inicio GTG se digirieron en extremo con PciI y KpnI y se usaron para reemplazar la región de codificación mdh de pTB1.9mp-mdh, dando los vectores pTB1.9mp-dapG, pTB1.9mp-lysC y pTB1.9mp-yclM, respectivamente. En este proceso, los codones de inicio ATG originales de dapG y yclM se cambiaron a GTG. Se insertó un fragmento PstI/EcoRI de pTB1.9mp-lysC que incluía el promotor mdh y la región codificadora de lysC en los sitios correspondientes de pHP13, produciendo pHP13mp-lysC (7.3 kb). La LysC de pHP13mp-lysC se intercambió con regiones codificadoras dapG y yclM insertando un fragmento PstI/KpnI de pTB1.9mp-dapG y un fragmento SpeI/KpnI de pTB1.9mp-yclM en los sitios correspondientes de pHP13mp-lysC, proporcionando pHP13mp-dapG (7.1 kb) y pHP13mp-yclM (7.2 kb), respectivamente.

Tabla 2. Cebadores de PCR utilizados en este estudio

Cebador	Secuencia de cebador (5'-3') <sup>a</sup>
mlpA-PPS-1F	TCTACCTTCGTTGAGGAAGA (SEQ ID NO: 10)
asd-PPS-1R	CACTCCTGAACGGTTAATCC (SEQ ID NO: 11)
asd-PPS-1F	TGAGCAGACAAGAGCGATTA (SEQ ID NO: 12)
ymfA-PPS-1R	ATAGATCGCTCCGATATGGT (SEQ ID NO: 13)
yclM-PPS-1F	CCTGTGATCGGAATTGCAAGTGATAAAGGATTCTG (SEQ ID NO: 14)
yclM-PPS-1R	ATCTTCGTTCCAGGACCCGATGGATTATTGGTGTT (SEQ ID NO: 15)
mdh-CDS-F1	TCGACATGTGACAACAAGTTTTTC (SEQ ID NO: 16)
pTB1.9-R1	ACGCATACCATTTTGAACGATGACC (SEQ ID NO: 17)
mdh-prom-F1	GCCGGATCCTGCAGTTCATTAAGAGCAGC (SEQ ID NO: 18)
mdh-prom-R1	CGCGACATGTACTACCTCCTATTTATG (SEQ ID NO: 19)
mp-mdh-P2-F1	CGCGCATGCCGTTTCAATGAAGATCC (SEQ ID NO: 20)
mp-mdh-P2-R1	TTAAGCATGCAAAAGGCCAGGAACCG (SEQ ID NO: 21)
mp-mdh-P2-F2	TTTTGGTACCCGCCATAGGTCTAGAG (SEQ ID NO: 22)
mp-mdh-P2-R2	GGGCGGTACCCTTATTCTTTAGTCTATC (SEQ ID NO: 23)
lysC-CDS_F1	CCGAACATGTGGGATTAATTGTCC (SEQ ID NO: 24)
lysC-CDS_R1	TTCCGGTACCCAGCAAATTGAACAGC (SEQ ID NO: 25)
dapG-CDS-F1	GCGCACATGTGAAAATTATCGTTCAAAAATTCGG (SEQ ID NO: 26)
dapG-CDS-R1	GCTAGGTACCGCTCCTCCTATTCTATC (SEQ ID NO: 27)
yclM-CDS-F1	GCGCACATGTGAAAGTAGCGAAGTTTGAGGTTCTTC (SEQ ID NO: 28)
yclM-CDS-R1	GCTAGGTACCAAGTGTTCACACCCAAATTCG (SEQ ID NO: 29)

<sup>a</sup> Los nucleótidos subrayados son sitios de restricción usados para la clonación simplificada de productos de PCR.

#### Preparaciones de extractos celulares crudos y ensayo ak

Los extractos crudos de células se prepararon basándose en el protocolo descrito por Brautaset et al., 2004 (supra). Las células de *B. methanolicus* se hicieron crecer en medio MeOH<sub>200</sub> hasta la fase exponencial (OD<sub>600</sub> = 1.9-2.1) y 20 ml de cultivo celular por centrifugación (3.200xg, 10 min, 10°C). El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 20 ml de regulador de alta sal (el regulador de sal del medio MeOH<sub>200</sub> a una concentración de IX, pH 7.2). Se centrifugaron 3 ml de la cultura resuspendida (3.200xg, 10 min, 10°C), se descartó el sobrenadante y se congeló el gránulo y se almacenó a -20°C. Las células se descongelaron sobre hielo, se resuspendieron en 3 ml de regulador de ensayo AK (fosfato de potasio 50 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.5) y se sometieron a sonicación durante 3 min (Branson Sonifier 250, control de salida 3, 30% ciclo de trabajo). Se retiraron los restos celulares por centrifugación (3.200xg, 20 min, 4°C), y el sobrenadante se recogió como extracto de células crudas y se almacenó en hielo para posterior actividad enzimática y análisis de proteínas celulares totales. La actividad de AK se determinó por formación de hidroxamato de aspartilo a partir de hidroxilamina (Black et al., (1955) supra). La mezcla de reacción contenía 400 µl de regulador de reacción (Tris-HCl 0.5 M, KCl 2M, pH 8.0), 200 µl de solución de hidroxilamina (2M hidroxilamina, pH 8.0), 100 µl de solución de AAM (0.1 M de ácido L-aspartico, ATP 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 0.1 M, Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0) y una muestra de 300 µl diluida en regulador de ensayo AK. La mezcla de reacción se incubó a 50°C durante 20 min antes de que la reacción se terminara por adición de 1 ml de solución de Fe (10% (p/v) de FeCl<sub>3</sub>, ácido tricloroacético al 3% (v/v) en HCl 0.7 M, esterilizada antes del uso). La formación de aspartil

hidroxamato se midió inmediatamente a 540 nm usando un espectrofotómetro (Shimadzu, UV1700). Se realizaron ensayos en los que la muestra se reemplazó por patrones de aspartil hidroxamato para correlacionar la absorbancia con la concentración de hidroxamato de aspartilo. Una unidad de actividad AK se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu$ mol de aspartil hidroxamato por minuto en las condiciones anteriores (Black et al., (1955) supra). Las concentraciones de proteína se determinaron mediante el método de Bradford (Bio-Rad), utilizando albúmina de suero bovino como patrón. Los ensayos de AK se realizaron por triplicado y se realizaron cuatro paralelos para cada medición de concentración de proteína. La incertidumbre de la actividad específica de AK se calculó utilizando General Formula for Error Propagation (Taylor (1997) An introduction to error analysis: the study of uncertainties in physical measurements. University Science Books: Sausalito, California. Section 3.11)) con base en valores medios y desviaciones estándar de las actividades de AK y concentraciones de proteínas medidas.

## Resultados

yclM codifica un AKIII putativo en *B. methanolicus*

Basándose en alineaciones de secuencia de aminoácidos, se diseñó un conjunto de cebadores degenerados (véase MATERIALES Y MÉTODOS) y se usó para amplificar por PCR un fragmento de ADN de 2 kb usando ADN total de MGA3 como molde. Un putativo gen yclM fue amplificado con éxito por PCR de MGA3 total de ADN utilizando esta estrategia. Se secuenció un fragmento de ADN de 2012 pb y se encontró que contenía la región codificadora esperada y 605 pb de la secuencia corriente arriba (Figura 2). La secuencia primaria deducida (455 aminoácidos) del producto del gen yclM exhibe la identidad más alta global al nivel de aminoácidos a *B. licheniformis* AKIII (74%) y es 71% idéntica a AKIII *B. subtilis* str. 168, para lo cual se verificó experimentalmente la actividad de AK (Kobashi et al., (2001) Biosci Biotechnol. Biochem., 65(6): 1391-1394). Tiene baja identidad de secuencia primaria tanto con AKI como con AKII de *B. subtilis* (23% y 25%, respectivamente). Juntos, estos datos sugieren que el gen *B. methanolicus* yclM codifica una supuesta isoenzima AKIII.

asd, dapG y dapA que codifican putativo aspartato semialdehído deshidrogenasa, AKI y dihidrodipicolinato sintasa, respectivamente, se organizan en un operón putativo dap en *B. methanolicus*

En *B. subtilis*, asd, dapG y dapA se localizan dentro del operón dap (Chen et al., (1993) J. Biol. Chem., 268 (13): 9448-9465). Al alinear las secuencias conocidas de varias especies relacionadas (ver MATERIALES Y MÉTODOS), se observó una organización conservada de los genes corriente arriba de, dentro y abajo del operón dap, y la hipótesis de que esta organización genética fue similar en *B. methanolicus* como en las especies relacionadas examinadas. Mediante el uso de cebadores degenerados basados en regiones conservadas dentro de mlpA, asd, dapG y ymfA (Figura 2), se amplificaron por PCR los fragmentos superpuestos de ADN que cubren un operón putativo MGA3 dap parcial. En total, se secuenció una región de ADN de 4465 pb que comprendía los genes putativos asd, dapG y dapA, además de partes de la supuesta putativa spoVFB y corriente abajo putativo ymfA (Figura 2). Los productos génicos deducidos de asd, dapG y dapA (351, 413 y 290 aminoácidos, respectivamente) muestran las identidades de secuencia primarias más altas a aspartato semialdehído deshidrogenasa, AKI y dihidrodipicolinato sintasa de *Bacillus sp.* NRRL B-14911 (76, 85 y 79%, respectivamente). El producto del gen dapG deducido es 68% idéntico al AKI de *B. subtilis* str. 168, para la cual se verificó experimentalmente la actividad de AK (Chen et al., (1993) supra), mientras que la identidad de secuencia primaria con AKII y AKIII de *B. subtilis* es baja (38% y 24%, respectivamente). Esto sugiere que el gen dapG de *B. methanolicus* codifica una isoenzima putativa de AKI.

La organización de asd, dapG y dapA con igual orientación y regiones intergénicas cortas (31 y 14 nucleótidos, respectivamente) es similar a la de *B. subtilis* (Figura 2), donde estos tres genes se transcriben como una unidad durante el crecimiento vegetativo (Chen et al., (1993) supra). Las regiones intergénicas cortas del operón putativo dap de MGA3 no permiten la formación de estructura secundaria de ARNm evidente. Esto parece estar en contraste con dos posibles estructuras secundarias del transcripto ASD-dapG de 91 nucleótidos de largo intergénico de *B. subtilis*. Se ha sugerido que estas estructuras secundarias difieren en la disponibilidad del sitio de unión al ribosoma dapG para la interacción con ARN ribosómico 16S y representan un posible mecanismo para regular negativamente la expresión de dapG-dapA en relación con asd (Chen et al., (1993) supra).

Construcción de un sistema de clonación y expresión de casete para *B. methanolicus*

Hemos construido un sistema de expresión de casete como una herramienta para la sobreexpresión genética simplificada en *B. methanolicus* basada en mdh y el vector lanzadera de *E. coli* - *B. methanolicus* pHP13 (Brautaset et al., (2004) supra, Jakobsen et al., (2006) supra). Mediante la introducción de un único sitio de restricción parcialmente solapando el codón de inicio mdh y sitios de restricción únicos corriente abajo de la región codificadora, este sistema de casete ofrece una estrategia de clonación simple para la fusión en marco de cualquier región codificadora a la región promotora mdh y al sitio de unión al ribosoma.

La expresión recombinante de dapG y yclM confirma que codifican la actividad de AK

Para la sobreexpresión de genes AK en *B. methanolicus*, se establecieron los vectores de expresión pHP13mp-dapG, pHP13mp-lysC y pHP13mp-yclM, en los que los genes dapG, lysC y yclM están bajo control del promotor mdh y del sitio de unión al ribosoma. Por lo tanto, en estas construcciones, los genes codificadores de AK se liberan de cualquier regulación de transcripción original por productos de la ruta aspartato. Estos vectores de expresión se introdujeron en el MGA3 de tipo salvaje, y se estableció MGA3 (pHP13) como una cepa de control. Se comparó la actividad de AK en extractos crudos preparados a partir de MGA3 y las cepas recombinantes cultivadas en matraces de agitación en medio de metanol definido. Los resultados (Figura 3) muestran que los extractos crudos de las cepas recombinantes que sobreexpresan AKI y AKIII putativos (codificados por dapG y yclM, respectivamente) y AKII (codificado por lysC) muestran actividades AK *in vitro* cuatro a cuarenta veces más específicas que la de la cepa de control. Estos resultados confirman la función bioquímica deducida de los productos génicos dapG y yclM. Como era de esperar, la cepa de tipo salvaje MGA3 y la cepa de control MGA3 (pHP13) expresan actividades similares de AK. Curiosamente, la sobreexpresión de lysC dio actividad AK *in vitro* 10 veces más alta en comparación con dapG y yclM. Se desconoce si esto se debe a un mayor nivel de expresión o a diferentes propiedades bioquímicas de las proteínas AK medidas *in vitro*. Para todas las muestras, se pudo medir una actividad específica *in vitro* similar a diferentes diluciones del extracto bruto (datos no mostrados), lo que indica que la regulación de retroalimentación no afectó a los resultados del ensayo enzimático.

La sobreexpresión de dapG, lysC y yclM conduce a un aumento de la producción de L-lisina en *B. methanolicus* MGA3

Con el fin de evaluar el efecto del aumento de la expresión de dapG, lysC y yclM en la producción de L-lisina en el tipo *B. methanolicus* salvajes, se realizaron ensayos de fermentación discontinua de alta densidad celular en medio de metanol definido con las cepas recombinantes establecidas. La producción de aminoácidos (definida como la cantidad de aminoácidos secretada en el medio de crecimiento) se monitorizó a lo largo de las fermentaciones. Para comparar diferentes ensayos de biorreactor, se han corregido todas las concentraciones de biomasa y la producción de aminoácidos aquí descritas para la dilución causada por la alimentación durante la fermentación (véase MATERIALES Y MÉTODOS).

En las condiciones ensayadas, el MGA3 de tipo salvaje alcanzó una concentración máxima de biomasa de 58 g/l en 23 horas con una tasa de crecimiento específico inicial de  $0.49 \text{ h}^{-1}$ . La producción final de L-lisina de MGA3 fue de 0.18 g/l, de acuerdo con resultados anteriores (Schendel et al., (1990) supra; Brautaset et al., (2003) supra). La cepa de control MGA3 (pHP13) fue similar al tipo salvaje con respecto a la tasa de crecimiento específico, la densidad celular máxima y la producción de L-lisina, lo que indica que el pHP13 no produce efectos sobre estas propiedades (Figura 4 y Tabla 3). Curiosamente, todas las cepas recombinantes que sobreexpresan dapG, lysC o yclM produjeron más L-lisina que la cepa control, y mantuvieron una tasa de crecimiento específico similar (Tabla 3). El efecto más dramático sobre la producción de L-lisina se observó con la cepa MGA3 (pHP13mp-yclM), que produjo más de 60 veces más L-lisina (11 g/l) que la cepa control (Figura 4 y Tabla 3). Las cepas recombinantes que sobreexpresaban dapG y lysC mostraron un aumento de 2 veces y 10 veces en la producción de L-lisina, respectivamente. Todas las cepas fueron similares con respecto a la producción de L-glutamato (48-52 g/l), y la producción de los otros productos finales de la ruta aspartato, L-metionina ( $<0.5 \text{ g/l}$ ) y L-treonina ( $<0.1 \text{ g/l}$ ) se mantuvo bajo. Para verificar la reproducibilidad de los ensayos de fermentación, se realizaron MGA3(pHP13) y MGA3(pHP13mp-yclM) dos veces en ensayos de fermentación independientes. La densidad óptica y la concentración de aminoácidos variaron menos del 10% entre los ensayos de fermentación paralelos en cualquier punto de muestreo, y la tasa de crecimiento específico calculada no varió más de  $\pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ .

Tabla 3 Tasa de crecimiento específica inicial, peso máximo de células secas y producción final de L-lisina de MGA3 de tipo salvaje de *B. methanolicus* y cepas recombinantes que sobreexpresan dapG, lysC y yclM.

Cepa	Tasa de crecimiento específica [ $\text{h}^{-1}$ ]	Peso celular seco [ $\text{g/l}$ ] <sup>1</sup>	Producción de L-lisina [ $\text{g/l}$ ] <sup>1</sup>	L-lisina en medio de crecimiento [ $\text{g/l}$ ] <sup>2</sup>
MGA3	0.49	58	0.18	0.12
MGA3(pHP13)	0.49	56	0.18	0.12
MGA3(pHP13mp-dapG)	0.50	62	0.38	0.23
MGA3(pHP13mp-lysC)	0.46	61	1.8	1.1
MGA3(pHP13mp-yclM)	0.50	54	11	7.0

1) La biomasa reportada y la producción de L-lisina se corrigen para la dilución causada por la alimentación durante la fermentación con el fin de comparar los resultados de diferentes ensayos de biorreactor (ver Materiales y Métodos).

2) Concentración de L-lisina medida en medio de crecimiento (sin corrección de volumen).

Ejemplos 2 y 3 - materiales y métodos

Información adicional no descrita aun en los Materiales y Métodos del Ejemplo 1.

5 Manipulación del ADN y condiciones de crecimiento

Se realizó clonación general, PCR, secuenciación de ADN y fermentaciones como ya se describió en el Ejemplo 1. El crecimiento de *B. methanolicus* sobre manitol se hizo utilizando medio Mann<sub>20</sub> que es igual a 2 x Mann<sub>10</sub> como se describe en Jakobsen et al., (2006) J Bacteriol., 188 (8): 3063-3072.

10

Medición de L-lisina

Las mediciones de L-lisina se realizaron usando HPLC como se describe en el Ejemplo 1.

15 PCR en tiempo real

Se hicieron crecer cultivos de *B. methanolicus* hasta la fase logarítmica tardía (OD<sub>600</sub>=3), antes de la recolección. La lisis celular incluyendo la protección de ARN, el aislamiento del ARN total y la síntesis de ADNc concomitante se realizaron como se describe en otra parte (Jakobsen et al., 2006, supra). Las concentraciones totales de ARN se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies). Los cebadores para los experimentos de PCR en tiempo real fueron diseñados mediante el software Primer ExpressR v 2.0 (Applied Biosystems). La detección de productos de PCR se realizó con el sistema ABI 7500 (Applied Biosystems) bajo los siguientes perfiles. Para el ensayo de eficiencia de cebador, las mezclas de reacción se incubaron a 95°C durante 10 min para activar la polimerasa Taq de inicio en caliente seguido de un protocolo de PCR de dos etapas (desnaturalización durante 15 seg a 95°C seguido por una etapa combinada de fusión-extensión (con adquisición de datos fluorescentes) durante 1 min a 60°C). Este paso se repitió en 40 ciclos. La determinación de la temperatura de disociación se realizó por un ciclo subsiguiente con 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C y un paso final a 95°C durante 15 seg. Para los estudios comparativos de PCR cuantitativa en tiempo real, el perfil se redujo a los pasos utilizados para la prueba de eficiencia de cebador. La adquisición y el análisis de datos se realizaron con la versión de software de detección de secuencias v1.2.3 (Applied Biosystems Inc.) bajo reacción estandarizada con señal SYBR.

20

25

30

Construcción de vectores de expresión

pTH1mp-lysC:

35

El plásmido pHP13 (Jakobsen et al., 2006, supra) se digirió con PciI, y los extremos cohesivos resultantes se amortiguaron usando ADN Polimerasa T4, y los extremos religaron para dar el plásmido pTH1. Se digirió el plásmido pHP13mp-lysC (Ejemplo 1) con PstI/EcoRI y se aisló el fragmento de 2.6 kb y se ligó en los sitios correspondientes de pTH1, dando lugar a la clonación de casete con un vector de expresión pTH1mp-lysC. Este vector es análogo al plásmido HP13mp-lysC y tiene un único sitio PciI para la clonación en un solo paso de cualquier gen codificador corriente abajo del promotor mdh fuerte y en el marco con la región mdh rbs.

40

pTH1mp-asd, pTH1mp-dapA y pTH1mp-lysA

45

Los fragmentos de ADN con las regiones codificadoras de asd (1117 pb), dapA(904 pb) y lysA (1322 pb) se amplificaron por PCR a partir del ADN total de *B. methanolicus* usando los siguientes pares de cebadores: asd-F: 5'-GCGCACATGTGGGTCAAGAAAATGGTCTTC-3' (SEQ ID NO: 30) asd-R: 5'-ATGGTACCTGCCCCGAATTTTTGAAC-3'(SEQ ID NO: 31) dapA-F: 5'-GCGCACATGTGTTTCATTTGGTTCGAATATC-3'(SEQ ID NO: 32) dapA-R: 5'-ATGGTACCGGCAGTAAAACTCCATTGAT-3'(SEQ ID NO: 33) lysA-F: 5'-GCGCACATGTGTATTTTCATGGCACAACA-3'(SEQ ID NO: 34) lysA-R: 5'-ATGGTACCGCAGCTTAGTATCTTACTCT-3'(SEQ ID NO: 35) los sitios de restricción PciI y KpnI están subrayados en los cebadores directo e inverso, respectivamente. Los productos de PCR obtenidos se digirieron en extremo con PciI/KpnI y se ligaron en los sitios correspondientes de pTH1mp-lysC (sustituyendo el gen lysC), dando los vectores de expresión pTH1mp-asd, pTH1mpdapA y pTH1mp-lysA, respectivamente. Los insertos en todos los plásmidos se verificaron mediante secuenciación de ADN.

55

pHP13mp-yclM + lysA

60

El plásmido pTH1mp-lysA se digirió con SpeI/NcoI y el fragmento de 1.8 kb se ligó al vector pHP13mpyclM digerido con XbaI/NcoI, produciendo el plásmido pHP13mp-yclM+lysA.

pTH1mp-dapA + yclM

65

El plásmido pHP13mp-yclM se digirió con SpeI/NcoI y el fragmento de 1.9 kb se purificó y se ligó en sitios pTH1mp-dapA XbaI/NcoI, dando lugar al vector de expresión pTHmp-dapA + yclM.

Los vectores se transformaron a *B. methanolicus* cepa MGA3 por electroporación.

Ejemplo 2: Sobreexpresión de genes adicionales de *B. methanolicus* usando pH13 y el promotor mdh y los efectos sobre la producción de L-lisina.

En el Ejemplo 1 se describe la sobreexpresión de los tres diferentes genes codificadores de AK (dapG, lysC y yclM) y los efectos sobre la producción de L-lisina en MGA3 (*B. methanolicus* de tipo salvaje). En un estudio adicional se han sobreexpresado genes y efectos adicionales de la ruta biosintética de L-lisina utilizando el mismo sistema de expresión (es decir, pH13 con el promotor mdh) en matraces de agitación (Tabla 5). Con base en los resultados globales obtenidos para genes individuales, hemos construido vectores con sobreexpresión acoplada de dos o más genes usando el mismo sistema de expresión y demostrado efectos aditivos sobre los niveles de producción de L-lisina en MGA3 (véase Tabla 5).

Tabla 4: Rendimientos de producción de L-lisina (mg/l) obtenidos en cultivos en matraz de agitación de la cepa MGA3 recombinante de *B. methanolicus* en crecimiento sobre metanol.

Vector	Promotor	Rendimiento de L-lisina (mg/l)
pHP13	No	6
pHP13mp-dapG	mdhP	7
pHP13mp-lysC	mdhP	55
pHP13mp-yclM	mdhP	110
pTH1mp-dapA	mdhP	7
pTH1mp-asd	mdhP	7
pTH1mp-lysA	mdhP	150
pTH1mp-dapA+yclM	mdhP	250
pTH1mp-yclM+lysA	mdhP	220
pTH1mp-yclM+lysA+dapA	mdhP	310

Comentarios a la Tabla 4:

- Todos los genes expresados se describen en la Figura 1 y las construcciones de vectores se dan en Materiales y Métodos

- Para todos los genes recombinantes la transcripción es impulsada por el promotor mdh (mdhP)

- Todos los genes recombinantes están bajo control de traducción del sitio de unión al ribosoma mdh

- Los rendimientos de producción en matraces de agitación son mucho más bajos en comparación con lo que sucede cuando las cepas se prueban en fermentadores; sin embargo, los efectos relativos son comparables.

Estos datos muestran, como en el Ejemplo 1, que la sobreexpresión de yclM da como resultado una producción de L-lisina mucho más alta observada con genes AKI (dapG) y AKII (lysC). Se muestra además que se puede obtener un efecto mejorado sobre la producción de lisina combinando la sobreexpresión de AKIII con la sobreexpresión de otros genes de la ruta de biosíntesis de lisina tales como dapA (que codifica la dihidropicolinato sintasa) y lysA (que codifica meso-dimainopimelato descarboxilasa).

Ejemplo 3. Producción de L-lisina en medios de crecimiento a base de azúcar

Hemos probado las cepas recombinantes descritas en el Ejemplo 3 para la producción de L-lisina tras el crecimiento en medio manitol, por ejemplo la cepa MGA3 (pTH1mp-lysA) que sobreexpresa lysA, y los resultados muestran claramente que los niveles de producción son similares o incluso mayores en estas condiciones en comparación con los datos análogos obtenidos en medio metanol (véase Tabla 5). La composición del manitol y los medios de metanol son idénticos, además de la fuente de C.

Tabla 5. Rendimientos de producción de L-lisina en cultivos en matraces con agitación de cepas de *B. methanolicus* recombinantes, tras el crecimiento en metanol con respecto al medio manitol

Gen sobreexpresado	Rendimiento de L-lisina (mg/l)	
	Metanol (MeOH <sub>200</sub> )	Manitol (Mann <sub>20</sub> )
MGA3 (pH13)	6	9
MGA3 (pTH1mp-lysA)	150	400

Comentarios al medio de crecimiento utilizado:

MeOH<sub>200</sub>: Tal como se describe en Jakobsen et al., 2006 (supra)

5 Mann<sub>20</sub>: Igual a 2 x Mann<sub>10</sub> como se describe en Jakobsen et al., 2006 (supra).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Sinvent AS  
<120> Método de producción de L-lisina  
<130> 27.5.95628/05
- 15 <140> EP09750085.4  
<141> 2009-05-15  
<160> 35
- 20 <170> PatentIn versión 3.3  
<210> 1  
<211> 1242  
<212> ADN
- 25 <213> Bacillus methanolicus  
<400> 1

ES 2 626 405 T3

atgaaaatta tcgttcaaaa attcgggggc acttcgggtcc gtgacgatat tagccgatcg 60  
 aatgcaaaaa ggcataataga aaaagctcta gccgaaggct acaaggttgt agttgttgta 120  
 tcagcgatgg gacgaagcgg tgaaccgtat gcaaccgata ccctcttata gctaattgga 180  
 ggcaatgcga cgaaggtaag taaacgggag caagatttgc ttctttcttg cggagaaatc 240  
 atctcaagca ttgtttttac aaacatgctt attgagcatg gcattcgcgc tgttgcttta 300  
 accggtgcc aagcggggtt tcggacaaac aacgatcata cgaatgcaaa aattattgaa 360  
 atgaaatgcg acaggccttt aagggaattg gaacaaaacg aagttgtagt tntagccggt 420  
 ttccaagggtg ctgcaaagaa tggcgatata acgaccattg gacgtggtgg cagcgataca 480  
 tcagccgctg ctttaggtgc agcgcttaat gctgaatgga ttgacatctt tactgatggt 540  
 gagggaataa tgacagctga ccctcgaatt gttgagaatg cgcgtccttt atcggtagtc 600  
 acttacacgg aagtgtgcaa tatggcctat cagggtgcaa aggttataca ccctcgggcc 660  
 gtagaaatag caatgcaggc aaaaattccg atcaggattc gatcaactta ttcggacagc 720  
 cccggcacct tagttacctc actcagcaaa aatagtcgag gaagcgatat tcgagaacgg 780  
 ccggttaactg gaattgccca cgttccaaat gttaccaga ttaaagtttt cgctaaaaaa 840  
 gatcagtata atttacaagc tgaagtattt aaagcaatgg caaacgaaaa aatcagtgtt 900  
 gatttgataa atatatcgcc aaatggggtc gtttatacgg tgatgaatga aatggcagac 960  
 caagccattc gaattttgac cgatatggga catgagccgg ttgttgaacg ggattgtgca 1020  
 aaggtatccg ttgtcgggtc aggtatggct ggagtcccag gcgtcgcac aaaaattgta 1080  
 acagctctgt cagaaaaagg aattcgtatt ttacaatctg ctgacagcca cacgaccatc 1140  
 tgggttttag ttaaacaaga ggatttagta aatgcagtca aagcattgca tgacgcatc 1200  
 cagcttgaga aagaacgct ggagtttgaa cggatagaat ga 1242

<210> 2  
 <211> 413  
 5 <212> PRT  
 <213> Bacillus methanolicus  
 <400> 2

ES 2 626 405 T3

Met Lys Ile Ile Val Gln Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Arg Asp Asp  
 1 5 10 15

Ile Ser Arg Ser Asn Ala Lys Arg His Ile Glu Lys Ala Leu Ala Glu  
 20 25 30

Gly Tyr Lys Val Val Val Val Val Ser Ala Met Gly Arg Ser Gly Glu  
 35 40 45

Pro Tyr Ala Thr Asp Thr Leu Leu Ser Leu Ile Gly Gly Asn Ala Thr  
 50 55 60

Lys Val Ser Lys Arg Glu Gln Asp Leu Leu Leu Ser Cys Gly Glu Ile  
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Ile Val Phe Thr Asn Met Leu Ile Glu His Gly Ile Arg  
 85 90 95

Ala Val Ala Leu Thr Gly Ala Gln Ala Gly Phe Arg Thr Asn Asn Asp  
 100 105 110

His Thr Asn Ala Lys Ile Ile Glu Met Lys Cys Asp Arg Leu Leu Arg  
 115 120 125

Glu Leu Glu Gln Asn Glu Val Val Val Val Ala Gly Phe Gln Gly Ala  
 130 135 140

Ala Lys Asn Gly Asp Ile Thr Thr Ile Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr  
 145 150 155 160

Ser Ala Ala Ala Leu Gly Ala Ala Leu Asn Ala Glu Trp Ile Asp Ile  
 165 170 175

Phe Thr Asp Val Glu Gly Ile Met Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Glu  
 180 185 190

Asn Ala Arg Pro Leu Ser Val Val Thr Tyr Thr Glu Val Cys Asn Met  
 195 200 205

Ala Tyr Gln Gly Ala Lys Val Ile His Pro Arg Ala Val Glu Ile Ala  
 210 215 220

Met Gln Ala Lys Ile Pro Ile Arg Ile Arg Ser Thr Tyr Ser Asp Ser  
 225 230 235 240

Pro Gly Thr Leu Val Thr Ser Leu Ser Lys Asn Ser Arg Gly Ser Asp  
 245 250 255

ES 2 626 405 T3

Ile Arg Glu Arg Pro Val Thr Gly Ile Ala His Val Pro Asn Val Thr  
 260 265 270  
 Gln Ile Lys Val Phe Ala Lys Lys Asp Gln Tyr Asn Leu Gln Ala Glu  
 275 280 285  
 Val Phe Lys Ala Met Ala Asn Glu Lys Ile Ser Val Asp Leu Ile Asn  
 290 295 300  
 Ile Ser Pro Asn Gly Val Val Tyr Thr Val Met Asn Glu Met Ala Asp  
 305 310 315 320  
 Gln Ala Ile Arg Ile Leu Thr Asp Met Gly His Glu Pro Val Val Glu  
 325 330 335  
 Arg Asp Cys Ala Lys Val Ser Val Val Gly Ala Gly Met Ala Gly Val  
 340 345 350  
 Pro Gly Val Ala Ser Lys Ile Val Thr Ala Leu Ser Glu Lys Gly Ile  
 355 360 365  
 Arg Ile Leu Gln Ser Ala Asp Ser His Thr Thr Ile Trp Val Leu Val  
 370 375 380  
 Lys Gln Glu Asp Leu Val Asn Ala Val Lys Ala Leu His Asp Ala Phe  
 385 390 395 400  
 Gln Leu Glu Lys Glu Thr Leu Glu Phe Glu Arg Ile Glu  
 405 410

- <210> 3
- <211> 1368
- <212> ADN
- <213> Bacillus methanolicus
- <400> 3

5

ES 2 626 405 T3

<400> 3  
atgaaagtag cgaagtttgg aggttcttca ttagcatcag gagaacaatt tgaaaaggta 60  
tttaacattg ttatgtctga tccaaagaga aaaattggtg tagtttcggc accaggcaag 120  
cgttttgcga gtgatataaa ggtaaccgat ttactcattg aatgcgccga aaaatgccta 180  
aaaaacgaag cggctgatga tttagtagaa gccgtcatcg aaagatatgc aagtattgca 240  
agggaaactgg ggctttcaag cagagtttca aatatgattc gaaacgatct tcttacagtg 300  
ttaagcggag ataaaagcaa tcctgaacga tttatcgatg ctgttaaagc aaccggcgag 360  
gacaataatg caaaacttat ggccgcgtac ttccagcata aaggagtaga ggctcgctat 420  
gtaaattccga aagatgcggg cctgattgta agcgatgagc ctggaaatgc acaagtgtt 480  
cctgaatctt atgaacggct tttgagctt cggaatttgc caggaattat tattttccct 540  
ggatttttcg gctttacaaa aaaggagaa gtggtaactt tttcacgaag cggatctgac 600  
  
ataaccggtt ccattttagc gaatgggacg aaagctgagc tttatgaaaa ttttacagac 660  
gttgatgcag tttattcagt caatccgaat atcgtggaaa aacctaagga gattcgtgaa 720  
ttgacataca gagaaatgcg ggaactctcc tatgctggat tcaactgtgct tcatgatgaa 780  
gctcttattc ctgctttccg cgccgggtatt cctgttaata ttaaaaacac caataatcca 840  
tcggctcctg gaacgaagat cgttcatgaa cggacaactt cgaatggccc tgtgatcggg 900  
attgcaagtg ataaaggatt ctgcagcatt tatgtcagca aatatttaat gaaccgagaa 960  
attggattcg gacgaaaaat tttgcagatt ttagaagagt acggattgtc gtatgaacat 1020  
attccatccg gaattgatga catctcgatt attctaagaa aaaatcagtt gaatccagcg 1080  
ttggaagaag agattgttac acgcattaa acggagcttg aggctgatga agtgaaaatt 1140  
gaacgtaatc ttgctcttat tatgatcgtg ggtgaagggg tgcgccaaaa tgtggggaca 1200  
atggctagag cttcaaaggc gctggccgat gcaggcgtca atattgaaat gatcaaccag 1260  
ggatcctcag aagtgagcat gatgttcggt gtgaaagctg aagatgaaca acgtgcggtg 1320  
atagcccttt acaaagagtt ttttgctcca gttcctgtaa atgtttag 1368

5

<210> 4  
<211> 455  
<212> PRT  
10 <213> Bacillus methanolicus  
<400> 4

ES 2 626 405 T3

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

ES 2 626 405 T3

Asp Ala Gly Leu Ile Val Ser Asp Glu Pro Gly Asn Ala Gln Val Leu  
 145 150 155 160  
 Pro Glu Ser Tyr Glu Arg Leu Phe Glu Leu Arg Asn Leu Pro Gly Ile  
 165 170 175  
 Ile Ile Phe Pro Gly Phe Phe Gly Phe Thr Lys Lys Gly Glu Val Val  
 180 185 190  
 Thr Phe Ser Arg Ser Gly Ser Asp Ile Thr Gly Ser Ile Leu Ala Asn  
 195 200 205  
 Gly Thr Lys Ala Glu Leu Tyr Glu Asn Phe Thr Asp Val Asp Ala Val  
 210 215 220  
 Tyr Ser Val Asn Pro Asn Ile Val Glu Lys Pro Lys Glu Ile Arg Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Tyr Arg Glu Met Arg Glu Leu Ser Tyr Ala Gly Phe Thr Val  
 245 250 255  
 Leu His Asp Glu Ala Leu Ile Pro Ala Phe Arg Ala Gly Ile Pro Val  
 260 265 270  
 Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asn Pro Ser Ala Pro Gly Thr Lys Ile Val  
 275 280 285  
 His Glu Arg Thr Thr Ser Asn Gly Pro Val Ile Gly Ile Ala Ser Asp  
 290 295 300  
 Lys Gly Phe Cys Ser Ile Tyr Val Ser Lys Tyr Leu Met Asn Arg Glu  
 305 310 315 320  
 Ile Gly Phe Gly Arg Lys Ile Leu Gln Ile Leu Glu Glu Tyr Gly Leu  
 325 330 335  
 Ser Tyr Glu His Ile Pro Ser Gly Ile Asp Asp Ile Ser Ile Ile Leu  
 340 345 350  
 Arg Lys Asn Gln Leu Asn Pro Ala Leu Glu Glu Glu Ile Val Thr Arg  
 355 360 365  
 Ile Lys Thr Glu Leu Glu Ala Asp Glu Val Lys Ile Glu Arg Asn Leu  
 370 375 380  
 Ala Leu Ile Met Ile Val Gly Glu Gly Met Arg Gln Asn Val Gly Thr  
 385 390 395 400  
 Met Ala Arg Ala Ser Lys Ala Leu Ala Asp Ala Gly Val Asn Ile Glu  
 405 410 415

ES 2 626 405 T3

Met Ile Asn Gln Gly Ser Ser Glu Val Ser Met Met Phe Gly Val Lys  
 420 425 430

Ala Glu Asp Glu Gln Arg Ala Val Ile Ala Leu Tyr Lys Glu Phe Phe  
 435 440 445

Ala Pro Val Pro Val Asn Val  
 450 455

<210> 5  
 <211> 1365  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus subtilis

5

<400> 5  
 ttaagagatc agcacgcccc cgaaaaattc ctggtataac gcttgaacgg cttttctttc 60  
 ttcggcttct tttacgcaa acatcatgct cacttcagaa gaccctgat tgatcatttc 120  
 gatattcacc tgtgcctctg ataatgcttt ggcggctctt gccgttgtag cgacattgtg 180  
 gcgcatcgct tcccctacaa ccataatcag ggcgagatga tgctcgacga tgacttcac 240  
 ggcattgcaa tcctcttcga tccgtttgat gacgctgcgt tcagtggcgg catccatttg 300  
 cccctgccgt aaaatgattg tcatgtcatc gattcccgat ggaacatgct catacgtcaa 360  
 accatgctcc tccaggattt gaagggctct gcggccaaaa ccgatttctc tgttcattgag 420  
 atacttgctg atataaatgc tgcaaaaacc ggtgtcgtcg gcaatgccga cgacaggccc 480  
 gtttgtgtta tcccgcttgc tgacgacgcy ggtgccttcg gctgaggggt tgttcgtatt 540  
 tttgatctga acaggaatcc ccgctctgaa tgccggaatg agcgcttcat catgaaacac 600  
 tgaaaaacc gcgtaggaca gctcccgcac ctctctatat gtcagctcgc tgatttcctt 660  
 tggatttca acgaaggacg gattgacaga atacacagcy tctacgtctg taaagttttc 720  
 gtacaaatcg gctttagtc cgttggcaag aatcgaaccg gtaatatcag aaccgctccg 780  
 tgagaatgtg atcacatcgc catccttget gaatccgaaa aaaccgggaa aaatgatgag 840  
 tccgtcacgt tcccgaagac gatagaggtt ttgataggat tcaggaagaa cttgcygctt 900  
 gccgggttca tttgtcacia agaggccggc atccttcggg tttacatatt ccgctttgac 960  
 gcccttataa cggaagtaag cggcgatcag tttggcattg ttatcctctc cgctggcctt 1020  
 gactgcytca aggtattggt cgggattgct tttgtctcct tctaaaagcy taaacagatc 1080  
 atctctgatt ttttcgataa tgctttgccc cagctgaagc tcattggcga tgagagcgta 1140  
 ccgttccaca acagcttccg ccagttcagg tgcgctgcct gttgccaaat attgttctgc 1200  
 acatgcygatt aagagatcag tcactttcgt atcctcgca tagtgttttc ccggagctga 1260  
 aacgactaca gctttccgtg ccggatctga ggtaacgatg tgaaacacct tgtcaagctg 1320  
 ggcgcctgaa gcaagtgcgc tgccctccgaa ttaaacgacc ttcac 1365

10

ES 2 626 405 T3

<210> 6  
 <211> 1362  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus licheniformis

5

<400> 6  
 ttaaacgaga acttttgcg aaaactcctg gtataatgcg cggaccgctt gtttttcctg 60  
 agcttcctta acgccgaaca tcatgctgac ttccgaggag ccctgggtga tcatttcgat 120  
 gttgacgccg gcttcagaca atgcttttga cgctcttgcc gtcgttccga cgttatggcg 180  
 catggcttcg ccgacgacca tgatcagggc aatattgtgt tcaatcgcta cttcatcagc 240  
 atccaactct tccttgatcc gtttgatcat ccgtttttct gctgcttgat ccatttgatt 300  
 ctgccttaaa atgatcgtaa tatcgtcaat gccggacgga atgtgttcat atgtcagccc 360  
 ttcatcttca aggatttgca ggacgcggcg gccgaagccg atttctcggg tcatcaaata 420  
 tttgctgatg taaatgctgc aaaatccgct gtcgccggcg atcccgcga cagggtccgtt 480  
 cgtgttgctg cgtgtggcga caactcttgt cccttctgcg tccgggttgt ttgtatTTTT 540  
 gatctgaacc ggtatgcgcy cccggaaagc agggatcaat gcttcatcat gaaagacgga 600  
 aaagccggca tacgacagct ctctcatttc ccggtatgtc agctcgcgga tttctttcgg 660  
 gttggatacy atcgccgggt tgacagaata aacggcgtca acgtcagtga agttttcata 720  
 caactcggct ttcaatccat tcgctaaaat ggagcccgta atgtcagagc cgctgcgcyga 780  
 aaacgtcacc acttctcctt cctggctgaa tccgaagaag ccgggaaaga taatgatgcc 840  
 cttttgctgt ctgagctgaa acagattgtc gtaggactcg ggcagcactt gtgcggttgc 900  
 gggttcgtc gtcacgaaca gcccggcgtc ttttggactg acataatgtg cttcaactcc 960  
 acgggtccctg aagtaggccg ctaccagttt ggcattgtta tcttcgccgc tagctttgat 1020  
 cgcatacaata aaccgttccg gatttgTTTT atcaccttcg agcagctgaa gcaggtctgc 1080  
 ccggatccgg ttgatcacgt catcggcaag cccgagctct agcgcgatat cggcataccg 1140  
 tccgacaatc gcctcaacca ggccggtcgc ttctttcgat aataggactt gttgggcgca 1200  
 ttcgattaac aggtcagtta ctttcgtatc ctcgggatgc cgttttccgg gtgccgatac 1260  
 gacgacggcc ctcttttccg gatcggaagt gacgatttga aatactttct ctagctgggc 1320  
 tcctgatgcy agcgagctgc ctccaaattt aacgactttc at 1362

<210> 7  
 <211> 1371  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus halodurans

10

ES 2 626 405 T3

<400> 7  
atgaaagtaa cgaagtttgg tggaacatcc gttgcbagtg cagagcaaat tcbcaaggtg 60  
gctacgattg tagcagatga tgtggagcgt aaaattgtcg tcgtttcagc tcctgggaag 120  
cggcattcaa gcgatacaaa ggtgacggat ttgttaattc gtttaggaga aacgtactta 180  
gaaaagggat atgcgaatga ggagctagag gcbgttttac gacggtatga agaaattgct 240  
aaagggttgg agctcggcca agagatcatt gatcaaattg cgaacgattt acacacaagg 300

ctaaccittta accaaagcaa ccccggtgca tttatggatc aactcaaggc aagcggggag 360  
gacaacaacg cgaagttaat tgctgcctat ttgcaaacca aaggaatgaa tgcagtctat 420  
gtaagcccaa aggaggccgg cctgttggtc agtgatgaac ctggaaacgc ccaagtgtta 480  
cctgaggcgt atgaccattt aaaaaagctt cbtgaacgtg acgaaatgat cgtattccca 540  
ggtttttttg gtttttctcc agacggagct ctcgtcacat ttccgcgagg aggctcggac 600  
attactggag cgattttggc cgctggggtg aaagcggaac tgtatgagaa ttttacagac 660  
gtggattccg tgtttgctgc gaacccaaat gtcgttgaaa gtccggcgca aattcggcgc 720  
atgacttata gagaaatgcg ggagctttcc tatgcgggct tttccgtctt tcatgatgaa 780  
gcbttaaattc cagcatttcg gcaaaagatt cccgtttgtg tgaaaaacac gaacaatcct 840  
agctcaccag gaacaatgat tctagcagag cbagagtact ttttaaatcc tgbcatcggg 900  
attgcggcag ataaagggtt tgcgactatt tatgttcgca aatatttaat gaaccgtgaa 960  
atagggttcg ggcgtcggct gttgcaaat attgaagatg aaggcctttc atatgagcat 1020  
atcccgtcag gaattgatga tgccctcggc attcttcggc aggagcaact gacggatgaa 1080  
atcbagcadc ggatattagc acgaataaaa gaggagcttt gtgtcbagca tgtgtttgtt 1140  
gaaaaggatt ttgctatggt gatgatcgtt ggtgaaggaa tgcataacac tgbcbgcatt 1200  
tcagcacgag ccacggctgc gcttgctaga gctcatgtca acattgaaat gattaaccaa 1260  
ggatcbtctg aggttagttt agtgcttggc atacacgaga aagacbccga tgbcbccgtc 1320  
cgtgaattgt atgaagaatt tttcbgtggt gccgaggaaa cbgttcaata a 1371

5

<210> 8

<211> 1365

<212> ADN

10 <213> Bacillus amyloliquefaciens

ES 2 626 405 T3

```

<400> 8
ctatgagagt aagactccgg cgaaaaattc gtcatacagt gcccgcaccg cgtgtttttc 60
ctgttcttct ttcactccga acatcatgct gacttccgat gacccttgat tgatcatctc 120
gatgttgacg ccggcttccg acagtgcttt ggatgccctg gcggttggtc cgacattatg 180
gcgcatcgct tccccgacga ccataatcag cgccagattg tgectgactg tgacttcac 240
tgcttgaagt tcctgcttca gacgggtgac gagcctgtgt tccagttctg agtccatctg 300
attgtgccga aggatgatcg tgatgtcgtc aatgccggat ggaacgtggt catacgtcaa 360
tccttcttcc tccaaaatgt gaagggcttt gcggccgaaa ccgatttccc ggttcattaa 420
atatttgctt atgtaaatgc tgcaaaagcc cgtgtcgtt gcgatgccga tgactggccc 480
gttcgtattg tcacggctgc tgacgacgcg tgcttcttcc gcatccggat tattcgtatt 540
cttaatttga acggggatgc cggcccgaaa tgcgggaatc agcgttcat catgaaaaac 600
ggaaaatccg gcataggaga gtcacgcat tccccgatac gtcagttcgt taatttcttt 660
cggatgccgc acgattgacg ggttgacgga atagacggca tccacatcag taaagttttc 720
gtacaggtcg gcttttaagc cgctggcgag aatggagccg gtaatatcag aaccgctccg 780

ggaaaacgtc acaatctcat gtccttctg gtaaccgaaa aatcccggaa aaatgatcaa 840
tccttcacgg tttctcagac ggtacaaatg accataagac tcaggaggca cctgcgcgct 900
tccgggttca tccgtcacia acagccccgc ttctttcgga cttacgtatt ccgctttcac 960
gccctgccgt cggaagtagg ctgcatcag cttcgcgttg ttgtcctcgc cgctcgcctt 1020
caccgcatcc atatatgtt cgggattggt ttacagctg tttaaaagag cgaataggtc 1080
actgcggatt ctttctataa tagagaaatc caggttcagc tcacgcgcga tggcggcgta 1140
ccgttcaatg accgtttcgg caagctcggg cgctacacct ttttgcaaat aatgctccgc 1200
acagcggatt aacagatccg tcacctttgt atcgtccgag aagcgttttc ccggtgccga 1260
tacgacgacg gctttccgcg cgggatcagc cgtcacgatt tgaaacactt tctcaagctg 1320
tgctcctgac gcaagagagc tgctccgaa ttttacaact ttcac 1365

```

5

```

<210> 9
<211> 1394
<212> ADN
<213> Listeria innocua

```

10

<400> 9  
atgaaagtaa ttaaatttgg cggaagctct tttagcatcag ggattcaatt aaataaggtt 60  
ttccaacttg tagcggagga ttctgaacga aagatcgtcg ttgtttctgc acctggaaag 120  
cgtttcaagg acgatacaaa agtgaccgat ttacttattg attgtgcggc aaaagcactt 180  
ctaggcgaag atacgagtga actatttgaa gccgtcattg cgagatatgc tggcattgcc 240  
cttgatacag gaatggatga cgcgattatc acacaaattc gcgccgactt acaaaagact 300  
atttcgtctg ataaaagcga tcctgataaa tttttagatc gaatgaaggc tagtggagaa 360  
gacaataatg cgaaattaat cgctgcttat tttaaattca aaggcttaaa cgccaactat 420  
gttaatccaa aagatgctgg attatttctg acggatgaac atgctagtgc ccaagttctt 480  
cctgagtctt atgaccgttt atttgcgctt cgagagcgag aaggatcat tgtttttcca 540  
ggattttctg gttatacgaag agacggtgaa atcagtacat tttctcgaag tggctctgat 600  
attactggag cgattgtcgc aaacggggct caagctgagt tatacgagaa ctttactgat 660  
gttgatgcag tgtatgcggt caatcccgtt attgtgaaaa atccgaagaa agttcttgaa 720  
ctgacttacc gggaaatgcg cgaactttct tatgcaggct tttctgtttt tcatgatgaa 780  
gcactgattc cggcgttcca tgcgggtatt cctgtgcata ttaaaaatac gaacaatcct 840  
gattcttggt gtacacgtgt cgttcatgaa cgcgaaaaca ataatggtcc tgtcgttggg 900  
attgctagtg atgatggctt ttgtagcatt tatattagta aatatttgat gaaccgcgaa 960  
attggcttcg gacggaaagt gctgcaaatt ctggaagatg ctggattgaa ttatgaacat 1020  
atgccgtctg ggattgatga ttaacgatt attattcgtg aaaatcagtt tggtgaggac 1080  
acagagcgga cgattatgac gcggttaaaa gaagaattaa atgccgatca agtgattatg 1140  
caacatggta tctccctgat tatggctcgtt ggtgaagcta tgcgccataa tgttgaata 1200  
  
acctcgcgtg cttcgaagc tttatctgac gcgaaagtga atattgaaat gattaatcaa 1260  
ggttcttctg aagtaagtat tatgtttggg gtgaaggaag aacaggaaaa tacggccggt 1320  
cgcgactat acaatgaatt cttttcagaa gtcttagtct aacaagtttt tcatcctgat 1380  
tgatgagaaa cttg 1394

5 <210> 10  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador

15 <400> 10  
tctaccttcg ttgaggaaga 20

<210> 11  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 11  
 5 cactcctgaa cggttaatcc 20  
  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 12  
 15 tgagcagaca agagcgatta 20  
  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 13  
 25 atagatcgct ccgatatggt 20  
  
 <210> 14  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 14  
 35 cctgtgatcg gaattgcaag tgataaagga ttctg 35  
  
 <210> 15  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 15  
 50 atcttcggtc caggagccga tggattattg gtgtt 35  
  
 <210> 16  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
  
 <400> 16  
 60 tcgacatgtg acaacaaact ttttc 25

<210> 17  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 17  
 10 acgcatacca tttgaacga tgacc 25  
 <210> 18  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 18  
 gccgatcct gcagttcatt aaagagcagc 30  
 <210> 19  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 19  
 cgcgacatgt actacctct atttatg 27  
 <210> 20  
 <211> 26  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador  
 <400> 20  
 cgcggcatgc gttcaatga agatcc 26  
 45 <210> 21  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 21  
 55 ttaagcatgc aaaaggccag gaaccg 26  
 <210> 22  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 22  
 65 ttttgtacc cgccataggt ctagag 26

<210> 23  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 23  
 10 gggcgggtacc ttattcttta gtctatc 27  
 <210> 24  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 24  
 ccgaacatgt gggattaatt gtcc 24  
 <210> 25  
 <211> 26  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 25  
 ttccggtacc cagcaaattg aacagc 26  
 <210> 26  
 <211> 34  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> cebador  
 <400> 26  
 gcgcacatgt gaaaattatc gttcaaaaat tcgg 34  
 45 <210> 27  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 27  
 55 gctaggtacc gctcctctc attctatc 28  
 <210> 28  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 28  
 65 gcgcacatgt gaaagtagcg aagttggag gttcttc 37

<210> 29  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> cebador  
 <400> 29  
 10 gctaggtacc agtgttcac acccaaattc g 31  
 <210> 30  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 20 <400> 30  
 gcgcacatgt gggcaagaa aatggtcttc 30  
 <210> 31  
 <211> 27  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> cebador  
 30 <400> 31  
 atggtacctg cccccgaatt tttgaac 27  
 <210> 32  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> cebador  
 40 <400> 32  
 gcgcacatgt ggttcattt ggtcgaatat c 31  
 <210> 33  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> cebador  
 50 <400> 33  
 atggtaccgg cagtaaaaac tcattgat 29  
 <210> 34  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> cebador  
 60 <400> 34  
 65 gcgcacatgt gtatttcat gcacaaca 29

# ES 2 626 405 T3

<210> 35  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> cebador

10 <400> 35  
atggtaccgc agcttagtat cttactct

28

## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir L-lisina en *B. methanolicus*, comprendiendo dicho método introducir en dicho *B. methanolicus* una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima AKIII, de manera que se sobreexpresa una enzima AKIII, en la que dicha secuencia nucleotídica
- 5
- (i) es la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO. 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con SEQ ID NO. 3 (o más particularmente al menos 77, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 95, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3) o una secuencia de nucleótidos que
- 10
- hibrida con el complemento de SEQ ID NO. 3 bajo condiciones de alta restricción (SSC 0.1x, SDS al 0.1%, 65°C, y condiciones de lavado: SSC 2x, SDS al 0.1%, 65°C, seguido de SSC 0.1x, SDS al 0.1%, 65°C); o
- (ii) codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 4 o una secuencia de aminoácidos que
- 15
- tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 (o más particularmente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4).
2. Un microorganismo de *B. methanolicus* que sobreexpresa una enzima AKIII en la que dicho *B. methanolicus* ha sido modificado introduciendo una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que
- 20
- codifica una enzima AKIII, en la que dicha secuencia nucleotídica
- (i) es la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO. 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con SEQ ID NO. 3 (o más particularmente al menos 77, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 95, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 3) o una secuencia de nucleótidos que
- 25
- hibrida con el complemento de SEQ ID NO. 3 bajo condiciones de alta restricción (SSC 0.1x, SDS al 0.1%, 65°C, y condiciones de lavado: SSC 2x, SDS al 0,1%, 65°C, seguido de SSC 0.1x, SDS al 0.1%, 65°C); o
- (ii) codifica la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 4 o una secuencia de aminoácidos que
- 30
- tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4 (o más particularmente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 4).
3. El método o microorganismo de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha secuencia de nucleótidos:
- 35
- (i) es una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 3; o
- (ii) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO. 4.
4. El método o microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el AKIII es sensible a la
- 40
- inhibición por retroalimentación.
5. El método o microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el AKIII es resistente a la
- inhibición por retroalimentación.
- 45
6. El método o microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el *B. methanolicus* o microorganismo es un *B. methanolicus* o microorganismo de tipo salvaje.
7. El método o microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el *B. methanolicus* o
- 50
- microorganismo es un auxotrofo o un mutante resistente a un análogo de lisina.
8. El método o microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el AKIII se sobreexpresa
- en combinación con la expresión o sobreexpresión de otros genes en el microorganismo.
9. El método o microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la molécula de ácido
- 55
- nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un AKIII se expresa a partir de un promotor no nativo.
10. El método o microorganismo de la reivindicación 9, en el que el promotor es un promotor fuerte.
- 60
11. El método o microorganismo de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que la expresión de la secuencia de nucleótidos no está sujeta a represión transcripcional.
12. Una molécula de ácido nucleico, que codifica un polipéptido que tiene actividad de AK o que es su complemento,
- 65
- que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (i) la secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 1 o 3,

- 5 (ii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, más particularmente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos según el conjunto en SEQ ID NO: 1,
- 10 (iii) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia, más particularmente al menos 77, 79, 80, 81, 83, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 93, 95, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia, con la secuencia de nucleótidos como se establece en SEQ ID NO: 3;
- 15 (iv) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se establece en SEQ ID NO: 2 o 4;
- 20 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 2;
- 25 (vi) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia, con la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO. 4; y
- 30 (vii) una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (i) a (vi).
- 35 13. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 12, en la que dicha secuencia de nucleótidos:
- 40 (i) tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 3;
- 45 (ii) codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2; o
- 50 (iii) codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 4.
- 55 14. Un polipéptido que tiene actividad de AK y que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:
- 60 (i) la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 2 o 4,
- (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 2 ; y
- (iii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 4.
15. El polipéptido de la reivindicación 14, en el que dicha secuencia de aminoácidos:
- (i) tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 2; o
- (ii) tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO. 4.
16. Una construcción que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima AKIII operativamente unida a un promotor no nativo, en donde dicha molécula de ácido nucleico es como se define en la reivindicación 12 o 13 con referencia a SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4.
17. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en la reivindicación 12 o 13 o un constructo como se define en la reivindicación 16.
18. Un microorganismo huésped en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico, constructo o vector según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 12, 13, 16 o 17.

Figura 1

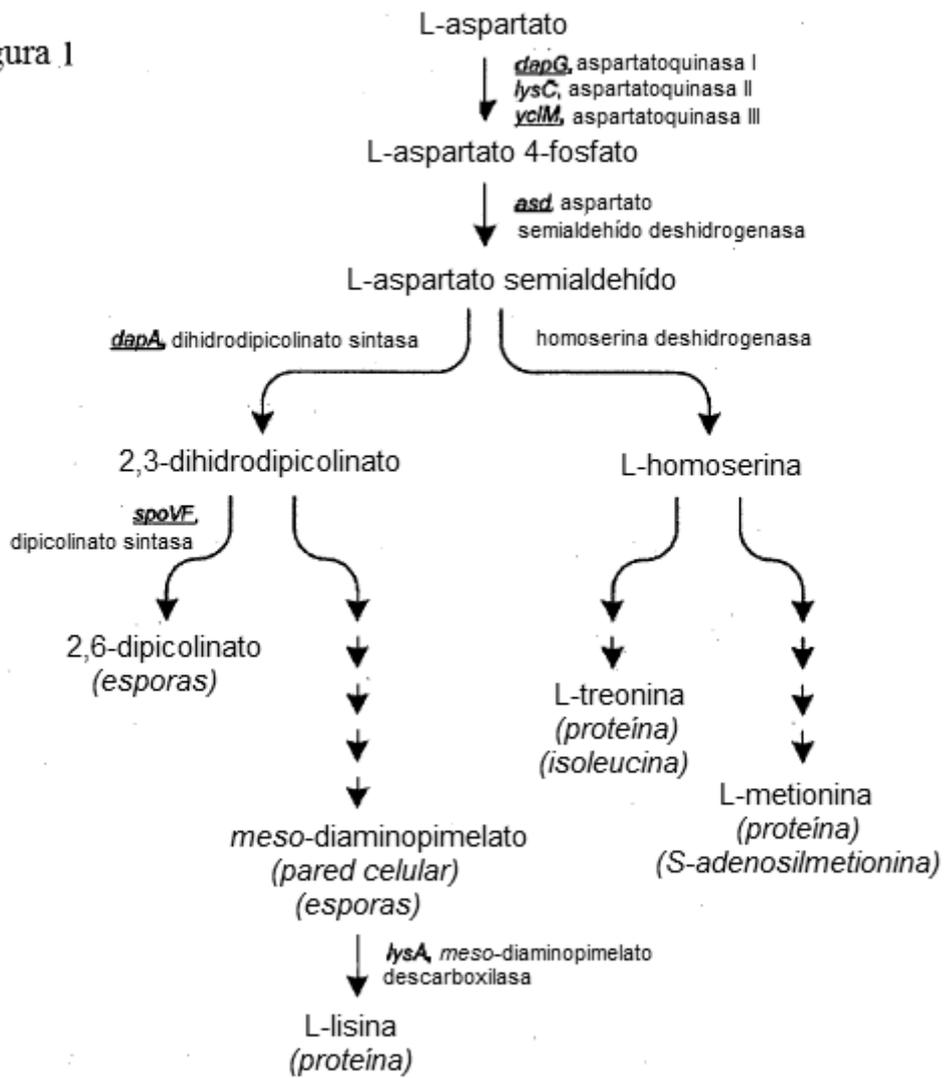


Figura 2

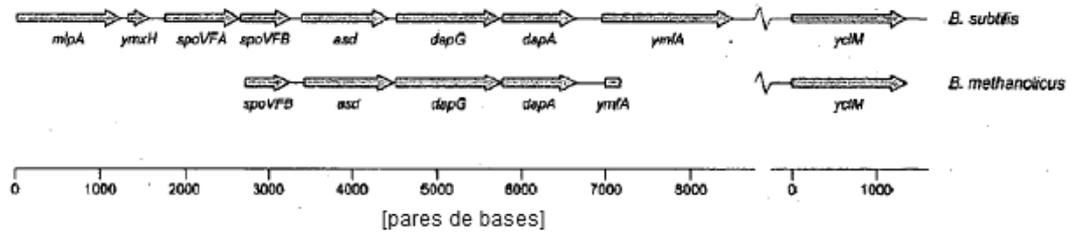


Figura 3

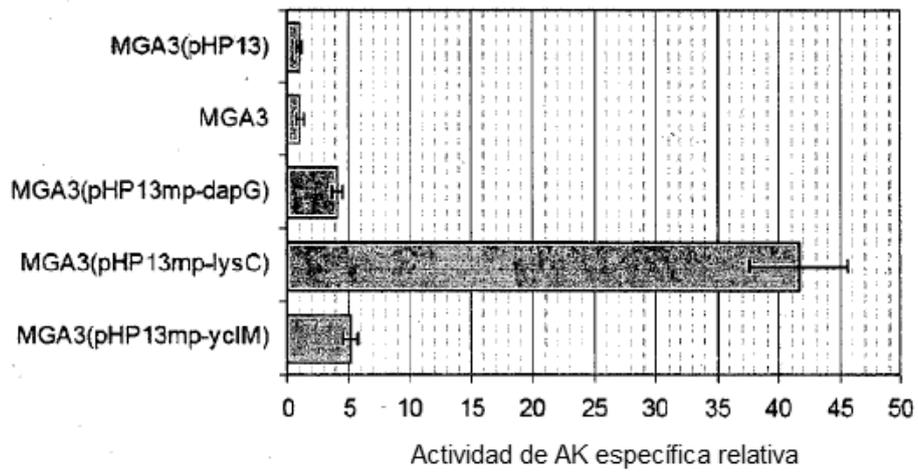


Figura 4

