

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 092**

51 Int. Cl.:

C12N 9/06 (2006.01)

C12P 17/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014** **E 14178598 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018** **EP 2829602**

54 Título: **Variante de L-aspartato oxidasa y procedimiento para la producción de quinolinato o ácido nicotínico utilizando la misma**

30 Prioridad:

25.07.2013 KR 20130088240

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

18.04.2018

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
Dongho-ro 330 Ssangnim-dong Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SO YOUNG;
SHIN, YONG UK;
HEO, IN KYUNG;
KIM, JU EUN;
NA, KWANG HO;
SEO, CHANG IL;
SON, SUNG KWANG y
LEE, JAE HEE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 664 092 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

Variante de L-aspartato oxidasa y procedimiento para la producción de quinolinato o ácido nicotínico utilizando la misma

Campo de la técnica

- 5 La invención se refiere a variantes de L-aspartato oxidasa, microorganismos productores de quinolinato que incluyen genes que codifican variantes de L-aspartato oxidasa, y procedimientos de producción de quinolinato o ácido nicotínico con alta eficacia utilizando los microorganismos.

Técnica antecedente

- 10 El ácido nicotínico es un óxido de nicotina y uno del complejo de vitaminas B. Es una vitamina hidrosoluble, que también se llama niacina, o vitamina B₃ y es prevalente en animales y plantas. La deficiencia de ácido nicotínico puede producir la enfermedad pelagra o neuropatías. En general, el ácido nicotínico está en forma de coenzima amida del ácido nicotínico, es decir, dinucleótido nicotinamida adenina (NAD) o fosfato del dinucleótido nicotinamida adenina (NADP), *in vivo*, y está implicado en reacciones de oxidación reducción.

- 15 El quinolinato, que también se llama ácido quinolínico, se produce por oxidación de la quinolina. Se sabe que el ácido quinolínico tiene neurotoxicidad y produce distintos trastornos neurológicos. El quinolinato se conoce también como un precursor del ácido nicotínico.

- 20 El ácido nicotínico que es ampliamente aplicable a los alimentos y productos medicinales puede prepararse por un procedimiento sintético químico o un procedimiento de producción biológico. La síntesis química del ácido nicotínico puede dar como resultado grandes cantidades de residuos tóxicos incluyendo catalizadores. Por lo tanto, los residuos necesitan un tratamiento completo y un gran gasto para desecharlos. Además, la pirimidina que se utiliza como precursor tiene distintos derivados, y entonces las fluctuaciones del suministro y el precio de la pirimidina pueden producir un precio inestable del ácido nicotínico.

- 25 Para resolver dichos problemas del procedimiento de síntesis química, se han estudiado procedimientos biológicos de producción de ácido nicotínico utilizando materiales derivados de carbohidratos renovables. La producción biológica de ácido nicotínico se consigue principalmente mediante dos rutas biosintéticas, una de las cuales es una ruta biosintética de ácido nicotínico a partir de triptófano como un material de partida en eucariotas, y la otra es a partir de ácido aspártico como material de partida en procariotas. Ambas rutas utilizan quinolinato como intermediario, y se biosintetiza ácido nicotínico a partir quinolinato por la acción de la quinolinato fosforribosil transferasa (*nadC*) nicotinato-mononucleótido adenil transferasa (*nadD*), NAD sintetasa (*nadE*), nicotinamida-nucleótido adenil transferasa (NMN *nadR*), y nicotinamidasa (*pncA*).

- 30 Los procedimientos de síntesis biológica del ácido nicotínico utilizando *E. coli* o *Corynebacterium glutamicum* recombinantes mediante la ruta de ácido aspártico se ha desvelado (Patente coreana N° 10-1223904). El documento WO 2012096553 se refiere a un procedimiento para la preparación de ácido nicotínico, que comprende las etapas de: obtención de una solución de cultivo que contiene ácido quinolínico incubando un microorganismo que tiene la capacidad para producir ácido quinolínico; y la adición de un ácido a la solución de cultivo y llevar a cabo la reacción de descarboxilación. Este documento menciona que el aumento de aspartato oxidasa se puede conseguir por una o más de las vías que se seleccionan de entre: (i) la vía para aumentar el número de copias genómicas de genes intracelulares que codifican la aspartato oxidasa, (ii) la vía para modificar la expresión de secuencias reguladoras de dichos genes, y (iii) la vía para reemplazar dicho gen con un gen modificado cuya actividad enzimática está
- 35 aumentada. Aunque los inventores de la presente invención investigaron para afrontar estos problemas de dichos procedimientos de síntesis biológica del ácido nicotínico para mejorar el rendimiento de quinolinato o ácido nicotínico, encontraron variantes enzimáticas implicadas en la producción de alto rendimiento de quinolinato y completar la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

La invención proporciona variantes de L-aspartato oxidasa que demuestra que se libera la regulación por retroalimentación mediante ácido nicotínico o dinucleótido nicotinamida adenina (NAD).

La invención proporciona microorganismos productores de quinolinato que incluyen las variantes de L-aspartato oxidasa.

- 50 La invención proporciona procedimientos de producción de quinolinato cultivando los microorganismos.

La invención proporciona procedimientos de producción de ácido nicotínico cultivando los microorganismos y la descarboxilación de quinolinato.

Solución técnica

En consecuencia, la presente invención proporciona una variante de L-aspartato oxidasa que comprende la secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: 1 que en la posición 302ª de la SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido en el que el otro aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina, glicina, alanina, serina, treonina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, asparagina, glutamina, e histidina.

La L-aspartato oxidasa tiene una actividad catalítica de oxidación del L-aspartato a iminosuccinato, como se representa en el Esquema de Reacción 1.

<Esquema de reacción 1>



La L-aspartato oxidasa desvelada en el presente documento puede comprender la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1. Sin embargo, no se limita a esta, debido a que puede haber diferencias en las secuencias de aminoácidos de la proteína dependiendo de la especie o las cepas microbianas. En otras palabras, puede ser una proteína mutante o variante artificial con una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o más localizaciones de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, a condición de que pueda oxidar el L-aspartato a iminosuccinato. En el presente documento “varios” puede diferenciarse dependiendo de la localización o tipo en la estructura tridimensional de los restos de aminoácidos de la proteína, pero especialmente significa de 2 a 20, específicamente de 2 a 10, y más específicamente de 2 a 5. Además, la sustitución, eliminación, inserción, adición o inversión del aminoácido incluye las producidas por variantes artificiales o mutación natural, se basa en la diferencia en los individuos o especies de un microorganismo.

El polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la presente invención puede comprender la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, o la secuencia de aminoácidos con un 80 % o más, específicamente un 90 % o más, más específicamente un 95 % o más, y particularmente específicamente un 97 % o más de homología con la misma, a condición de que tenga una actividad similar a la L-aspartato oxidasa. Más específicamente, puede ser la secuencia de polinucleótido representada en la SEQ ID NO: 24.

El término “homología” se refiere a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos y que se puede determinar por el procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica, utilizando BLAST 2.0 para computar parámetros tales como la valoración de la identidad y similitud.

Además, la secuencia de polinucleótido que codifica la L-aspartato oxidasa de la presente invención se puede hibridar con el polinucleótido de SEQ ID NO: 24 o la sonda preparada a partir de la misma en ‘condiciones rigurosas’, y puede ser una variante modificada de la secuencia de polinucleótido que codifica la L-aspartato oxidasa que funciona normalmente. Como se utiliza en el presente documento, “condiciones rigurosas” se refiere a condiciones que permiten la hibridación específica entre el polinucleótido y se describen específicamente, por ejemplo, en Molecular Cloning (A Laboratory Manual, J. Sambrook y col., Editores, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) o en Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col., Editores, John Wiley & Sons, Inc., New York). Por ejemplo, que describe, por ejemplo, que la hibridación se lleva a cabo en el tampón de hibridación a 65 °C (3,5x SSC, un 0,02 % de polivinilpirrolidona, un 0,02 % de seroalbúmina bovina, 2,5 mM de NaH₂PO₄ (pH 7), un 0,5 % de SDS, 2 mM de EDTA). SSC es 0,15 M de cloruro sódico/0,15 M de citrato sódico de pH 7. Después de la hibridación, la membrana en que se suministra el ADN se aclara con 2x de SSC a temperatura ambiente y después se aclara para limpiar de nuevo con 0,1 a 0,5x de SSC/0,1x de SDS a una temperatura de 68 °C.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “otro aminoácido” se refiere a otro resto de aminoácido excepto el aminoácido localizado originalmente en la secuencia de aminoácidos antes de la modificación. Específicamente el otro aminoácido de la presente invención puede incluir un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en arginina, glicina, alanina, serina, treonina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, e histidina, excepto lisina. Específicamente, el otro aminoácido puede incluir un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en arginina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, e histidina. Por ejemplo, el otro aminoácido puede incluir arginina.

Como se utiliza en el presente documento, el término “302ª” se refiere a la posición del aminoácido metionina de la secuencia de aminoácido representada por la SEQ ID NO: 1, ya que la metionina de la secuencia de aminoácidos se cuenta como el primer resto de aminoácido.

En general, la actividad de la L-aspartato oxidasa se regula por el ácido nicotínico o NAD acumulado en los microorganismos, en otras palabras, su regulación por retroalimentación se inhibe por el ácido nicotínico o NAD. La regulación por retroalimentación por el ácido nicotínico o NAD se puede liberar en las variantes de L-aspartato oxidasa de la presente invención, a diferencia de la L-aspartato oxidasa común.

- 5 El otro aspecto de la presente invención proporciona un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica las variantes de L-aspartato oxidasa.

En una realización de la presente invención, un polinucleótido puede tener una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de L-aspartato oxidasa que tiene una secuencia de aminoácidos con un 302º aminoácido en la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1 se sustituye con otro aminoácido.

- 10 El 302º aminoácido incluye un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en arginina, glicina, alanina, serina, treonina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, e histidina. En consecuencia, la secuencia de nucleótidos correspondiente al aminoácido 302º se sustituye apropiadamente. En una realización específica, los nucleótidos 904º a 906º en una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 24 puede sustituirse apropiadamente con cualquier combinación de nucleótidos excepto de AAG, AAA, TAA, TAG, y TGA.

Otro aspecto de la presente invención, proporciona un vector que incluye un polinucleótido descrito anteriormente, que está unido operativamente a una secuencia reguladora.

- 20 El polinucleótido puede tener una secuencia de nucleótidos en la que los nucleótidos 904º a 906º de la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 24 se han sustituido con cualquier combinación de nucleótidos excepto AAG, AAA, TAA, TAG, y TGA. El polinucleótido puede estar unido operativamente a una secuencia reguladora. La secuencia reguladora puede regular la expresión de L-aspartato oxidasa, e incluye un promotor, un terminador, o un amplificador.

- 25 El vector de la presente invención no se limita específicamente, y puede ser cualquier vector conocido en la técnica. Por ejemplo, el vector puede ser el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen, U.S.A) o pECCG117 (KFCC-10673), pero no se limita a los mismos.

El promotor de la presente invención puede ser un promotor lambda PL, un promotor trp, un promotor lac, un promotor T7, un promotor pPro, un promotor pCJ1, o un promotor pCJ7 (Patente coreana N° 10-0620092). En una realización específica, el promotor puede ser un promotor pCJ1, pero no está limitado al mismo.

- 30 El promotor puede estar unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un gen. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una unión funcional entre una secuencia reguladora de la expresión de un ácido nucleico (por ejemplo, un promotor, una secuencia de señal, una matriz de sitios de unión al factor regulador transcripcional, un terminador, o un amplificador) y otras secuencias de nucleótidos. En consecuencia, la secuencia reguladora puede regular la transcripción y/o traducción de la secuencia de nucleótidos que codifica el gen.

- 35 Otro aspecto de la presente invención proporciona un microorganismo que comprende un polinucleótido descrito anteriormente, en el que el polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleósidos que codifica una secuencia de aminoácido en la que el aminoácido 302º de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido.

- 40 En una realización específica, de acuerdo con la sustitución del aminoácido 302º de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, puede sustituirse parte de una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 24. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender un polinucleótido en el que los nucleótidos 904º a 906º de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 24 se han sustituido con otros nucleótidos.

- 45 El polinucleótido puede obtenerse mediante mutación aleatoria o por modificación genética. Se puede construir un microorganismo, en el que parte de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido parcialmente, por transformación del polinucleótido obtenido.

- 50 Como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" se refiere a la introducción de un gen en una célula huésped en la que se va a expresar. El gen transformado puede ser cualquier gen, por ejemplo, que esté insertado en un cromosoma de la célula huésped, o que esté fuera del cromosoma de la célula huésped, a condición de que el gen introducido se pueda expresar en la célula huésped. El gen incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido, tal como un ADN y ARN. Por ejemplo, se puede introducir el gen en forma de un casete de expresión que es una estructura de polinucleótido que incluye todos los elementos necesarios de la auto-expresión del gen en una célula huésped. Normalmente, el casete de expresión puede incluir un promotor unido operativamente al gen, una señal terminadora de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión que sea auto-replicable. El gen se puede introducir también en una célula huésped por sí mismo o en forma de una estructura de polinucleótido y se une operativamente a una secuencia que es necesaria para la expresión en la célula huésped.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “microorganismo que tiene la capacidad para producir quinolinato” se refiere a un microorganismo capaz de producir quinolinato a partir de una fuente de carbono en un medio de cultivo y de acumular quinolinato.

Para mejorar la capacidad para producir quinolinato, se necesita que los microorganismos produzcan grandes cantidades de quinolinato, y el quinolinato producido se puede acumular sin utilizarse en otras vías. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la presente invención, el microorganismo que tiene una capacidad mejorada para producir quinolinato se puede obtener retirando o debilitando la actividad de la quinolinato fosforribosil transferasa que está implicada en una ruta de descomposición de quinolinato, aumentando la expresión o actividad de la quinolinato sintetasa que está implicada en una ruta sintética de quinolinato, o por combinación de los mismos.

En una realización específica, el microorganismo que tiene una capacidad mejorada para producir quinolinato puede modificarse adicionalmente para aumentar la actividad de la quinolinato sintetasa. Específicamente, el aumento de actividad de la quinolinato sintetasa se puede conseguir introduciendo adicionalmente la quinolinato sintetasa para aumentar la expresión de la misma en el microorganismo. El aumento de actividad de la quinolinato sintetasa se puede conseguir también sustituyendo un promotor unido a la quinolinato sintetasa en el microorganismo por un promotor fuerte. Además, el aumento de la actividad de la quinolinato sintetasa se puede conseguir aumentando la actividad de la propia quinolinato sintetasa.

En el caso en el que se introduce una quinolinato sintetasa heterogénea, se puede introducir un polinucleótido que codifica esta enzima para aumentar la expresión del polinucleótido. El polinucleótido que codifica la quinolinato sintetasa puede expresarse en un plásmido del microorganismo o se puede insertar en un cromosoma del microorganismo y expresarse en el mismo.

La quinolinato sintetasa puede tener una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29 o puede tener una secuencia de aminoácido que es homóloga a la misma. En otras palabras, no se limita a esta, debido a que puede haber diferencias en la secuencia de aminoácidos de la proteína dependiendo de las especies o cepas microbianas. Puede ser una proteína mutante o una variante artificial comprendiendo la secuencia de aminoácidos una sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o más localizaciones de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 29, a condición de que pueda sintetizar ácido quinolínico a partir de ácido iminosuccínico. La secuencia del gen *nadA* que codifica esta se puede obtener de la secuencia del genoma (gi: G1:89109380) de *Escherichia coli* (*E. coli*) como se desvela en un artículo (Mol Syst Biol., 2006; 2:2006.0007., Epub 21 de Feb de 2006) o la base de datos disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) o el Banco de Datos de Japón (DDBJ). También, el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos puede comprender la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 29, o la secuencia de aminoácidos de un 80 % o más, específicamente un 90 % o más, más específicamente un 95 % o más, y particularmente específicamente un 97 % o más de homología con la misma, a condición de que tenga una actividad similar a la L-aspartato oxidasa. Más específicamente, puede ser la secuencia de polinucleótido representada por la SEQ ID NO: 26.

La quinolinato sintetasa tiene una actividad de sintetizar ácido quinolínico a partir de ácido iminosuccínico, como se muestra en el Esquema de Reacción 2.

<Esquema de Reacción 2>



Por lo tanto, cuando la expresión de un gen que codifica la quinolinato sintetasa o la actividad de esta enzima están aumentadas, el rendimiento de quinolinato en la célula puede estar aumentado.

En algunas realizaciones, el microorganismo que tiene la capacidad para producir quinolinato, las actividades de ácido aspártico oxidasa y quinolinato sintetasa puede aumentarse sustituyendo los promotores endógenos por promotores fuertes, induciendo una mutación en los promotores, o aumentando el número de copias de los genes. Para la sustitución con promotores fuertes, se pueden utilizar promotores conocidos en la técnica en general, que incluyen pTac, pTrc, pPro, pR, pL, pCJ1, pCysK, y similares.

En una realización específica, se proporciona un microorganismo que tiene una capacidad mejorada para producir quinolinato en el que la actividad de la quinolinato fosforribosil transferasa puede estar adicionalmente reducida o eliminada.

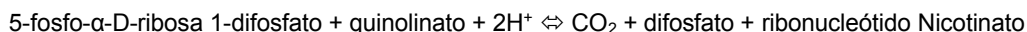
La actividad de la quinolinato fosforribosil transferasa se puede reducir o eliminar modificando un gen que codifique la quinolinato fosforribosil transferasa o utilizando un microARN que suprima la transcripción.

La quinolinato fosforribosil transferasa puede tener una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30 o una secuencia de aminoácidos que sea altamente homóloga de la misma. En otras palabras, no se limita a esto, debido a que puede haber diferencias en la secuencia de aminoácidos de la proteína dependiendo de las especies o cepas microbianas. Puede ser una proteína mutante o una variante artificial con una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o

más localizaciones de la secuencia de aminoácido representada por la SEQ ID NO: 30, a condición de que pueda sintetizar el mononucleótido de ácido nicotínico (nicotinato) a partir de quinolinato.

La quinolinato fosforribosil transferasa puede tener una actividad para sintetizar mononucleótido de ácido nicotínico a partir de quinolinato, como se muestra en el Esquema de Reacción 3. Por lo tanto, el rendimiento de quinolinato en células puede aumentarse eliminando un gen que tenga actividad para sintetizar ácido nicotínico o debilitando la actividad del gen.

<Esquema de Reacción 3>



El debilitamiento o eliminación de la actividad de la quinolinato fosforribosil transferasa se puede llevar a cabo sustituyendo un gen endógeno que codifica la quinolinato fosforribosil transferasa con un gen modificado para debilitar o eliminar la actividad de la enzima, sustituyendo un promotor del gen endógeno con un promotor débil, o eliminando el gen endógeno que codifica la enzima en el cromosoma.

En una realización específica, en el microorganismo que tiene una actividad mejorada para producir quinolinato, la actividad de la quinolinato fosforribosil transferasa que convierte el quinolinato en mononucleótido ácido nicotínico se puede eliminar. En este extremo, el gen *nadC* que codifica quinolinato fosforribosil transferasa se puede eliminar del genoma de un microorganismo por recombinación homóloga. La secuencia del gen *nadC* se puede obtener de la secuencia de genoma (GI:89106990) of *E. coli* que se desvela en un artículo (Mol Syst Biol., 2006; 2:2006.0007, Epub 21 de Feb de 2006), o la base de datos disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) o el Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ). También, el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos puede comprender la secuencia de polinucleótido que codifica la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 30, o la secuencia de aminoácidos con un 80 % o más, específicamente un 90 % o más, más específicamente un 95 % o más, y particularmente específicamente un 97 % o más de homología con la misma, a condición de que tenga una actividad similar que la L-aspartato oxidasa. Más específicamente, puede ser la secuencia de polinucleótido representada por la SEQ ID NO: 25.

En una realización específica, el microorganismo que tiene una capacidad para producir quinolinato puede ser un microorganismo procariota o un microorganismo eucariota.

En algunas realizaciones, el microorganismo que tiene la capacidad para producir quinolinato puede pertenecer al género *Enterobacter*, género *Escherichia*, género *Erwinia*, género *Serratia*, género *Providencia*, género *Corynebacterium* y género *Brevibacterium*, pero no se limita a estos.

En una realización específica, el microorganismo que tiene la capacidad para producir quinolinato puede pertenecer al género *Escherichia*.

Específicamente, el microorganismo que tiene la capacidad para producir quinolinato puede ser *Escherichia coli* (*E. coli*).

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de producción de quinolinato, que comprende: el cultivo de un microorganismo que incluye un polinucleótido que codifica una L-aspartato oxidasa en la que el aminoácido 302º de una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 se ha sustituido por otro aminoácido, en el que el otro aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina, glicina, alanina, serina, treonina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, e histidina; y la recuperación de quinolinato de la solución de cultivo.

El cultivo del microorganismo se puede llevar a cabo utilizando un medio de cultivo adecuado en condiciones de cultivo adecuadas que son bien conocidas en la técnica. Dichos procedimientos de cultivo se pueden utilizar por un experto en la técnica y se pueden ajustar fácilmente dependiendo del microorganismo seleccionado. El procedimiento de cultivo puede incluir un tipo de cultivo discontinuo, un tipo de cultivo continuo, y un tipo de cultivo semi-continuo, pero no se limita a estos. Se desvelan distintos ejemplos de procedimientos de cultivo, por ejemplo en "Biochemical Engineering" (por James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp 138-176").

El medio de cultivo que se utiliza en el procedimiento de cultivo se necesario para satisfacer las condiciones adecuadas para un microorganismo seleccionado. Se desvelan distintos medios de cultivo para microorganismos, por ejemplo, en "Manual of Methods for General Bacteriology (por the American Society for Bacteriology, Washington D.C., U.S.A, 1981)". Por ejemplo, el medio de cultivo puede incluir distintas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y elementos traza.

Ejemplos de fuentes de carbono disponibles para el medio de cultivo puede incluir carbohidratos, tales como la glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, y almidón; aceites y grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino, y aceite de coco; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico, y ácido linoleico, alcoholes, tales como glicol y etanol; y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, que se pueden utilizar solos o en combinación, pero sin limitarse a estas.

Ejemplos de fuentes de nitrógeno disponibles del medio de cultivo pueden incluir fuentes de nitrógeno orgánico, tal como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, líquido de maceración de maíz (CSL), harina de soja, y urea; y fuentes de nitrógeno inorgánico, tales como sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico, y nitrato amónico, que se pueden utilizar solos o en combinación, pero sin limitarse a estas.

Ejemplos de fuentes de fósforo disponibles para los medios de cultivo pueden incluir fosfato dihidrógeno de potasio, fosfato hidrógeno dipotásico, y sus sales que contienen sodio correspondientes. En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede incluir también sales metálicas tales como sulfato magnésico o sulfato de hierro. En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede incluir adicionalmente aminoácidos, vitaminas, y precursores adecuados, además de los componentes enumerados anteriormente. El medio de cultivo para cultivar microorganismos, o los componentes individuales se pueden añadir a una solución de cultivo de una manera discontinua o continua.

En algunas realizaciones, durante el cultivo, el pH de la solución de cultivo se puede ajustar añadiendo un compuesto, por ejemplo, hidróxido amónico, hidróxido potásico, amoníaco, ácido fosfórico, o ácido sulfúrico de una manera apropiada. Además, durante el cultivo se puede suprimir la formación de espuma en el cultivo utilizando un agente anti-espumante tal como un ácido graso, por ejemplo éster de poliglicol. Para mantener el cultivo en una condición aeróbica, se debe suministrar oxígeno o un gas que contienen oxígeno (por ejemplo, aire) en la solución de cultivo. La temperatura de la solución de cultivo se puede mantener en un intervalo de temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, específicamente aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C. El cultivo se puede mantener hasta que se obtenga una cantidad diana de quinolinato, específicamente, el periodo puede ser de aproximadamente horas a 160 horas.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento de producción de ácido nicotínico, que comprende: el cultivo de un microorganismo que incluye un polinucleótido que codifica L-aspartato oxidasa en la que el aminoácido 302º de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1 se ha sustituido por otro aminoácido; y llevando a cabo la reacción de descarboxilación añadiendo un ácido al producto cultivado.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “reacción de descarboxilación” se referirá a una reacción para producir ácido nicotínico eliminando un grupo carboxilo del quinolinato y liberando dióxido de carbono.

En particular, después del cultivo del microorganismo, la solución de cultivo que incluye el quinolinato resultante puede someterse a centrifugación o filtración por una membrana para retirar el microorganismo. Entonces, para acelerar la reacción de descarboxilación, se puede añadir un ácido que proporcione un grupo hidrógeno en la solución de cultivo que incluye el quinolinato. Se puede utilizar cualquier ácido sin limitación, a condición de que proporcione un grupo hidroxilo a la solución de cultivo.

En una realización, la solución de cultivo que incluye el quinolinato se puede utilizar sin purificación.

En una realización, el ácido que se añade a la solución de cultivo puede ser ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

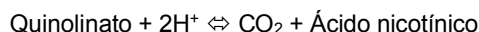
En una realización, después de la adición del ácido, la solución de cultivo puede tener un pH de aproximadamente 5 o menos, o puede estar específicamente en un intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 3.

En una realización, la reacción de descarboxilación de la solución de cultivo se puede llevar a cabo a una temperatura de aproximadamente 100 °C a aproximadamente 150 °C, o puede estar en un intervalo de aproximadamente 120 °C a aproximadamente 135 °C.

En una realización, la reacción de descarboxilación de la solución de cultivo se puede llevar a cabo a una presión de aproximadamente 0,1 MPa a aproximadamente 0,5 MPa o puede llevarse a cabo específicamente a una presión de aproximadamente 0,2 MPa a aproximadamente 0,4 MPa.

Al llevar a cabo la descarboxilación en condiciones de alta temperatura y alta presión durante aproximadamente 1 horas a 3 horas después de la adición de un ácido en la solución de cultivo que incluye quinolinato, el quinolinato de la solución de cultivo se puede convertir en ácido nicotínico, como se muestra en el Esquema de Reacción 4.

<Esquema de reacción 4>



En una realización, el procedimiento de producción de ácido nicotínico puede incluir adicionalmente la recuperación y purificación del ácido nicotínico.

En una realización, la recuperación de ácido nicotínico se puede llevar a cabo por un procedimiento común conocido en la técnica, incluyendo la filtración de la solución de cultivo y procedimientos de cristalización.

Efectos ventajosos

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el quinolinato se puede producir eficazmente cultivando un microorganismo que incluye una variante de la L-aspartato oxidasa que en la regulación de retroalimentación por ácido nicotínico o NAD, se libera ácido nicotínico. Estos procedimientos que utilizan el microorganismo pueden resolver los problemas de los procedimientos de síntesis química convencional, con respecto a los problemas ambientales debido a la generación de subproductos catalíticos, alto consumo de energía y uso de recursos no renovables, y el problema de bajo rendimiento con los procedimientos de biosíntesis convencionales. En consecuencia, estos procedimientos pueden producir quinolinato eficazmente y ácido nicotínico de una manera cuidadosa con el medio ambiente.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 ilustra una ruta para producir ácido nicotínico en un procedimiento de producción de ácido nicotínico de acuerdo con una realización de la presente invención.

Modo de la invención

La presente invención se describirá con mayor detalle en referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solamente con fines ilustrativos y no pretenden limitar el ámbito de la invención.

Ejemplo 1. Preparación de variantes de L-aspartato oxidasa que en la regulación por retroalimentación se libera NAD

<1-1> Construcción del plásmido que expresa L-aspartato oxidasa

Para preparar las variantes de L-aspartato oxidasa, se clonó un gen *nadB* derivado de *E. coli* que codifica la L-aspartato oxidasa silvestre en un vector de expresión. En este extremo, se utilizó un cromosoma de la cepa K12 W3110 de *E. coli* como matriz. La cepa se adquirió en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC N° 23257). Basándose en la secuencia de nucleótidos del gen *nadB* (N° de registro del NCBI "GI:89109380") representada por la SEQ ID NO: 24 obtenida en el GenBank del Instituto Nacional de Salud (GenBank NIH). Se construyeron los cebadores de SEQ ID NO: 2 y 3 que tenían los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción NdeI y BamHI para amplificar la región ORF del gen *nadB*, para la clonación genética.

[Tabla 1]

Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
5' AATTCATATGAATACTCTCCCTGAACATT 3'	2
5' AATTGGATCCCTATACCACTACGCTTGATCAC 3'	3

Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN cromosómico de ADN de *E. coli* K12 W3110 como matriz y los oligonucleótidos representados por las SEQ ID NO: 2 y 3 como cebadores. La polimerasa utilizada era la ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene, EE. UU.), y se llevó a cabo la PCR repitiendo 30 veces un ciclo que comprende la desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 2 minutos. Mediante la PCR, se obtuvo un gen amplificado de aproximadamente 1,9 kb incluyendo el gen *nadB* ORF y los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción NdeI y BamHI.

El gen *nadB* obtenido mediante la PCR se recuperó por elución en gel de agarosa, y entonces se trató con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, seguido por la unión en un vector pProLar (CloneTech, EE. UU.) tratado con las enzimas de restricción NdeI y BamHI de manera que exprese L-aspartato oxidasa a partir del gen *nadB* unido a un promotor pPro. El vector resultante se llamó "vector pPro-nadB".

<1-2> Construcción de una biblioteca de plásmidos de la variante de L-aspartato oxidasa

Para obtener variantes de la L-aspartato oxidasa, se construyó una biblioteca de variantes del gen *nadB* utilizando el vector pPro-nadB obtenido en <1-1> como matriz por PCR con tendencia a error en presencia de dGTP y MnSO₄.

En la PCR con tendencia a error utilizando el vector recombinante pPro-nadB como matriz, se utilizaron los cebadores 4 y 5, las concentraciones de dGTP y MnSO₄ en una mezcla de PCR, que se utilizaron para controlar la tasa GC y una tasa de error, eran 2 mM y 8 mM, respectivamente, y la polimerasa utilizada era ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene, EE. UU.). Se llevó a cabo la PCR repitiendo 30 veces un ciclo que comprendía desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 2 minutos. Mediante la PCR, se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 1,9 kb. Este fragmento de ADN se purificó mediante elución en gel de agarosa, se trató con la enzima de restricción DpnI (NEB, EE.UU.) durante aproximadamente 1 hora, y después se transformó en la cepa DH5α de *E. coli* (Invitrogen, EE. UU.) mediante el procedimiento de CaCl₂. La cepa DH5α de *E. coli* se sembró en frotis sobre un medio Luria-Bertani (LB) en placa-kanamicina (Km) (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, kanamicina 25 µg/l), y se cultivó durante una

noche a 37 °C para obtener colonias resistentes a la kanamicina. Se seleccionaron aleatoriamente diez clones de entre ellas, seguido por secuenciación. Como resultado, la tasa de error del gen *nadB* se estimó que era de 4,5 nucleótidos/1 kb. El número de cepas con una variante del gen *nadB* obtenido era aproximadamente de 3×10^5 o más.

5

[Tabla 2]

Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
5' CTCGAGCATAGCATTTTTATCC 3'	4
5' CAGTGAGCGAGGAAGCGG 3'	5

<1-3> Selección de variantes de L-aspartato oxidasa que presentan regulación de retroalimentación con NAD liberado

<1-3-1> Construcción de una cepa deficiente en L-aspartato oxidasa

El gen *nadB* afecta negativamente la producción de quinolinato bajo la regulación de retroalimentación por NAD (J Biol Chem. 25 de Ene de 1982; 257(2):626-32.). Por esta razón, es importante descubrir la regulación por retroalimentación del gen *nadB* con liberación de NAD. Para seleccionar eficazmente mejor las variantes del gen *nadB*, se retiró un gen *nadB* endógeno de una cepa. Basándose en la secuencia de nucleótidos del gen *nadB* (Registro de NCBI N° "GI:89109380") representada por la SEQ ID NO: 24 obtenida del Gen Bank del Instituto Nacional de Salud (Gen Bank NIH), los cebadores de SEQ ID NO: 6 y 7 capaces de amplificar la región corriente abajo del gen *nadB*, y los cebadores de SEQ ID NO: 8 y 9 capaces de amplificar la región corriente arriba del gen *nadB*, y los cebadores de SEQ ID NO: 10 y 11 capaces de amplificar *loxpCm*.

10

15

[Tabla 3]

Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
5' CATTATACGAACGGTACCCCAAAGCCTGGGTCAGCGCCGT 3'	6
5' GGCGGATATTCAGCAGTGG 3'	7
5' CCCAAACCAAATTTCCACG 3'	8
5' CGGTAGGTACCGAGCTCGAATTTCTTTGTTTAATTTACTA 3'	9
5' TAGTAAATTAACAAAGAAATTCGAGCTCGGTACCTACCG 3'	10
5' ACGGCGCTGACCCAGGCTTTGGGGTACCGTTCGTATAATG 3'	11

20

25

30

Se llevó a cabo una PCR utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* K12 W3110 (ATCC N° 23257) como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO: 8 y 9 como cebadores para amplificar las regiones corriente abajo del gen *nadB* de 0,4 kb y 0,4 kb, respectivamente. Además, se llevó a cabo una PCR utilizando el vector plásmido que contenía *loxpCm*, el vector pLoxpCat2, como una matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO: 10 y 11 como cebadores para amplificar el gen *loxpCm* que tiene la secuencia homóloga al gen *nadB* en ambos extremos de 1,0 kb. La polimerasa que se utilizó era la ADN polimerasa PfuUltra® (Stratagene, EE.UU.), y se llevó a cabo la PCR repitiendo 30 veces un ciclo que comprende la desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 53 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto, seguido por elución en gel de agarosa para obtener un fragmento corriente arriba de *nadB*, un fragmento corriente abajo de *nadB* y un fragmento *loxpCm*. Se llevó a cabo la PCR utilizando estos fragmentos obtenidos como matrices en condiciones de PCR repitiendo 10 veces del ciclo que comprende desnaturalización a 96 °C durante 60 segundos, desnaturalización a 50 °C durante 60 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto, y 20 repeticiones del ciclo después de la adición de cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 8. Como resultado, se obtuvo un casete deficiente en *nadB* que contenía la región corriente arriba del gen *nadB* - *loxpCm* - región corriente abajo del gen *nadB* de 1,8 kb.

35

La cepa K12 W3110 de *E. coli* que contenía el vector de expresión lambda red recombinasa pKD46 se transformó con el casete deficiente en *nadB* por electroporación, y entonces se sembró en frotis la cepa sobre un medio LB en placa (Tryptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, cloranfenicol 15 µg, y agar al 1,5 %) que contenía cloranfenicol como marcador selectivo. Entonces se cultivó a 37 °C durante una noche para seleccionar las cepas de microorganismo que presentaba resistencia contra el cloranfenicol.

40

Las cepas seleccionadas se utilizaron directamente como matrices para llevar a cabo la PCR utilizando cebadores de SEQ ID NO: 7 y 8 en las mismas condiciones. Los tamaños del gen de la cepa silvestre y la cepa deficiente en *nadB* se identificaron como 2,4 kb y 0,8 kb, respectivamente en gel de agarosa al 1,0 %, confirmando de esta manera la eliminación del gen *nadB* en *E. coli* K12 W3110. La construcción de la cepa deficiente en *nadB*, llamada W3110-Δ*nadB*, se completó.

<1-3-2> Selección de variantes de L-aspartato oxidasa

Para encontrar un gen *nadB* resistente a la regulación de retroalimentación por NAD, se utilizaron ácido 6-aminopiridina-3-carboxílico (6-NA adquirido en Aldrich, EE. UU.) como análogo de ácido nicotínico, y 6-aminonicotinamida (6-Nm, adquirido en Aldrich, EE. UU.) como análogo de nicotinamida. Aunque se debería utilizar un análogo de 6-NAD, debido a la similitud estructural del NAD con el ácido nicotínico y nicotinamida, las variantes del gen *nadB* se seleccionaron en primer lugar utilizando el análogo del ácido nicotínico y el análogo de nicotinamida, y entonces se confirmó la resistencia de la retroalimentación por NAD de cada una de las variantes del gen *nadB* (ref. Journal of bacteriology, Junio 1983, p.1126-1136). La biblioteca de plásmidos de variantes de L-aspartato oxidasa construida en <1-2> del Ejemplo 1 se transformó en la cepa W3110- Δ nadB mediante el procedimiento de CaCl_2 .

La cepa transformada W3110- Δ nadB se sembró en frotis en un medio de placa M9-(6, NA)-(6, Nm) ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 12,8 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0,5 g, NH_4Cl 1 g, MgSO_4 2 mM, CaCl_2 0,1 mM, ácido casamino 1 g, ácido 6-aminopiridina-3-carboxílico (6-NA) 0,3 g/l, 6-aminonicotinamida (6-Nm) 0,3 g/l) para seleccionar las colonias con una mayor tasa de crecimiento en comparación con la *nadB* silvestre. Se exploraron un total de 1×10^7 y se seleccionaron tres de ellas, y entonces se llamaron pPro-nadB64, pPro-nadB67, y pPro-nadB110, respectivamente. Las tres cepas seleccionadas se inocularon cada una y se cultivaron en un medio líquido M9-(6,NA)-(6,Nm) ($\text{NaHPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 12,8 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0,5 g, NH_4Cl 1 g, MgSO_4 2 mM, CaCl_2 0,1 mM, ácido casamino 1 g, ácido 6-aminopiridina-3-carboxílico (6-NA) 0,3 g/l, 6-aminonicotinamida (6-Nm) 0,3 g/l), y entonces se compararon las densidades ópticas (DO) de las mismas. Como resultado, se descubrió que las tasas de crecimiento de pPro-nadB67 eran mayores que las de pPro-nadB64 y pPro-nadB72 en el medio que contenía 6-NA y 6-Nm, como se muestra en la Tabla 4. En consecuencia, se seleccionó la pPro-nadB67 y se identificó la secuencia de la misma. Como resultado, se descubrió que la pPro-nadB67 incluía arginina sustituyendo a la lisina, el aminoácido 302° del aminoácido metionina de partida.

La *E. coli* K12 W3110 que es deficiente en el gen *nadC*, y contiene un pPro-nadB67(Lys302Arg)-pCJ-nadA utilizando el vector pProlar como vector de expresión para la variante del gen *nadB*, se llamó CV01-0518. Entonces se depositó bajo el Tratado de Budapest en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) con el N° de acceso KCCM11434P el 20 de junio de 2013.

[Tabla 4] comparación de tasa de crecimiento de tres variantes de *nadB* en un medio líquido que contiene 6-NA y 6-Nm

Nombre de <i>nadB</i>	DO (4 h)	DO (12 h)
pPro <i>nadB</i>	0,24	1,06
pPro <i>nadB64</i>	0,44	1,12
pPro <i>nadB67</i>	0,62	1,30
pPro <i>nadB72</i>	0,46	1,18

Ejemplo 2. Rendimiento de ácido quinolínico entre las variantes del gen *nadB***<2-1> Construcción de una cepa deficiente en quinolinato fosforribosil transferasa**

Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* K12 W3110 como matriz para obtener un gen *nadC* que está implicado en la ruta de descomposición del quinolinato. Basándose en la secuencia de nucleótidos del gen *nadC* (N° de registro de NCBI "GI:89106990") representada por la SEQ ID NO: 25 obtenida en el GenBank del Instituto Nacional de Salud (GenBank NIH), se construyeron los cebadores representados por las SEQ ID NO: 12 y 13 capaces de amplificar la región corriente abajo del gen *nadC*, cavadores de las SEQ ID NO: 14 y 15 capaces de amplificar las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen *nadC*, y el gen *loxPcm*, y cebadores de las SEQ ID NO: 16 y 17 capaces de amplificar la región corriente arriba del gen *nadC*.

[Tabla 5]

Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
5' CATTATACGAACGGTACCCCCAGTTGAATAAACACCTCTTCA 3'	12
5' TGGCGGCAGGCTAATATT 3'	13
5' GTTCTTCCAGATTCTCTACTTTTCGAGCTCGGTACCTACCG 3'	14
5' TGAAGAGGTGTTTATTCAACTGGGGGTACCGTTCGTATAATG 3'	15
5' ATAACCACCATCAGTTCGATA 3'	16
5' CGGTAGGTACCGAGCTCGAAAAGTAGAGAATCTGGAAGAAC 3'	17

- La PCR se llevó a cabo utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* K12 W3110 como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO: 12 y 13, y 16 y 17 como cebadores para amplificar las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen *nadC* de 0,5 kb y 0,3 kb, respectivamente. Además, se llevó a cabo una PCR utilizando un vector plásmido que incluía *loxpCm*, el vector pLosxpCat2, como matriz y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO: 14 y 15 como cebadores para amplificar el gen *loxpCm* que tiene la secuencia homóloga con el gen *nadC* en ambos extremos de 1,0 kb. La polimerasa utilizada era la ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene, EE.UU.) y se llevó a cabo la PCR repitiendo 30 veces un ciclo que comprende desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 53 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Como resultado, se obtuvieron un fragmento corriente arriba de *nadC*, un fragmento corriente abajo de *nadC*, y un fragmento *loxpCm*. Se llevó a cabo una PCR utilizando estos fragmentos resultantes de la PCR descrita anteriormente como matrices en condiciones de PCR que incluían 10 repeticiones del ciclo que comprendía desnaturalización a 96 °C durante 60 segundos, desnaturalización una 50 °C durante 60 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto, y 20 repeticiones del ciclo después de la adición de las SEQ ID NO: 12 y 17. Como resultado se obtuvo un casete deficiente en *nadC* que contenía la región corriente arriba del gen *nadC-loxpCm*-región corriente abajo del gen *nadC* de 1,8 kb.
- La cepa K12 W3110 de *E. coli* que contenía pKD46 como vector de expresión de lambda red recombinasa se transformó con el casete deficiente en *nadC* por electroporación, y entonces se sembró en frotis sobre un medio LB en placa (triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, y agar al 1,5 %) que contenía cloranfenicol como marcador selectivo, y se cultivó a 37 °C durante una noche para seleccionar las cepas de microorganismo que presentan resistencia contra el cloranfenicol.
- Las cepas seleccionadas se utilizaron directamente como matrices para llevar a cabo la PCR utilizando cebadores de las SEQ ID NO: 13 y 16 en las mismas condiciones, y se identificaron los tamaños de los genes de la cepa silvestre y la cepa deficiente en *nadC* que eran de 1,6 kb y 1,3 kb, respectivamente en gel de agarosa al 1,0 %, confirmando de esta manera la eliminación del gen *nadC* en *E. coli* K12 W3110. La construcción de la cepa deficiente en *nadC*, llamada *W3110-ΔnadC*, se completó.
- <2-2> Construcción de plásmidos para la expresión de aspartato oxidasa y quinolinato sintetasa**

- Son necesarias dos enzimas, aspartato oxidasa y quinolinato sintetasa, para producir quinolinato. En consecuencia, se construyó un plásmido capaz de expresar ambos genes *nadB* y *nadA* que codifican las dos enzimas. Primero, se llevó a cabo una PCR utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* W3110 para obtener el gen *nadA* que codifica la quinolinato sintetasa. Basándose en la secuencia de nucleótidos para el gen *nadA* (Nº de registro del NCBI "GI: 89107601") representada por la SEQ ID NO: 26 obtenida en el Gen Bank del Instituto Nacional de Salud (GenBank NIH), se sintetizaron los cebadores de las SEQ ID NO: 18 y 19 para amplificar la región ORF del gen *nadA* incluyendo las regiones ATG y TAA y que tiene los sitios de las enzimas de restricción Apal y NotI.

[Tabla 6]

Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
5' AATTGGGCCCCATGAGCGTAATGTTTGATCCA 3'	18
5' AATTGCGGCCGCTCGTGCCTACCGCTTCG 3'	19

- Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* K12 W3110 como matriz, y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO: 18 y 19 como cebadores. La polimerasa utilizada era la ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene, EE.UU.), y se llevó a cabo la PCR repitiendo 30 veces un ciclo que comprendía la desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Como resultado, se obtuvo un gen amplificado de aproximadamente 1,0 kb que incluía el gen *nadA* y los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción Apal y NotI.
- Se obtuvo un promotor pCJ1 mediante PCR utilizando un plásmido que incluía el promotor pCJ1 como matriz, basándose en la divulgación de la Patente coreana abierta a la inspección pública Nº 10-2006-0068505. Se construyeron los cebadores representados por las SEQ ID NO: 20 y 21 que tenían los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y Apal para unir el promotor pCJ1 con el gen *nadA* amplificado.

[Tabla 7]

Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO
5' CCGCGGATCCCACCGCGGGCTTATCCATTAC 3'	20
5' GATGGGCCCCATCTTAATCTCCTAGATTGGGTTTC 3'	21

- Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* K12 W3110 como matriz, y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO: 20 y 21 como cebadores. La polimerasa utilizada era la ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene, EE.UU.), y se llevó a cabo la PCR repitiendo 30 veces un ciclo que comprendía desnaturalización a 96 °C durante 30

segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 1 minuto. Como resultado, se obtuvo un fragmento amplificado de aproximadamente 0,3 kb que incluía el promotor pCJ1 y los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y Apal.

El gen *nadA* obtenido mediante la PCR se trató con las enzimas de restricción Apal y NotI, y el fragmento de promotor pCJ1 se trataron con las enzimas de restricción Apal y BamHI. En último término se construyó el vector recombinante *pPro-nadB-pCJ1-nadA* de 5,9 kb, en el que la expresión del gen *nadB* se regula por el promotor pPro como un promotor constitutivo, y la expresión del gen *nadA* se regula por el promotor pCJ1. El *pPro-nadB-pCJ1-nadA* tenía la secuencia representada en la SEQ ID NO: 27. Además, mediante los procedimientos descritos anteriormente, se construyó también un vector recombinante *pPro-nadB67-pCJ1-nadA* que incluía la variante *nadB* y el gen *nadA* silvestre. El *pPro-nadB67-pCJ1-nadA* construido tenía la secuencia representada por la SEQ ID NO: 28.

<2-2-1> Construcción de un vector en el que el aminoácido 302° del gen *nadB* de *pPro-nadB67-pCJ1-nadA* se ha sustituido por un aminoácido excepto lisina y arginina

Para confirmar la resistencia contra la regulación de retroalimentación por NAD de la variante del gen *nadB67*, que incluye arginina en vez de lisina en el aminoácido 302° de L-aspartato oxidasa que comienza con metionina, se sustituyó el aminoácido 302° del gen *nadB* con cada uno de los 18 aminoácidos diferentes excepto lisina y arginina. Se llevó a cabo una mutagénesis rápida utilizando el vector recombinante *pPro-nadB67-pCJ1-nadA* como matriz. La polimerasa era el ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene, EE. UU.). Se llevó a cabo una PCR repitiendo 18 veces un ciclo que comprende la desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, y extensión a 68 °C durante 15 minutos. El producto de la PCR resultante se trató con la enzima de restricción DpnI (NEB, EE. UU.), y entonces se transformó en la cepa DH5α de *E. coli* (Invitrogen, EE. UU.) mediante el procedimiento de CaCl₂. La cepa DH5α de *E. coli* se sembró en frotis sobre un medio LB-Km en placa (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, kanamicina 25 µg/l), y se cultivó durante una noche a 37 °C para seleccionar las colonias resistentes a kanamicina. Las colonias resultantes se sometieron a extracción de plásmidos y se secuenciaron para identificar la sustitución del aminoácido 302° con los 18 aminoácidos diferentes. Las 18 variantes de *nadB* como plásmidos se denominaron como en la Tabla 2.

[Tabla 8] Variantes de L-aspartato oxidasa en la que el aminoácido 302° se sustituyó con otro aminoácido

Nombre	Aminoácido 302° original de <i>nadB</i>	Aminoácido sustituido
pPro-nadB67-pCJ1-nadA	Lisina	Arginina
pPro-nadB67(G)-pCJ1-nadA		Glicina
pPro-nadB67(A)-pCJ1-nadA		Alanina
pPro-nadB67(S)-pCJ1-nadA		Serina
pPro-nadB67(T)-pCJ1-nadA		Treonina
pPro-nadB67(C)-pCJ1-nadB		Cisteína
pPro-nadB67(V)-pCJ1-nadA		Valina
pPro-nadB67(L)-pCJ1-nadA		Leucina
pPro-nadB67(I)-pCJ1-nadA		Isoleucina
pPro-nadB67(M)-pCJ1-nadA		Metionina
pPro-nadB67(P)-pCJ1-nadA		Prolina
pPro-nadB67(F)-pCJ1-nadA		Fenilalanina
pPro-nadB67(Y)-pCJ1-nadA		Tirosina
pPro-nadB67(W)-pCJ1-nadA		Triptófano
pPro-nadB67(D)-pCJ1-nadA		Ácido Aspártico
pPro-nadB67(E)-pCJ1-nadA		Ácido Glutámico
pPro-nadB67(N)-pCJ1-nadA		Asparagina
pPro-nadB67(Q)-pCJ1-nadA		Glutamina
pPro-nadB67(H)-pCJ-nadA		Histidina

<2-3> Evaluación de la capacidad de producción de quinolinato de variantes de *nadB* silvestre y *nadB67* con respecto a la concentración de NAD

Para comparar la capacidad de producción de quinolinato en el gen *nadB* de tipo silvestre y variantes del gen *nadB* con respecto a la concentración de NAD, se llevó a cabo un ensayo de titulación de quinolinato. Después, la cepa productora de quinolinato (W3110- Δ nadC) obtenida en <2-1> del Ejemplo 2 se transformó con el plásmido *pPro-nadB67-pCJq1-nadA* construido en <2-2> del Ejemplo 2, y cada uno de los 18 tipos de variantes de *nadB67* construidos en <2-2-1> del Ejemplo 2 mediante el procedimiento CaCl₂. Las cepas transformadas se cultivaron durante una noche en medio LB-Km en placa en un cultivo discontinuo a 37 °C para obtener una única colonia, y entonces la colonia única se inoculó mediante un recipiente de platino en 2 ml de un medio de cultivo para ensayar la potencia del quinolinato y se cultivó a 37 °C durante 24 horas a 72 horas agitando a 250 rpm. La Tabla 9 muestra la composición del medio de cultivo para producir quinolinato. Para identificar la resistencia a la retroalimentación por NAD de las variantes *nadB67*, se añadió ácido nicotínico (NA) al medio de cultivo a diferentes concentraciones, seguido por la comparación de las cantidades producidas de quinolinato.

[Tabla 9] Composición del medio de cultivo para el ensayo de potencia del quinolinato

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	70 g
Sulfato amónico	17 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·8H ₂ O	5 mg
ZnSO ₄	5 mg
Carbonato cálcico	30 g
Extracto de levadura	2 g

La cantidad de quinolinato (ácido quinolínico, QA) en cada una de las soluciones de cultivo se analizó por cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC). Los resultados se muestran en la Tabla 10. La Tabla 10 muestra la capacidad de producir quinolinato de las variantes de *nadB67* con respecto a la concentración de NAD.

[Tabla 10] Producción de cantidades de quinolinato con respecto a las concentraciones de NAD

Cepa	Plásmido	QA (mg/l)		
		NA 0 μ M	NA 5 μ M	NA 10 μ M
W3110-AnadC	pPro-nadB-pCJ-nadA	3500	1600	700
	pPro-nadB67-pCJ-nadA	4553	3860	3251
	pPro-nadB67(G)-pCJ-nadA	4560	3830	3058
	pPro-nadB67(A)-pCJ-nadA	4560	3830	3058
	pPro-nadB67(S)-pCJ-nadA	4560	3830	3058
	pPro-nadB67(T)-pCJ-nadA	4560	3830	3058
	pPro-nadB67(C)-pCJ-nadA	4560	3830	3058
	pPro-nadB67(V)-pCJ-nadA	4425	3937	3280
	pPro-nadB67(L)-pCJ-nadA	4425	3937	3280
	pPro-nadB67(I)-pCJ-nadA	4425	3937	3280
	pPro-nadB67(M)-pCJ-nadA	4425	3937	3280
	pPro-nadB67(P)-pCJ-nadA	2223	1879	1975
	pPro-nadB67(F)-pCJ-nadA	4241	3795	3141
	pPro-nadB67(Y)-pCJ-nadA	4241	3795	3141

(continuación)

Cepa	Plásmido	QA (mg/l)		
		NA 0 uM	NA 5 uM	NA 10 uM
	pPro-nadB67(W)-pCJ-nadA	4707	3715	3186
	pPro-nadB67(D)-pCJ-nadA	100	100	100
	pPro-nadB67(E)-pCJ-nadA	100	100	100
	pPro-nadB67(N)-pCJ-nadA	4552	3939	3171
	pPro-nadB67(Q)-pCJ-nadA	4552	3939	3171
	pPro-nadB67(H)-pCJ-nadA	4891	3751	3255

[Tabla 11] Rendimiento relativo de quinolinato con respecto a la concentración de NAD

Cepa	Plásmido	Porcentaje relativo (%)		
		NA 0 uM	NA 5 uM	NA 10 uM
W3110-AnadC	pPro-nadB-pCJ-nadA	100	46	20
	pPro-nadB67-pCJ-nadA	100	85	71
	pPro-nadB67(G)-pCJ-nadA	100	84	67
	pPro-nadB67(A)-pCJ-nadA	100	84	67
	pPro-nadB67(S)-pCJ-nadA	100	84	67
	pPro-nadB67(T)-pCJ-nadA	100	84	67
	pPro-nadB67(C)-pCJ-nadA	100	84	67
	pPro-nadB67(V)-pCJ-nadA	100	89	74
	pPro-nadB67(L)-pCJ-nadA	100	89	74
	pPro-nadB67(i)-pCJ-nadA	100	89	74
	pPro-nadB67(M)-pCJ-nadA	100	89	74
	pPro-nadB67(P)-pCJ-nadA	100	85	89
	pPro-nadB67(F)-pCJ-nadA	100	89	74
	pPro-nadB67(Y)-pCJ-nadA	100	89	74
	pPro-nadB67(W)-pCJ-nadA	100	79	68
	pPro-nadB67(D)-pCJ-nadA	100	100	100
	pPro-nadB67(E)-pCJ-nadA	100	100	100
	pPro-nadB67(N)-pCJ-nadA	100	87	70
	pPro-nadB67(Q)-pCJ-nadA	100	87	70
	pPro-nadB67(H)-pCJ-nadA	100	77	67

Para las dos variantes productoras de quinolinato que incluyen los plásmidos pPro-nadB67(D)-pCJ-nadA y pPro-nadB67(E)-pCJ-nadA, el gen *nadB* se destruyó y perdió su actividad. Como resultado, las variantes productoras de quinolinato tenían sobre todo niveles de quinolinato (QA) muy bajos, el nivel se convirtió a un rendimiento residual relativo en porcentaje (%). Se basaba en que el 100 % del nivel de QA producido con ácido nicotínico (NA) es 0 uM.

En referencia a la Tabla 11, el rendimiento de quinolinato era menor del 50 % cuando se utilizaba el plásmido pPro-nadB-pCJ-nadA que incluía el gen *nadB* de tipo silvestre, y el medio de cultivo contenía ácido nicotínico, sobre 5 uM o más. Mientras que el rendimiento de quinolinato era del 70 % o más cuando se utilizaba el plásmido pPro-nadB67-pCJ-nadA y los plásmidos recombinantes de las variantes del 302° que incluyen la variante del gen *nadB*. La cepa W3110 Δ *nadC* es una auxótrofa a NAD que necesita el suministro de NAD externo para crecer. La cepa W3110 Δ *nadC* es incapaz de aceptar NAD directamente, y utiliza el ácido nicotínico (NA) heterogéneo o nicotinamida (Nm).

para producir NAD. Cuando una cantidad de NAD es de 1 mM o mayor, el gen *nadB* se regula por retroalimentación. Añadiendo NA a un medio de cultivo significa un aumento de NAD en una cepa. En consecuencia, las cantidades de producción de QA se compararon entre las cepas con la adición de NA al medio de cultivo a diferentes concentraciones para identificar el grado de regulación por retroalimentación en las variantes del gen *nadB* con respecto a la concentración de NAD. Como resultado, se descubrió que las variantes del gen *nadB* con el aminoácido 302° sustituido se liberaba la regulación por retroalimentación por NAD.

<2-4> Producción de ácido nicotínico mediante la reacción de descarboxilación

Para identificar la capacidad para producir ácido nicotínico de las cepas productoras de quinolinato en las que se introdujeron variantes de *nadB*, se utilizaron los rendimientos de quinolinato de la Tabla 10. El procedimiento de producción de ácido nicotínico utilizado en el presente documento era la descarboxilación de la solución de cultivo que incluía el quinolinato en condiciones de alta temperatura y alta presión basándose en la divulgación de la Patente coreana N° 10-1223904, para convertir el quinolinato a ácido nicotínico. Para retirar las células de la solución de cultivo que contiene quinolinato, se llevó a cabo una centrifugación desde aproximadamente 3000 rpm a aproximadamente 4000 rpm durante aproximadamente 10 minutos a 30 minutos. El sobrenadante que contiene quinolinato resultante de la centrifugación se separó y se utilizó como muestra para la reacción de descarboxilación.

La reacción de descarboxilación se llevó a cabo a aproximadamente 135 °C a aproximadamente 0,2 MPa durante 3 horas. Las muestras que se utilizaron se muestran en la Tabla 12. Una solución acuosa de quinolinato (un producto convencional de Sigma-Aldrich Co.) en agua desionizada se utilizó como el grupo de control. Cada una de las muestras de soluciones acuosas de quinolinato se tituló con hidróxido sódico, agua amoniacada, ácido clorhídrico, o ácido sulfúrico, específicamente la conversión de quinolinato en ácido nicotínico tiene lugar a un pH de 2. La Tabla 12 muestra las cantidades de producción de ácido nicotínico convertido a partir de quinolinato de la Tabla 10 mediante una reacción a alta temperatura y alta presión.

[Tabla 12]

Cepa	Plásmido	Quinolinato (mg/l)	Ácido nicotínico (mg/l)
W3110-AnadC	pPro-nadB-pCJ-nadA	3500	2555
	pPro-nadB67-pCJ-nadA	4553	3324
	pPro-nadB67(G)-pCJ-nadA	4560	3329
	pPro-nadB67(A)-pCJ-nadA	4560	3329
	pPro-nadB67(S)-pCJ-nadA	4560	3329
	pPro-nadB67(T)-pCJ-nadA	4560	3329
	pPro-nadB67(C)-pCJ-nadA	4560	3329
	pPro-nadB67(V)-pCJ-nadA	4425	3230
	pPro-nadB67(L)-pCJ-nadA	4425	3230
	pPro-nadB67(I)-pCJ-nadA	4425	3230
	pPro-nadB67(M)-pCJ-nadA	4425	3230
	pPro-nadB67(P)-pCJ-nadA	2223	1623
	pPro-nadB67(F)-pCJ-nadA	4241	3096
	pPro-nadB67(Y)-pCJ-nadA	4241	3096
	pPro-nadB67(W)-pCJ-nadA	4707	3436
	pPro-nadB67(D)-pCJ-nadA	100	73
	pPro-nadB67(E)-pCJ-nadA	100	73
	pPro-nadB67(N)-pCJ-nadA	4552	3323
	pPro-nadB67(Q)-pCJ-nadA	4552	3323
	pPro-nadB67(H)-pCJ-nadA	4891	3570

El experimento de conversión de quinolinato en solución acuosa (agua desionizada) en ácido nicotínico (Patente china N° 101353322) se llevó a cabo a 135 °C y a 0,2 MPa durante aproximadamente 3 horas. Los niveles de temperatura y la presión eran menores de 150 °C a 250 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Ejemplo 3: Confirmación de la actividad de resistencia a la retroalimentación de NAD de las variantes de L-aspartato oxidasa

<3-1> Construcción de un plásmido de sobre-expresión de L-aspartato oxidasa

Para clarificar más las actividades de resistencia a la retroalimentación con NAD de las variantes de L-aspartato oxidasa, se evaluó la resistencia a la retroalimentación con NAD de una variante de L-aspartato oxidasa codificada por la variante *nadB67* seleccionada en el <Ejemplo 1-3-2>. Para clonar el *nadB* tipo silvestre y las variantes de *nadB* en el vector dual pCDF que contenía un marcador de histidina (His), se llevó a cabo una PCR utilizando el plásmido pPro-*nadB* de tipo silvestre y el pPro-*nadB67* recombinante como matrices, respectivamente. Para su uso en la PCR, se construyeron los cebadores de SEQ ID NO: 22 y 23 capaces de amplificar la región ORF del *nadB* tipo silvestre y la variante del gen *nadB67* que incluye las regiones ATG y TAA y que tiene los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y NdeI.

[Tabla 13]

Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
5' AATTGGATCCGATGAATACTCTCCCTGAACATT 3'	22
5' AATTCATATGTTATCTGTTTATGTAATGATTGC 3'	23

La polimerasa que se utiliza es la ADN polimerasa PfuUltra™ (Stratagene, EE. UU.), y se llevó a cabo la PCR repitiendo 30 veces un ciclo que comprende desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 2 minutos. Como resultado, se obtuvieron los genes amplificados de aproximadamente 1,9 kb del *nadB* tipo silvestre y la variante *nadB67* que incluye los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción BamHI y NdeI.

Los genes del *nadB* tipo silvestre y variante *nadB67* obtenidos mediante la PCR se trataron con las enzimas de restricción BamHI y NdeI, y entonces se clonaron mediante ligadura en un vector dual pCDF tratado con las enzimas de restricción BamHI y NdeI. En último término, se construyeron los vectores recombinantes que incluyen los genes el *nadB* tipo silvestre y a variante *nadB67*, respectivamente, en los que la expresión de cada uno de los genes es controlado por un promotor T7 como promotor constitutivo y el gen contiene el marcador His que hace posible la purificación. Los vectores recombinantes construidos se llamaron pT7-*nadB* y pT7-*nadB67*, respectivamente. Se construyeron otros vectores recombinantes en los que se sustituyeron la valina, leucina, isoleucina, e histidina por el aminoácido 302° del *nadB* tipo silvestre, respectivamente, utilizando el mismo procedimiento, y se llamaron pT7-*nadB67*(V), pT7-*nadB67*(L), pT7-*nadB67*(I), pT7-*nadB67*(H), respectivamente.

<3-2> Purificación de la L-aspartato oxidasa

Después, el vector recombinante pT7-*nadB67*(V), pT7-*nadB67*(L), pT7-*nadB67*(I), o pT7-*nadB67*(H) se transformó en una cepa afinadora mediante el procedimiento de CaCl₂. La cepa transformada se sembró en frotis en un medio LB-SP en placas (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, y espectinomicina 50 µg), y se cultivó durante una noche a 37 °C para seleccionar las colonias resistentes a la espectinomicina. Una colonia se seleccionó entre ellas y se cultivó en un medio líquido LB-SP (extracto de levadura 10 g/l, NaCl 5 g/l, triptona 10 g/l, espectinomicina 50 µg), y entonces se añadió un derivado de isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) a la misma cuando el valor de la densidad óptica (DO) del cultivo alcanzaba 0,4, y se cultivó a aproximadamente 18 °C durante una noche. Las células que incluyan la L-aspartato oxidasa de tipo silvestre sobre-expresada y las variantes de L-aspartato oxidasa de las células recuperadas con el kit Ni-NTA spin (Qiagen, EE. UU.). La proteína recuperada era el 50 % de proteína total, aproximadamente un 2 % de la proteína recuperada se recuperó como L-aspartato oxidasa.

<3-3> Ensayo de actividad de las variantes de L-aspartato oxidasa

La L-aspartato oxidasa convierte el aspartato como sustrato en iminoaspartato en presencia de FAD como cofactor, y el iminoaspartato se convierte en oxaloacetato. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que se genera mediante la reacción descrita anteriormente, se utilizó para identificar la actividad del *nadB*. Se midió la absorbancia a 560 nm de un producto de reacción de H₂O₂ con un producto de la reacción utilizando un Amplex Red (Invitrogen, Corea) para determinar la actividad del *nadB*. Aquí, se añadía NAD a diferentes concentraciones para crear una condición para la inhibición competitiva frente a FAD para evaluar de esta manera la resistencia de la L-aspartato oxidasa contra la regulación de retroalimentación por NAD. La actividad relativa de la L-aspartato oxidasa de tipo silvestre a una concentración de NAD de 1 mM era menor del 50, mientras que las actividades relativas de las variantes de la L-aspartato oxidasa a la misma concentración de NAD se mantenía aproximadamente en un 70 % o mayor (Tabla 14), indicando de esta manera que la regulación por retroalimentación por NAD se liberaba en las variantes de L-aspartato oxidasa.

[Tabla 14] Comparación de actividad entre las L-aspartato oxidasas con respecto a la concentración de NAD

Actividad relativa						
Concentración de NAD (mM)	Relativa (%)					
	nadB tipo silvestre	Variante nadB67	Variante <i>nadB67(V)</i>	Variante nadB67(L)	Variante <i>nadB67(I)</i>	Variante nadB67 (H)
0	100	100	100	100	100	100
0,05	95	102	100	100	100	100
0,3	82	96	95	95	95	95
0,5	65	75	77	76	76	77
1	22	74	75	74	75	74

Aplicabilidad industrial

La presente invención se refiere a variantes de la L-aspartato oxidasa que son resistentes contra la regulación de retroalimentación por el ácido nicotínico o NAD, y por lo tanto puede producir eficazmente quinolinato. El quinolinato se puede producir eficazmente cultivando un microorganismo que incluye dicha variante de L-aspartato oxidasa de acuerdo con las realizaciones de la presente invención. El quinolinato también se puede producir eficazmente utilizando el microorganismo en el que la actividad de la quinolinato sintetasa está aumentada adicionalmente o la actividad de la quinolinato fosforribosil transferasa está adicionalmente debilitada. Mediante dicha transformación del microorganismo, el rendimiento de quinolinato o ácido nicotínico se puede mejorar, lo que es industrial y altamente útil.

[N° de acceso]

Institución depositaria: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) (Autoridad Depositaria Internacional)

N° de acceso: KCCM11434

Fecha del depósito: 20 de Junio de 2013

Aunque la invención se ha mostrado y descrito particularmente en referencia a las realizaciones ejemplares de la misma, se entenderá que se pueden hacer distintos cambios en su forma y detalles.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> VARIANTE DE LA L-ASPARTATO OXIDASA Y UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN QUINOLINATO O ÁCIDO NICOTÍNICO UTILIZANDO LA MISMA

<130> PX046456

<160> 30

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 540

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de nadB

<400> 1

Met	Asn	Thr	Leu	Pro	Glu	His	Ser	Cys	Asp	Val	Leu	Ile	Ile	Gly	Ser	1	5	10	15
Gly	Ala	Ala	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Asp	Gln	His	Gln	20	25	30	
Val	Ile	Val	Leu	Ser	Lys	Gly	Pro	Val	Thr	Glu	Gly	Ser	Thr	Phe	Tyr	35	40	45	
Ala	Gln	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Thr	Asp	Ser	Ile	Asp	50	55	60	
Ser	His	Val	Glu	Asp	Thr	Leu	Ile	Ala	Gly	Ala	Gly	Ile	Cys	Asp	Arg	65	70	75	80
His	Ala	Val	Glu	Phe	Val	Ala	Ser	Asn	Ala	Arg	Ser	Cys	Val	Gln	Trp	85	90	95	
Leu	Ile	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Phe	Asp	Thr	His	Ile	Gln	Pro	Asn	Gly	100	105	110	
Glu	Glu	Ser	Tyr	His	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Gly	His	Ser	His	Arg	Arg	115	120	125	
Ile	Leu	His	Ala	Ala	Asp	Ala	Thr	Gly	Arg	Glu	Val	Glu	Thr	Thr	Leu	130	135	140	
Val	Ser	Lys	Ala	Leu	Asn	His	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Leu	Glu	Arg	Ser	145	150	155	160
Asn	Ala	Val	Asp	Leu	Ile	Val	Ser	Asp	Lys	Ile	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr	165	170	175	
Arg	Arg	Val	Val	Gly	Ala	Trp	Val	Trp	Asn	Arg	Asn	Lys	Glu	Thr	Val	180	185	190	
Glu	Thr	Cys	His	Ala	Lys	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Ala	Ser	195	200	205	
Lys	Val	Tyr	Gln	Tyr	Thr	Thr	Asn	Pro	Asp	Ile	Ser	Ser	Gly	Asp	Gly	210	215	220	

Ile	Ala	Met	Ala	Trp	Arg	Ala	Gly	Cys	Arg	Val	Ala	Asn	Leu	Glu	Phe	225		230		235					240
Asn	Gln	Phe	His	Pro	Thr	Ala	Leu	Tyr	His	Pro	Gln	Ala	Arg	Asn	Phe		245		250						255
Leu	Leu	Thr	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Glu	Gly	Ala	Tyr	Leu	Lys	Arg	Pro		260		265						270
Asp	Gly	Thr	Arg	Phe	Met	Pro	Asp	Phe	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Leu	Ala		275		280						285
Pro	Arg	Asp	Ile	Val	Ala	Arg	Ala	Ile	Asp	His	Glu	Met	Lys	Arg	Leu		290		295						300
Gly	Ala	Asp	Cys	Met	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser	His	Lys	Pro	Ala	Asp	Phe	305		310			315				320
Ile	Arg	Gln	His	Phe	Pro	Met	Ile	Tyr	Glu	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly		325		330						335
Ile	Asp	Leu	Thr	Gln	Glu	Pro	Val	Pro	Ile	Val	Pro	Ala	Ala	His	Tyr		340		345						350
Thr	Cys	Gly	Gly	Val	Met	Val	Asp	Asp	His	Gly	Arg	Thr	Asp	Val	Glu		355		360						365
Gly	Leu	Tyr	Ala	Ile	Gly	Glu	Val	Ser	Tyr	Thr	Gly	Leu	His	Gly	Ala		370		375						380
Asn	Arg	Met	Ala	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Glu	Cys	Leu	Val	Tyr	Gly	Trp	385		390			395				400
Ser	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Thr	Arg	Arg	Met	Pro	Tyr	Ala	His	Asp	Ile		405		410						415
Ser	Thr	Leu	Pro	Pro	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Val	Glu	Asn	Pro	Asp	Glu		420		425						430
Arg	Val	Val	Ile	Gln	His	Asn	Trp	His	Glu	Leu	Arg	Leu	Phe	Met	Trp		435		440						445
Asp	Tyr	Val	Gly	Ile	Val	Arg	Thr	Thr	Lys	Arg	Leu	Glu	Arg	Ala	Leu		450		455						460
Arg	Arg	Ile	Thr	Met	Leu	Gln	Gln	Glu	Ile	Asp	Glu	Tyr	Tyr	Ala	His	465		470			475				480
Phe	Arg	Val	Ser	Asn	Asn	Leu	Leu	Glu	Leu	Arg	Asn	Leu	Val	Gln	Val		485		490						495
Ala	Glu	Leu	Ile	Val	Arg	Cys	Ala	Met	Met	Arg	Lys	Glu	Ser	Arg	Gly		500		505						510
Leu	His	Phe	Thr	Leu	Asp	Tyr	Pro	Glu	Leu	Leu	Thr	His	Ser	Gly	Pro		515		520						525
Ser	Ile	Leu	Ser	Pro	Gly	Asn	His	Tyr	Ile	Asn	Arg					530		535							540

5 <210> 2
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador para nadB

 10 <400> 2
 aattcatatg aatactctcc ctgaacatt 29

 15 <210> 3
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador para nadB

 20 <400> 3
 aattgatcc ctataccact acgcttgatc ac 32

 25 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador para nadB

 30 <400> 4
 ctcgagcata gcattttat cc 22

 35 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador para nadB

 40 <400> 5
 cagtgaagcga ggaagcgg 18

 45 <210> 6
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> cebador para nadB corriente abajo

 55 <400> 6
 cattatagca acggtacccc aaagcctggg tcagcgccgt 40

 60 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador para nadB corriente abajo

<400> 7
 ggcgatatt cagcagtg 19

 5 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> cebador para nadB corriente arriba

 <400> 8
 cccaaaccaa attccacg 19

 15 <210> 9
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> cebador para nadB corriente arriba

 <400> 9
 cggtaggtag cgagctcgaa ttctttgt taattacta 40
 25
 <210> 10
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cebador para loxCm

 <400> 10
 35 tagtaaatga aacaaagaaa ttcgagctcg gtacctaccg 40
 <210> 11
 <211> 40
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para loxCm

 45 <400> 11
 acggcgctga cccaggcttt ggggtaccgt tctataatg 40
 <210> 12
 <211> 42
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para nadC corriente abajo
 55
 <400> 12
 cattatagga acggtacccc cagttgaata aacaccttt ca 42
 <210> 13
 <211> 18
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> cebador para nadC corriente abajo

<400> 13
 tggcggcagg ctaatatt 18

5

<210> 14
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> cebador para nadC corriente arriba

<400> 14
 gttcttcag attctctact ttctgagctc ggtacctacc g 41

15

<210> 15
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> cebador para nadC corriente arriba

<400> 15
 tgaagagggtg ttattcaac tgggggtacc gttcgtataa tg 42

25

<210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> cebador para loxCm

35

<400> 16
 ataaccacca tcagttcgat a 21

40

<210> 17
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> cebador para loxCm

<400> 17
 cggtaggtac cgagctcgaa aagtagagaa tctggaagaa c 41

50

<210> 18
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> cebador para nadA

<400> 18
 aattgggccc atgagcgtaa tgtttgatcc a 31

60

<210> 19
 <211> 29
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador para nadA
 5
 <400> 19
 aattgcgccc gctcgtgcct accgcttcg 29
 <210> 20
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador
 15
 <400> 20
 ccgcggatcc caccgcgggc ttattccatt ac 32
 <210> 21
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador
 25
 <400> 21
 gatgggcca tcttaatctc ctgattggg ttc 34
 30
 <210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 22
 aattggatcc gatgaatact ctccctgaac att 33
 40
 <210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 23
 aattcatatg ttatctgttt atgtaatgat tgc 33
 50
 <210> 24
 <211> 1623
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> gen nadB
 60
 <400> 24

atgaatactc tccctgaaca ttcatgtgac gtgttgatta tcggtagcgg cgcagccgga	60
ctttcactgg cgctacgcct ggctgaccag catcaggtca tcgttctaag taaaggcccg	120
gtaacggaag gttcaacatt ttatgccag ggcggtattg ccgccgtgtt tgatgaaact	180
gacagcattg actcgcatgt ggaagacaca ttgattgocg gggtggtat ttgcatcgc	240
catgcagttg aatttgctgc cagcaatgca cgatcctgtg tgcaatggct aatcgaccag	300
ggggtgttgt ttgataccca cattcaaccg aatggcgaag aaagttacca totgaccogt	360
gaaggtggac atagtcaccg togtattctt catgccgcgc acgccaccgg tagagaagta	420
gaaaccacgc tgggtgagcaa ggcgctgaac catccgaata ttcgcgtgct ggagcgcagc	480
aacgcggttg atctgattgt ttctgacaaa attggcctgc cgggcacgcg acgggttgtt	540
ggcgctggg tatggaaccg taataaagaa acggtgaaa cctgccacgc aaaagcggtg	600
gtgctggcaa cggcggtgc gtogaaggtt tatcagtaca ccaccaatcc ggatatttct	660
tctggcgatg gcattgctat ggcggtggcg gcaggctgcc gggttgcaa tctcgaattt	720
aatcagttcc accctaccgc gctatatcac ccacaggcac gcaatttcct gttaacagaa	780
gcactgcgcg gcgaaggcgc ttatctcaag cgcgcggatg gtacgcgttt tatgccgat	840
tttgatgagc gggcggaact ggccccgcgc gatattgtcg cccgcgccat tgaccatgaa	900
atgaaacgcc tggcgcgaga ttgtatgttc cttgatatca gccataagcc cgcgattttt	960
attcgccagc atttccgat gatttatgaa aagctgctcg ggctggggat tgatctcaca	1020
caagaaccgg taccgattgt gcctgctgca cattatacct gcgggtggtg aatggttgat	1080
gatcatgggc gtacggacgt cgagggcttg tatgccattg gcgaggtgag ttataccggc	1140
ttacacggcg ctaaccgcat ggctcgaat tcattgctgg agtgtctggt ctatggctgg	1200
tcggcggcgg aagatatcac cagacgtatg ccttatgcc acgacatcag tacgttaccg	1260
ccgtgggatg aaagccgcgt tgagaaccct gacgaacggg tagtaattca gcataactgg	1320
cacgagctac gtctgtttat gtgggattac gttggcattg tgcgcacaa gaagcgcctg	1380
gaacgcgccc tgcggcggat aaccatgctc caacaagaaa tagacgaata ttacgcccat	1440
ttccgcgtct caaataattt gctggagctg cgtaatctgg tacaggttgc cgagttgatt	1500
gttcgctgtg caatgatgcg taaagagagt cgggggttgc atttcacgct ggattatccg	1560
gaactgctca cccattccgg tccgtcgatc ctttcccccg gcaatcatta cataaacaga	1620
taa	1623

5 <210> 25
 <211> 894
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> gen nadC

<400> 25

atgccgcctc gccgctataa ccctgacacc cgacgtgacg agctgctgga acgcattaat	60
ctcgatatcc ccggcgcggt ggcccaggcg ctgcgggaag atttaggcgg aacagtogat	120
gccacaatg atattacggc aaaactttta ccggaattt ctcgctctca tgccacgggtg	180
atcaccgcg agaatggcgt cttttgcggc aaacgctggg ttgaagaggt gtttattcaa	240
ctggcaggcg acgatgtcac cataatctgg catgtggatg acggcgatgt catcaatgcc	300
aatcaatcct tgttcgaact tgaaggccca tccgcgtgc tgtaacggg cgaacgcact	360
gcgcttaatt ttgtgcaaac cctttcagga gttgccagta aggtacgcca ctatgtcgaa	420
ttgctggaag gcaccaacac gcagttgttg gatacgcgca aaaccttacc cggcctgcgt	480
tcagctctga aatacgcggg actttgcggc ggccggagcga atcacgctct ggggctttct	540
gatgccttcc tgatcaaaga aaacatatt attgcctccg gctcagtgcg ccaggcggtc	600
gaaaaagcgt cctggctgca ccgggatgcg ccagtagaag tcgaagtaga gaatctggaa	660
gaacttgatg aagccctgaa agcaggagcc gatatcatca tgotggataa cttcgaaaca	720
gaacagatgc gcgaagccgt caaacgcacc aacggcaagg cgctactgga agtgtctggc	780
aacgtcactg acaaaacact gcgtgaattt gccgaaacgg gcgtggactt tatctcogtc	840
ggtgcgctaa ctaaacacgt acaagcactc gacctttcaa tgcgttttcg ctaa	894

<210> 26
 <211> 1044
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> gen nadA

<400> 26

atgagcgtaa tgtttgatcc agacacggcg atttatcctt tcccccgaa gccgacgccg	60
ttaagcattg atgaaaaagc gtattaccgc gagaagataa aacgtctgct aaaagaacgt	120
aatgcggtga tgggtgccca ctactatacc gatcccgaaa ttcaacaact ggcagaagaa	180
accggtggct gtatttctga ttctctggaa atggcgcgct tcggtgcaaa gcatcccgt	240
tctactttgt tagtcgctgg ggtgagattt atgggagaaa ccgccaaaat tctcagtcog	300
gaaaaaaciaa ttctgatgcc gacacttcag gctgaatgtt cactggatct cggctgccct	360
ggtgaagaat ttaacgcatt ttgcgatgcc catcccgatc gtactgtcgt cgtctacgcc	420
aacacttctg ctgcggtaaa agcgcgcgca gattgggtgg taacttcaag cattgccgtc	480
gaacttattg atcatcttga tagtttgggt gaaaaaatca tctgggcacc cgacaaacat	540
ctggggcggt acgtgcaaaa acagacgggt ggagacattc tatgctggca ggtgacctgt	600
attgtgcatg atgaatttaa gactcaggcg ttaaccgct tgcaagaaga ataccggat	660
gctgccatac tgggtgcatcc agaataccca caagctattg tcgatatggc ggatgcggtc	720
ggttcacca gtcaactgat cgctgctgog aaaacattgc cacatcagag gcttattgtg	780
gcaaccgatc ggggtatttt ctacaaaatg cagcaggcgg tgccagataa agagttactg	840
gaagcaccaa ccgcaggtga gggtgcaacc tgccgcagct gcgcgcattg tccgtggatg	900
gccatgaatg gccttcaggc catcgcagag gcattagaac aggaaggaag caatcacgag	960
gttcatgttg atgaaaggct gcgagagagg gcgctggtgc cgctcaatcg tatgctggat	1020
tttgcggcta cactacgtgg ataa	1044

5 <210> 27
 <211> 1
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> pPro nadBpCJnadA
 <400> 27
 a 1

15 <210> 28
 <211> 1
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> pPro nadB67pCJnadA
 <400> 28
 a 1

25 <210> 29
 <211> 347
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> nadA-quinolinato sintasa

<400> 29

```

Met Ser Val Met Phe Asp Pro Asp Thr Ala Ile Tyr Pro Phe Pro Pro
 1           5           10           15

Lys Pro Thr Pro Leu Ser Ile Asp Glu Lys Ala Tyr Tyr Arg Glu Lys
      20           25           30

Ile Lys Arg Leu Leu Lys Glu Arg Asn Ala Val Met Val Ala His Tyr
      35           40           45

Tyr Thr Asp Pro Glu Ile Gln Gln Leu Ala Glu Glu Thr Gly Gly Cys
      50           55           60

Ile Ser Asp Ser Leu Glu Met Ala Arg Phe Gly Ala Lys His Pro Ala
      65           70           75           80

Ser Thr Leu Leu Val Ala Gly Val Arg Phe Met Gly Glu Thr Ala Lys
      85           90           95

Ile Leu Ser Pro Glu Lys Thr Ile Leu Met Pro Thr Leu Gln Ala Glu
      100          105          110

Cys Ser Leu Asp Leu Gly Cys Pro Val Glu Glu Phe Asn Ala Phe Cys
      115          120          125

Asp Ala His Pro Asp Arg Thr Val Val Val Tyr Ala Asn Thr Ser Ala
      130          135          140

Ala Val Lys Ala Arg Ala Asp Trp Val Val Thr Ser Ser Ile Ala Val
      145          150          155          160

```

Glu Leu Ile Asp His Leu Asp Ser Leu Gly Glu Lys Ile Ile Trp Ala
 165 170 175
 Pro Asp Lys His Leu Gly Arg Tyr Val Gln Lys Gln Thr Gly Gly Asp
 180 185 190
 Ile Leu Cys Trp Gln Gly Ala Cys Ile Val His Asp Glu Phe Lys Thr
 195 200 205
 Gln Ala Leu Thr Arg Leu Gln Glu Glu Tyr Pro Asp Ala Ala Ile Leu
 210 215 220
 Val His Pro Glu Ser Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Ala Asp Ala Val
 225 230 235 240
 Gly Ser Thr Ser Gln Leu Ile Ala Ala Ala Lys Thr Leu Pro His Gln
 245 250 255
 Arg Leu Ile Val Ala Thr Asp Arg Gly Ile Phe Tyr Lys Met Gln Gln
 260 265 270
 Ala Val Pro Asp Lys Glu Leu Leu Glu Ala Pro Thr Ala Gly Glu Gly
 275 280 285
 Ala Thr Cys Arg Ser Cys Ala His Cys Pro Trp Met Ala Met Asn Gly
 290 295 300
 Leu Gln Ala Ile Ala Glu Ala Leu Glu Gln Glu Gly Ser Asn His Glu
 305 310 315 320
 Val His Val Asp Glu Arg Leu Arg Glu Arg Ala Leu Val Pro Leu Asn
 325 330 335
 Arg Met Leu Asp Phe Ala Ala Thr Leu Arg Gly
 340 345

<210> 30

<211> 297

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> NadC - quinolinato fosforribosiltransferasa

<400> 30

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

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

REIVINDICACIONES

1. Una variante de L-aspartato oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 1 de la cual una posición 302ª de la SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido, en la que el otro aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina, glicina, alanina, serina, treonina, cisteína, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, asparagina, glutamina e histidina.
2. La variante de L-aspartato oxidasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el otro aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina, valina, leucina, isoleucina, metionina, triptófano, e histidina.
3. La variante de la L-aspartato oxidasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la variante es más resistente a la retroalimentación por ácido nicotínico o NAD que la L-aspartato oxidasa de la SEQ ID NO: 1.
4. Un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la variante de L-aspartato oxidasa de la reivindicación 1.
5. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4 que está unido operativamente a una secuencia reguladora.
6. Un microorganismo que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el microorganismo pertenece al género *Escherichia*.
8. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la actividad de la quinolinato sintetasa está aumentada.
9. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la actividad de la quinolinato fosforribosil transferasa está reducida.
10. Un procedimiento de producción de quinolinato, comprendiendo el procedimiento:
el cultivo del microorganismo de la reivindicación 6 en un medio; y
la recuperación de quinolinato del medio de cultivo.
11. Un procedimiento de producción de ácido nicotínico, comprendiendo el procedimiento:
el cultivo del microorganismo de la reivindicación 6 en un medio; y
llevar a cabo una reacción de descarboxilación añadiendo un ácido al medio de cultivo.

FIG. 1

