

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 837**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2012** **PCT/KR2012/000444**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.07.2012** **WO12099396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2012** **E 12736463 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018** **EP 2665809**

54 Título: **Microorganismo con productividad de L-aminoácidos potenciada y proceso para producir L-aminoácidos con su uso**

30 Prioridad:

18.01.2011 KR 20110005136

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

23.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LEE, KWANG HO;
LEE, KEUN CHUL;
LEE, SEOK MYUNG y
HWANG, YOUNG BIN

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 664 837 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismo con productividad de L-aminoácidos potenciada y proceso para producir L-aminoácidos con su uso

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un microorganismo que tiene una productividad potenciada de aminoácidos útiles por una actividad celular mejorada y un menor tiempo de cultivo celular gracias a un aumento del poder de reducción, así como a un método para producir L-aminoácidos con su uso.

10

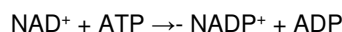
Antecedentes en la técnica

15

Se sabe que los microorganismos que producen por fermentación productos útiles requieren una gran cantidad de energía, como ATP (adenosina 5'-trifosfato), o poder de reducción, como NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), para la potenciación de su ruta de biosíntesis.

20

Durante el metabolismo de los microorganismos, es muy importante el equilibrio intracelular entre NADH (dinucleótido de nicotinamida y adenina) utilizado en las reacciones catabólicas y NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) utilizado en las reacciones anabólicas. El equilibrio se controla por fosforilación de NAD o desfosforilación de NADP, tal como se muestra en la siguiente fórmula:



25



30

En *E.coli*, se sabe que la fosforilación de NAD está catalizada por una enzima denominada NAD quinasa (EC 2.7.1.23) codificada por el gen *nadK* (o *yfjB*). NAD quinasa utiliza Mg^{2+} como cofactor de una reacción enzimática y es inhibido alostéricamente por NADPH y NADH. Se sabe que el valor K_m para NAD^+ es 2000 μM y que para ATP es 2500 μM (Eur. J. Biochem., (2001) 268: 4359-4365).

35

Apenas se ha estudiado la desfosforilación de NADP a pesar de su central importancia en la ruta metabólica. Aunque se ha demostrado que un homólogo de NAD quinasa en el arquea *Methanococcus jannaschii* tiene actividad NADP fosfatasa, todavía no se han identificado los genes que codifican la enzima que tiene dicha actividad en fuentes eucariotas y eubacterianas. En *E. coli*, el producto del gen *cysQ* ha presentado altas actividades de NADP y NADPH fosfatasa, pero los estudios cinéticos de la enzima purificada indicaron que no se trata de la verdadera NADP fosfatasa de este organismo (Biochem J., (2007) 402:205-218, Biosci. Biotechnol. Biochem., (2008) 72:919-930).

40

Las actividades de NAD quinasa se encuentran en muchos microorganismos y el sitio de unión a NAD y el sitio activo de NAD quinasa, que son importantes para la actividad catalítica, presentan secuencias de aminoácidos altamente conservadas entre especies. Por ejemplo, diversos microorganismos, incluyendo bacterias Gram-positivas, presentan un alto nivel de homología en la predicción de la estructura terciaria de las hélices 2, 4 y 5 (cada una de ellas indicadas por H2, H4 y H5) (Appl Microbiol Biotechnol (2010) 87:583-593).

45

NADP generado por NAD quinasa suministra finalmente un poder de reducción y, en particular, $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ requerido para la producción en masa de productos útiles en *E. coli*, es un elemento esencial para reacciones anabólicas (Biochem J., (2007) 402:205-218). En *E. coli*, NADPH se produce principalmente por 1) la ruta de la pentosa fosfato oxidante, 2) isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP del ciclo TCA (gen *icd*), y 3) transhidrogenasa (gen *pntAB*) (J Biol Chem., (2004) 279: 6613-6619).

50

55

Estas reacciones producen NADPH utilizando NADP como sustrato y, por tanto, se puede aumentar el nivel de NADPH aumentando el nivel intracelular de NADP. Así pues, se han realizado muchas tentativas para aumentar el nivel intracelular de NADP para la producción industrial de diversos metabolitos, como por ejemplo, 1) aumento de la producción de NADPH y timidina a través de la sobreexpresión de *nadK* en *E. coli* (Biotechnol Lett., (2009) 31:1929-1936), 2) aumento de la producción de la cantidad de NADPH y PHB (polihidroxibutirato) a través de la sobreexpresión de *nadK* en *E. coli* (Appl Microbiol Biotechnol., (2009) 83:939-947), y 3) aumento de la producción de lisina a través de la sobreexpresión de *ppnK* en corinebacteria, similar a la sobreexpresión de *nadK* en *E. coli*. El punto clave en todas estas clases es aumentar la expresión del gen *nadK*. Sin embargo, en cada una de estas clases, debe aumentarse también una fuente de fosfato, como ATP, para aumentar el poder de reducción a través de un aumento del nivel de NADPH, como resultado del aumento del nivel de NADP causado por la alta expresión de NAD quinasa.

60

65

ATP se produce principalmente a través de un sistema de transporte de electrones o fosforilación a nivel de sustrato en microorganismos. La ATP producida se descompone para suministrar energía a las células y se reproduce por glucólisis o fosforilación oxidativa. Sobre la base de este hecho, se ha realizado un estudio sobre la aplicación de un sistema de regeneración de ATP bacteriano a un proceso de producción para suministrar energía durante la

producción en masa de productos útiles (Biosci Biotechnol Biochem., (1997) 61: 840-845).

Kiyotaka et al. (FEMS Microbiology Letters, (2009) 297 (2): 217-224) divulga que la delección de *tehB* en *E. coli* puede contribuir a un descenso del consumo excesivo de ATP.

La patente europea EP 1 829 965 A1 divulga cepas mutantes de *E. coli* que tienen ADN cromosómico más corto que el de la cepa de *E. coli* de tipo silvestre y que presentan la propiedad de que el número de células transcurrido cierto período de cultivo es mayor que el de una cepa de tipo silvestre. Por tanto, estas cepas mutantes pueden producir eficientemente en un medio sustancias como proteínas, péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, etc., para generar y acumular dichas sustancias útiles, recuperándose dichas sustancias útiles del cultivo.

En la patente internacional WO 2010/149574 A1 se describe un método para preparar compuestos químicos orgánicos como L-aminoácidos por fermentación de microorganismos, incluyendo *E. coli*. Más en particular, dicha divulgación proporciona que una sobreexpresión de NAD quinasa dependiente de ATP presente en *E. coli* en productores de L-aminoácidos adecuados tiene como resultado un aumento de la producción de aminoácidos.

Sin embargo, tal como se ha descrito, existen pocos estudios sobre el método para aumentar una fuente de fosfato necesaria para aumentar el poder de reducción a través de la alta expresión de NAD quinasa y un subsiguiente aumento de los productos de biosíntesis. Por otra parte, se ha estudiado meramente un aumento del suministro de energía a través de la alta producción de ATP por lo que respecta al suministro de energía a las células y no se ha estudiado la utilización de ATP como fuente de fosfato en la técnica relacionada.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Por consiguiente, para el desarrollo de microorganismos que producen una alta concentración de L-aminoácidos, los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios sobre los genes que están relacionados con diversos metabolismos de energía y de poder de reducción. En consecuencia, han observado que un microorganismo que tiene una potenciación de la expresión de NAD quinasa codificada por *nadK* y la inactivación de una enzima de una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 codificada por el gen *tehB* es capaz de producir eficazmente una alta concentración de L-aminoácidos y, sobre esta base, es posible aumentar eficazmente una fuente de ATP fosfato, en virtud de lo cual han completado la presente invención.

Es decir, la presente invención se refiere a un método para aumentar la producción de un aminoácido deseado aumentando eficazmente el poder de reducción en un microorganismo, en el que se suministra adicionalmente ATP para su reducción durante el proceso de biosíntesis de NADP para aumentar el poder de reducción del género *Escherichia* que tiene productividad de L-aminoácidos.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo del género *Escherichia* que presenta una potenciación de la productividad de L-aminoácido, en el que el microorganismo se transforma para tener una actividad NAD quinasa potenciada y una actividad inactivada de una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 codificada por el gen *tehB* gene, en virtud de lo cual presenta una potenciación del poder reductor.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir L-aminoácidos utilizando el microorganismo del género *Escherichia*.

Solución del problema

Para conseguir los objetos mencionados, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que presenta una potenciación de la productividad de L-aminoácido, en el que se transforma el microorganismo para tener una potenciación de la actividad NAD quinasa y una actividad inactivada de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 codificada por el gen *tehB*.

La presente invención proporciona también un método para producir L-aminoácidos utilizando el microorganismo del género *Escherichia*.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, se crea un suplemento de un agente de reducción NADPH en el metabolismo de la energía intracelular de un microorganismo que presenta productividad de L-aminoácidos por potenciación de NADP, y se suministra la subsiguiente ausencia de ATP por inactivación de una enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 codificada por el gen *tehB* y, de esta forma, es posible mejorar la productividad de L-aminoácidos restaurando el equilibrio del metabolismo de la energía, y aumentando la actividad celular y reduciendo el tiempo de cultivo.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama en el que se muestra un vector *nadK*-pINT17E para aumentar el número de copias del gen *nadK* de *E.coli*.

Mejor modo de realización de la invención

La presente invención proporciona un microorganismo que presenta una potenciación de la productividad de L-aminoácido y un método para producir L-aminoácidos con su uso.

El microorganismo productor de L-aminoácidos de la presente invención comprende cualquier microorganismo procariota o eucariota y entre sus ejemplos se incluyen las cepas de microorganismo que pertenecen al género *Escherichia*, *Erwinia*, *Serratia*, *Providencia*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*. El microorganismo de la presente invención es preferentemente un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* y, más preferentemente, *E.coli*.

En la presente invención, el L-aminoácido es preferentemente L-treonina o L-triptófano.

En la realización preferente de la presente invención, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que presenta una potenciación de la productividad de L-aminoácido, en el que el microorganismo se transforma para tener una actividad de NAD quinasa potenciada y una actividad inactivada de la enzima que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 codificada por el gen *tehB*, en virtud de cual tiene una potenciación del poder de reducción.

En la presente invención, la NAD quinasa se refiere a una enzima que tiene actividad de convertir NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) en NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) utilizando un grupo fosfato derivado de ATP y otros compuestos.

Se divulga específicamente una secuencia de la proteína que tiene actividad NAD quinasa como una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, y el gen *nadK* que codifica la NAD quinasa es preferentemente un polinucleótido que tiene una secuencia de bases de SEQ ID NO. 3.

En la presente invención, puede realizarse la potenciación de la actividad de NAD quinasa del género *Escherichia* que tiene productividad de L-aminoácidos a través de varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método puede incluir un método de inserción de la propia secuencia de bases que codifica NAD quinasa o un polinucleótido que incluye una región reguladora de expresión extraña en un cromosoma, un método que consiste en aumentar el número de copias introduciéndola en sistema de vector, o un método que consiste en potenciar la actividad enzimática por sustitución de la región reguladora de expresión del gen con otra secuencia reguladora, modificación de toda o parte de la secuencia reguladora de la expresión, o mutación del propio gen.

Más preferentemente, la presente invención puede aplicar el método que consiste en aumentar el número de copias introduciendo la secuencia de bases que codifica NAD quinasa en ADN cromosómico de una cepa para potenciar la actividad de NAD quinasa del microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tiene productividad de L-aminoácidos.

Las personas especializadas en la técnica apreciarán que el aumento del número de copias de la NAD quinasa dentro del ADN cromosómico presenta el mismo efecto que el aumento del número de copias de NAD quinasa mediante el vector extracromosómico, o que el aumento del nivel de expresión por modificación de la región reguladora de expresión del gen *nadK* que codifica NAD quinasa en el sitio intra- o extra-cromosómico o la mutación del propio gen. Si se utiliza un vector, se transforma el género *Escherichia* que tiene productividad de L-aminoácidos con el vector recombinante introducido por la secuencia de bases, preparando así un microorganismo del género *Escherichia* que presenta una potenciación de la actividad de quinasa.

El vector utilizado en la presente invención no está particularmente limitado y se puede utilizar cualquier vector de expresión conocido. Preferentemente, puede utilizarse un vector pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322 o pMW118.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el potenciamiento de la actividad NAD quinasa por transformación aumenta los niveles de NADP y NADPH intracelulares en una cepa.

Para aumentar la producción de ATP, los autores de la presente invención también han aplicado un método de inactivación de una actividad de una enzima codificada por el gen *tehB*.

En la presente invención, se conoce el gen *tehB* gene (ID de gen NCBI: 945979) como un gen que codifica una proteína de resistencia a telurito o una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina prevista, pero sus funciones siguen sin estar aclaradas.

Sin embargo, estudios recientes han notificado que la delección del gen *tehB* en *E. coli* presenta un aumento del 150 % de la producción de ATP en comparación con una cepa parental, y señalan que este resultado se atribuye a una reducción de la ATP necesaria para la biosíntesis de S-adenosil metionina desde metionina (FEMS Microbiol Lett, (2009) 297:217-224).

Concretamente, puede describirse una secuencia de la metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina prevista mediante una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2. Por otra parte, el gen *tehB* que codifica la enzima se deriva de *E. coli* y, preferentemente, un polinucleótido que tiene una secuencia de bases de SEQ ID NO. 1.

El método de inactivación de una actividad de la enzima codificada por el gen *tehB* abarca todos los métodos de modificación del correspondiente gen para impedir la producción de la enzima codificada por el gen que tiene la secuencia de bases of SEQ ID NO. 1. Un ejemplo de los métodos puede ser por delección de todo o parte del gen por recombinación homóloga, supresión de la expresión de enzima por inserción de transposón dentro del gen correspondiente, supresión de la expresión de enzima por inserción de genes de resistencia a los antibióticos o similar, pero no se limita a ellos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” significa un método en el que se introduce un gen en una célula hospedadora para su expresión en la célula hospedadora. Los genes transformados, si están en el estado de ser expresados en la célula hospedadora, comprenden cualquiera de los genes insertados en el cromosoma de la célula hospedadora o que ocupan una posición en otras partes del cromosoma. Por otra parte, el gen comprende ADN y ARN como polinucleótido capaz de codificar un polipéptido. Siempre y cuando se pueda introducir el gen en la célula hospedadora y expresarse en ella, se introduce el gen en cualquier tipo. Por ejemplo, se puede introducir el gen en la célula hospedadora en el tipo de casete de expresión que es un expresoma de polinucleótido que comprende en sí elementos completos para expresar el gen. El casete de expresión que comprende un promotor que está operativamente conectado al gen, señal de terminación de transcripción, sitio de unión a ribosoma y señal de terminación de traducción. El casete de expresión puede ser del tipo del vector de expresión capaz de autoclonación. El gen también puede introducirse en la célula hospedadora por sí mismo o en el tipo de expresoma de polinucleótido que se va a conectar operativamente con la secuencia necesaria para la expresión en la célula hospedadora.

En la realización preferente de la presente invención, el microorganismo transformado a través del método puede ser *E. coli* y, preferentemente, *E. coli* CA03-448(KCCM11167P), CA03-449(KCCM11168P) o CA04-2001(KCCM11166P).

La presente invención proporciona también un método para producir L-aminoácidos utilizando el microorganismo del género *Escherichia*

En la realización preferente de la presente invención, la presente invención proporciona el método para producir L-aminoácidos cultivando el microorganismo recombinante del género *Escherichia* que presenta una potenciación de la productividad de L-treonina o L-triptófano en un medio que comprende sacarosa o glucosa como fuente de carbonos principal.

Específicamente, la presente invención proporciona un método para producir L-aminoácidos que comprende las etapas de inocular y cultivar el microorganismo recombinante del género *Escherichia* en un medio de cultivo que contiene total o parcialmente sacarosa o glucosa como fuente de carbono; y separar los L-aminoácidos del medio de cultivo.

Los procedimientos de cultivo de la presente invención se pueden llevar a cabo en un medio adecuado o en condiciones de cultivo conocidas dentro de la técnica. Dependiendo de las cepas utilizadas, las personas especializadas en la técnica pueden ajustar fácilmente los procedimientos de cultivo. Entre los ejemplos de procedimientos de cultivo se incluyen el tipo discontinuo, el tipo continuo y el tipo de alimentación discontinua, pero no se limitan a ellos. Preferentemente, los medios utilizados en el método de cultivo deberán satisfacer preferentemente los requisitos de una cepa específica.

El medio utilizado en la presente invención contiene sacarosa o glucosa como fuente de carbono principal. Y también es posible utilizar melazas que contienen una alta concentración de sacarosa como fuente de carbono y el medio puede contener una cantidad apropiada de diversas fuentes de carbono sin limitación. Entre los ejemplos de fuente de nitrógeno que se puede utilizar se incluyen una fuente de nitrógeno orgánico como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, agua de macerado de maíz y harina de soja, y una fuente de nitrógeno inorgánico como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio y se pueden utilizar en solitario o en cualquier combinación de los mismos. Pueden añadirse al medio fuentes de fósforo como dihidrógeno fosfato potásico, hidrógeno fosfato dipotásico o las correspondientes sales que contienen sodio. Por otra parte, el medio puede contener sales de metal como sulfato de magnesio y sulfato ferroso. Asimismo, puede suplementarse el medio con aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Estos medios o precursores pueden añadirse a los cultivos a través de un método de tipo continuo o discontinuo.

Durante el cultivo, pueden añadirse compuestos como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico para ajustar el pH de los cultivos. Asimismo, durante el cultivo, pueden añadirse apropiadamente agentes desespumantes como éster poliglicólico de ácido graso para reducir la formación de espumas en los cultivos. Para mantener los cultivos en estados aeróbicos, puede inyectarse en los cultivos oxígeno o gas que contiene oxígeno. Para mantener los cultivos en estados anaeróbicos o microaeróbicos, es posible no añadir ningún gas o inyectar gas nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono en los cultivos.

Se mantienen los cultivos a entre 27 y 37°C y, preferentemente a entre 30 y 35°C. Puede continuarse el cultivo hasta obtener la cantidad deseada del material deseado y, preferentemente durante 10 a 100 horas.

El método de recogida y recuperación de los aminoácidos producidos en la etapa de cultivo de la presente invención puede realizarse a través de un método apropiado conocido en la técnica, dependiendo de los procedimientos de cultivo, por ejemplo, de tipo discontinuo, de tipo continuo o de tipo de alimentación discontinua, para recoger el aminoácido deseado del medio de cultivo.

Modo para la invención

A continuación, se describirá la presente invención con más detalle haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, dichos ejemplos tienen un único fin ilustrativo y la invención no queda limitada con dichos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de cepa productora de L-treonina que presenta inactivación de enzima codificada por gen *tehB* derivado de *E. coli*

Se suprimió el gen *tehB* de una cepa productora de L-treonina, *E.coli* KCCM10541 (patente coreana NO. 10-0576342) por recombinación homóloga.

E. coli KCCM10541 es una cepa derivada de una cepa productora de L-treonina, *E. coli* KFCC10718 (publicación de patente coreana NO. 10-1992-0008365) y su cepa parental, *E. coli* KFCC 10718 tiene resistencia a un análogo de L-metionina, un fenotipo auxótrofo de metionina, resistencia a un análogo de L-treonina, un fenotipo auxótrofo de isoleucina permeable, resistencia a un análogo de L-lisina y resistencia a ácido α -aminobutírico y es capaz de producir L-treonina.

Se sabe que el gen *tehB* gene (ID Gen NCBI: 945979) que se va a suprimir codifica una metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina prevista. Cuando se suprime el gen, no se necesita ATP utilizada en la producción de S-adenosil metionina y, por lo tanto, se seleccionó el gen *tehB* como gen diana para reducir el consumo de energía, y tiene una secuencia de bases de SEQ ID NO. 1.

Para inactivación, se utilizó inactivación en una etapa, que es una técnica que consiste en construir un mutante utilizando una lambda Red recombinasa desarrollada por Datsenko KA et al. (Proc Natl Acad Sci Estados Unidos (2000) 97:6640 6645).

Para confirmar la inserción en el gen, se utilizó un gen resistente a cloranfenicol como marcador. Para la eliminación del gen resistente a cloranfenicol, se utilizó un sistema de recombinación específico de sitio Cre/loxP (BMC Biotechnology (2001) 1:7).

Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (en adelante, se hace referencia a ella como "PCR") utilizando un vector pMloxCm como matriz y los siguientes cebador 1 y cebador 2 que tenían una parte del gen *tehB* y una parte de la secuencia de gen resistente a cloranfenicol en las condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto, con el resultado de la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 1200 pb.

Tabla 1

[Tabla 1]

Cebador 1	5'-GCACACACTCTGAAGTACTGGAAGCGGTGAAAGTGGTTAA ACCGGGTAAAACGCTGGATTAGGTGACACTATAGAACGCG - 3' (SEQ ID NO. 6)
Cebador 2	5'-CACCTCTCCAGCCTTCGTAATATCGACGTAATTCTCCCT CTTTGAAGGCAAACGGGAATAGTGGATCTGATGGGTACC -3' (SEQ ID NO. 7)

Por otra parte, se sometió a electroforesis el fragmento de ADN obtenido por amplificación de PCR en un gel de agarosa al 0,8 % y después se eluyó y se utilizó como plantilla para una PCR secundaria. Se llevó a cabo una PCR secundaria utilizando el producto de PCR primaria eluido como matriz y los siguientes cebadores 3 y cebador 4 que

tenían 20 pb de una secuencia complementaria para las regiones 5' y 3' del fragmento de ADN primario y que tenía además las regiones 5 y 3' del gen *tehB* en las condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto, con el resultado de la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 1300 pb. Se sometió a electroforesis el fragmento de ADN obtenido a través del procedimiento anterior en gel de agarosa al 0,8 % y después se eluyó utilizando recombinación.

Tabla 2

[Tabla 2]

Cebador 3	5'- GTGACGAAAACACTATTTTACTGATAAATATGAATTAACCCG-CACACACTCTGAAGTACTG -3' (SEQ ID NO. 8)
Cebador 4	5'- GTCGGTGCAGCTCGCCGACGTCTTCATTG-TATTTACCCCTCTCCCAGCCTTCGTA -3' (SEQ ID NO. 9)

Se preparó *E. coli* KCCM 10541 con productividad de treonina, que había sido transformado con plásmido pKD46 de acuerdo con el método desarrollado por Datsenko KA et al. (Proc. Natl. Acad. Sci.(2000) 97:6640-6645, GenBank No. AY048746), como cepa competente y se llevó a cabo la transformación introduciendo el fragmento de gen de 1300 pb obtenido por PCR. Se seleccionaron las cepas obtenidas en medio LB suplementado con cloranfenicol. Se confirmó una delección del gen *tehB* con un producto de PCR de aproximadamente 2000 pb obtenido por PCR utilizando los siguientes cebador 5 y cebador 6.

Tabla 3

[Tabla 3]

Cebador 5	5'-TTTAGGCGCAGGCGTTTTCT -3' (SEQ ID NO. 10)
Cebador 6	5'-TTTTACGTGCCAGCATCGTG -3' (SEQ ID NO. 11)

Después de retirar el plásmido pKD46, se introdujo la cepa de *E. coli* recombinante primaria que tenía resistencia a cloranfenicol con un plásmido pJW168 para eliminar el gen marcador de cloranfenicol de la cepa (gen, (2000) 247,255-264). Se llevó a cabo la PCR utilizando los cebadores 5 y 6 para obtener un producto de PCR de 832 pb, lo que indicó que la cepa obtenida finalmente tenía la delección deseada.

Ejemplo 2: Construcción de vector aumentando el número de copias del gen *nadK* de *E.coli* en cromosoma

Se amplificó el gen *nadK* por PCR utilizando el cromosoma de *E. coli* W3110 (GeneBank número de acceso: AC000091) cepa adquirida de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC) como plantilla.

Concretamente, se llevó a cabo la PCR utilizando los siguientes cebadores 7 y 8 en las condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto con el resultado de la amplificación del fragmento de gen de 1407 pb (SEQ ID NO.5).

La secuencia amplificada contiene la secuencia codificante de *nadK* así como 501 pb de la región autopromotora prevista. Por otra parte, el cebador 7 tiene un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para EcoR I, y el cebador 9 tiene un sitio de reconocimiento de enzima de restricción para Xba I.

Tabla 4

[Tabla 4]

Cebador 7	5'-CCCGAATTTCGCGTCAGCTCAATGCCTTCA-3' (SEQ ID NO. 12)
Cebador 8	5'-GGGTCTAGAGCTGGCGTAAAATTAGAATA- 3' (SEQ ID NO. 13)

Se trató el polinucleótido obtenido con las enzimas de restricción, Xba I y EcoR I, y se clonó en los sitios Xba I y EcoR I del vector pINT17E, seguido de la transformación en *E.coli* BW25113. A continuación, se propagaron las células en medio sólido LB Cm (LB + plaga de agar con cloranfenicol). Se obtuvieron los vectores clonados de las colonias aplicando procedimientos mini-prep convencionales, y se designaron como *nadK*_pINT17E. En la Fig. 1 se muestra el diagrama del vector FIG. 1.

Ejemplo 3: Preparación de cepa productora de L-treonina que tiene inactivación de la enzima codificada por el gen *tehB* –derivado de *E.coli* y potenciación de la actividad NAD quinasa a través del aumento del número de copias en el cromosoma

Se utilizaron la cepa con delección del gen *tehB* preparada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1 y el vector *nadK*_pINT17E preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2 para aumentar el número de

copias de NAD quinasa.

En primer lugar, se introdujo plásmido pKD46 en la cepa con delección del gen *tehB* preparada de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, y se preparó como cepa competente, y se transformó la cepa con el vector *nadK*_pINT17E. Se llevó a cabo el cultivo a 37 °C durante 1~2 días para obtener colonias. Se llevó a cabo la PCR utilizando los cebadores 8 y 9 para confirmar si el gen se insertaba en el cromosoma de las colonias obtenidas. Se llevó a cabo la PCR en las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 45 segundos y elongación a 72 °C durante 2 minutos, con el resultado de la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 2000 pb.

Tabla 5

[Tabla 5]

Cebador 9	5'-TGGTATTCACTCCAGAGCGA-3' (SEQ ID NO. 14)
-----------	--

Después de separar el plásmido pKD46 de la cepa recombinante primaria que tenía resistencia cloranfenicol, se introdujo el plásmido pJW168 para eliminar el gen marcador cloranfenicol de la cepa (gen (2000) 247, 255-264). Se llevó a cabo PCR utilizando los cebadores 10 y 11 para obtener un producto de PCR de aproximadamente 1500 pb, lo que indica que, deseablemente, están presentes dos copias consecutivas del gen *nadK* en el cromosoma.

Se designó el *E. coli* transformado KCCM10541Δ*tehBnadK* copia2 (CA03-448).

Tabla 6

[Tabla 6]

Cebador 10	5'-GCATCAGCACCGCGATAAA-3' (SEQ ID NO. 15)
Cebador 11	5'-CATGTGTTGTCTAGTGCAGT-3' (SEQ ID NO. 16)

Ejemplo 4: Preparación de cepa productora de L-triptófano que tiene inactivación de la enzima codificada por el gen *tehB* derivado de *E. coli* y potenciación de actividad NAD quinasa aumentando su número de copias en el cromosoma.

Se preparó *E. coli* transformado de la misma manera que en los Ejemplos 1 a 3, con la excepción de que se utilizó una cepa productora de L-triptófano, *E. coli* KCCM 10812.

La cepa parental utilizada en este ejemplo, *E. coli* KCCM 10812P, es una cepa derivada de *E. coli* mutante que tiene productividad de L-fenilalanina (KFCC 10066), y que se caracteriza por que se libera auxotrofia de triptófano, se inactivan los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* y se mutan los genes *aroG* y *trpE* genes en el cromosoma (patente coreana NO. 10-0792095).

El *E. coli* transformado se designó KCCM10812Δ*tehBnadK* copia2 (CA04-2001).

Ejemplo comparativo 1: Preparación de cepa productora de L-treonina o L-triptófano que tiene inactivación de la enzima codificada por el gen *tehB*

Para suprimir el gen *tehB*, se utilizaron la cepa productora de L-treonina, *E. coli* KCCM10541, y la cepa productora de triptófano, *E. coli* KCCM10812, tal como se describe en el Ejemplo 1. Se aplicó inactivación en una etapa, que es una técnica de construcción de mutante con el empleo de una lambda Red recombinasa desarrollada por Datsenko KA et al. (Proc Natl Acad Sci Estados Unidos., (2000) 97:6640-6645), y el sistema de recombinación específica de sitio Cre/loxP (BMC Biotechnology.(2001) 1:7).

Se llevó a cabo la PCR utilizando los cebadores 5 y 6 para obtener productos de PCR de 832 pb, lo que indicó que las cepas obtenidas finalmente tenían la delección deseada y se designaron las cepas KCCM10541Δ*tehB* y KCCM10812PΔ*tehB*, respectivamente.

Ejemplo comparativo 2: Preparación de cepas productores de L-treonina o L-triptófano que presenta una potenciación de la actividad de NAD quinasa

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 3, se aumentó el número de copias del gen *nadK* a dos copias en el cromosoma de las cepas productoras de treonina y triptófano para preparar cepas que tenían potenciación de la actividad de NAD quinasa.

Se introdujo el plásmido pKD46 en la cepa productora de treonina, KCCM10541, y la cepa productora de triptófano, KCCM10812, y se prepararon como células competentes, y se transformaron las cepas con el vector *nadK*_pINT17E. A continuación, se llevó a cabo el cultivo a 37 °C durante 1-2 días para obtener colonias, se llevó a cabo la PCR utilizando los cebadores 8 y 9 para confirmar si el gen se había insertado o no en el cromosoma de las

colonias obtenidas.

Después de eliminar el plásmido pKD46 de la cepa recombinante primaria que tenía resistencia a cloranfenicol, se introdujo el plásmido pJW168 para eliminar el gen marcador de cloranfenicol de la cepa (Gen, (2000) 247, 255-264). Se realizó la PCR utilizando los cebadores 10 y 11 para obtener productos de PCR de aproximadamente 1500 pb, lo que indicó que estaban deseablemente presentes dos copias consecutivas del gen *nadK* en el cromosoma. Se designaron las cepas preparadas KCCM10541 *nadK* copia2 y KCCM10812 *nadK* copia2, respectivamente.

Ejemplo Experimental 1: Titulación de cepa productora de L-treonina que presenta una potenciación de la actividad de NAD quinasa e inactivación de la enzima codificada por el gen *tehB*

En primer lugar para proporcionar la cepa productora de L-treonina con capacidad de asimilar sacarosa, se construyó un vector a pAcscBAR'-mak (publicación de patente coreana NO. 10-2010-0092765) (SEQ ID NO. 21) del siguiente modo:

Después de construir pAcscBAR, se clonó el gen *mak* para dar pAcscBAR. Para la construcción de pAcscBAR, se utilizaron los cebadores 12 y 13 para amplificar un polinucleótido de la región *cscB*, en el que se eliminó *cscK*.

Tabla 7

[Tabla 7]	
Cebador 12	5'-CGCGATATCTAGCATATGCCGGGTACCGCACTAGTTGAG AGTAAACGGCGAAGT- 3' (SEQ ID NO. 17)
Cebador 13	5'- ATTCGGCCGGAGCCCTGCAGGTGCACGAGTA- CATTGAGCGACTGT- 3' (SEQ ID NO. 18)

Se llevó a cabo la PCR en las siguientes condiciones: tras la desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto y 30 segundos, y a continuación elongación a 72 °C durante 7 minutos, con el resultado de la amplificación de un polinucleótido de 1521 pb. Se trataron el polinucleótido obtenido y pAcscBAR con enzimas de restricción, EcoRV y EagI, respectivamente y se clonaron y transformaron para dar *E.coli* DH5α. Se seleccionaron colonias que contenían pAcscBAR por PCR utilizando las colonias cultivadas en medio LB y se obtuvieron los plásmidos utilizando procedimientos mini-prep de plásmido convencionales. Se confirmó la ausencia de mutación por análisis de secuencia de *cscBAR* unido en los sitios XbaI y EagI del plásmido pAcscBAR obtenido.

Se utilizaron los cebadores 14 y 15 y el cromosoma de *E.coli* W3110 como matriz para amplificar un polinucleótido que contenía el gen *mak* y se clonó para dar los sitios de enzima de restricción PstI y EagI de pAcscBAR para construir el vector pAcscBAR'-mak.

Tabla 8

[Tabla 8]	
Primer 14	5'- CACTGCAGTGGGGTAAATGCCATCG- 3' (SEQ ID NO. 19)
Primer 15	5'-AACGGCCGTCTCGGTGCTCATTACT3' (SEQ ID NO. 20)

Se llevó a cabo la PCR en las siguientes condiciones: tras la desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto y 30 segundos y, a continuación, elongación a 72 °C durante 7 minutos, con el resultado de la amplificación de un polinucleótido de 1388 pb. Se trataron el polinucleótido obtenido y pAcscBAR con enzimas de restricción, PstI y EagI, respectivamente y se clonaron y transformaron para dar *E.coli* DH5α. Se seleccionaron colonias que contenían pAcscBAR'-mak por PCR utilizando las colonias cultivadas en medio LB y se obtuvieron plásmidos utilizando procedimientos de mini-prep de plásmido convencionales. Se confirmó la ausencia de mutación por análisis de secuencia de *cscBAR*-mak unida a los sitios XbaI y EagI del plásmido pAcscBAR'-mak obtenido.

Se introdujo pAcscBAR'-mak construido en la cepa de *E. coli* recombinante KCCM10541Δ*tehB* *nadK* copia2 del Ejemplo 3, la cepa parental *E. coli* KCCM10541 y la cepa KCCM10541 con la delección del gen *tehB* (designado KCCM10541Δ*tehB*) y la cepa KCCM10541 que tiene un aumento del número de copias del gen *nadK* (designado KCCM10541 *nadK* copia2) preparado en los Ejemplos comparativos 1 y 2, respectivamente, y a continuación, se llevó a cabo la titulación.

Se cultivó cada una de las cepas que tenían diferentes características genéticas en medios sólidos LB en una incubadora a 33 °C durante toda la noche. A continuación, se inoculó 1 asa bacteriológica de platino en 25 ml de medio de titulación que contenía sacarosa, tal como se muestra en la tabla 9 y se cultivó en la incubadora a 33 °C y a 200 rpm durante 48 horas. En la tabla 10 se muestran los resultados. Todos los resultados fueron representados como el valor medio obtenido de tres matraces.

Tabla 9

[Tabla 9]

Composición	Concentración (por litro)
Sacarosa	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ 4H ₂ O	5 mg
L- metionina	0,15 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato cálcico	30 g
pH	6,8

5 Tabla 10

[Tabla 10]

Cepa	DO	Consumo de azúcar (g/l) *	L-treonina(g/l)* *
KCCM10541/ pAcscBAR-mak	16,2	34,7	31,8
KCCM10541 <i>tehB</i> / pAcscBAR-mak	15,2	35,7	32,2
KCCM 10541 <i>nadK</i> copia2/ pAcscBAR-mak	16,4	36,6	32,9
KCCM 10541 <i>tehBnadK</i> copia2/ pAcscBAR-mak	14,9	37,4	34,7
* valor medido 24-h			
** valor medido 48-h			

10 Tal como se muestra en la Tabla 10, cuando solamente se suprimió el gen *tehB*, la capacidad de asimilación de sacarosa fue similar a la de la cepa parental. Sin embargo, cuando se potenció la actividad NAD quinasa, la capacidad de asimilación de sacarosa aumentó a aproximadamente 2 g, en comparación con la cepa parental.

15 Asimismo, cuando se suprimió el gen *tehB*, se redujo la densidad celular a aproximadamente 6 % en comparación con la cepa parental, pero su productividad de treonina fue similar a la de la cepa parental. Sin embargo, cuando se introdujeron las dos mutaciones al mismo tiempo, se redujo la densidad celular a aproximadamente 8 %, la capacidad de asimilación de sacarosa aumentó a aproximadamente 8 % y también aumentó la productividad de treonina a 9 % en comparación con la cepa parental.

20 Además, se sometieron a ensayo la cepa recombinante *E.coli* KCCM10541Δ*tehB nadK* copia2 del Ejemplo 3, la cepa parental *E. coli* KCCM10541 y la cepa KCCM10541Δ*tehB* y la cepa KCCM10541 *nadK* copia2 preparada en los Ejemplos comparativos 1 y 2 por titulación utilizando glucosa como fuente de carbono. Se cultivó cada una de las cepas que tenían diferentes características genéticas en medios sólidos LB en una incubadora a 33 °C durante toda la noche. A continuación, se inoculó 1 asa bacteriológica de platino en 25 ml de medio de titulación que contenía glucosa, tal como se muestra en la Tabla 11 a continuación y se cultivó en la incubadora a 33 °C y a 200 rpm durante 48 horas. En la Tabla 12 se muestran los resultados. Todos los resultados representan el valor medio
25 obtenido de los tres matraces.

Tabla 11

[Tabla 11]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	70 g
KH ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	28 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ 4H ₂ O	5 mg
Extracto de levadura	2 g
L- metionina	0,15 g
Carbonato cálcico	30 g
pH	pH 6,8

30 Tabla 12

[Tabla 12]

Cepa	DO	Consumo de azúcar (g/l) *	L-treonina(g/l)* *
KCCM10541	14,0	26,7	27,6
KCCM10541 <i>tehB</i>	13,2	26,9	28,7

Cepa	DO	Consumo de azúcar (g/l) *	L-treonina(g/l)* **
KCCM 10541 <i>nadK</i> copia2	13,8	28,9	28,4
KCCM 10541 <i>tehBnadK</i> copia2	12,5	30,3	30,1
* valor medido 24-h			
** valor medido 48-h			

La cepa KCCM10541 Δ *tehB nadK* copia2, *E. coli* productora de L-treonina con delección del gen *tehB* y potenciación de actividad NAD, y con capacidad de asimilación de glucosa fue designada CA03-448, y la cepa KCCM10541 Δ *tehBnadK* copia2/pAcscBAR⁺-mak, la cepa KCCM10541 Δ *tehB nadK* copia2 a la que se proporcionó capacidad de asimilación de sacarosa, fue designada CA03-449. Y fueron depositadas en la Autoridad Depositaria Internacional del Centro de cultivos de microorganismos coreano, que es filial de la Colección de Cultivos de la Federación Coreana de Colecciones de Cultivo (con domicilio en 361-221, Hongje-1-dong, Seodaemon-gu, Seúl, Corea) el 10 de enero de 2011, con números de depósito asignados (acceso) KCCM11167P y KCCM11168P respectivamente.

Ejemplo Experimental 2: Titulación de cepa productora de L-triptófano que presenta una potenciación de la actividad de NAD quinasa e inactivación de la enzima codificada por el gen *tehB*

Se sometieron a ensayo la cepa recombinante *E. coli* KCCM10812 Δ *tehB nadK* copia2 del Ejemplo 4, la cepa parenteral *E. coli* KCCM10812, y la cepa KCCM10812 Δ *tehB* y la cepa KCCM10812 *nadK* copia2 preparadas en los Ejemplos comparativos 1 y 2 por titulación utilizando glucosa como fuente de carbono.

Para la titulación, se inoculó 1 asa bacteriológica de platino de la cepa y se cultivó en medios sólidos LB durante toda la noche. A continuación, se inoculó 1 asa bacteriológica de platino en 25 ml de medio de titulación de matraz que tenía la composición que se indica en la siguiente Tabla 13 y después se cultivó a 37° C y a 200 rpm durante 48 horas. En la tabla 14 se muestran los resultados. Todos los resultados se representan como el valor medio obtenido de los tres matraces.

Tabla 13

[Tabla 13]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	60 g
KH ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Citrato sódico	5 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato cálcico	40 g
Citrato sódico	5 g
Fenilalanina	0,15 g
Tirosina	0,1 g
pH	6,8

Tabla 14

[Tabla 14]

Cepa	DO	Consumo de azúcar (g/l) *	L-triptófano(g/l)* **
KCCM10812P	13,0	54,8	6,8
KCCM10812P <i>tehB</i>	14,5	55,0	7,0
KCCM10812P <i>nadK</i> copia2	13,3	57,6	6,9
KCCM10812P <i>tehBnadK</i> copia2	14,2	57,3	7,7
* valor medido 33-h			
** valor medido 48-h			

Tal como se muestra en la Tabla 14, cuando se suprimió el gen *tehB*, aumentó la densidad celular a aproximadamente 10 % en comparación con la cepa parental. Cuando se potenció la actividad NAD quinasa, mejoró la capacidad de asimilación de glucosa pero no hubo diferencia en la productividad de triptófano, en comparación con la cepa parental.

Sin embargo, cuando se introdujeron las dos mutaciones al mismo tiempo, aumentó la densidad celular, también mejoró la capacidad de asimilación de glucosa y aumentó la productividad de triptófano a aproximadamente 14 %.

La cepa KCCM10812P Δ *tehB nadK* copia2, *E. coli* productor de L- triptófano con delección del gen *tehB* y potenciación de la actividad de NAD quinasa, se designó CA04-2001, y fue depositada en la Autoridad Depositaria Internacional del Centro de cultivos de microorganismos coreano, que es filial de la Colección de Cultivos de la Federación Coreana de Colecciones de Cultivo (con domicilio en 361-221, Hongje-1-dong, Seodaemon-gu, Seúl,

Corea) el 10 de enero de 2011, con el número de depósito asignado (acceso) KCCM11166P.

<110> CJ CheilJedang Corporation

5 <120> A MICROORGANISM HAVING ENHANCED L-AMINO ACIDS PRODUCTIVITY AND PROCESS FOR PRODUCING L-AMINO ACIDS USING THE SAME

<130> OPA11180PCT

10 <150> KR10-2011-0005136
<151> 18-01-2011

<160> 21

15 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 594

<212> ADN

20 <213> *Escherichia coli*

<400> 1

```

atgatcattc gtgacgaaaa ctatctttact gataaatatg aattaacccg cacacactct      60
gaagtactgg aagcgggtgaa agtgggttaaa ccgggtataaa cgctggatct gggctgtggc      120
aatggtcgta acagtcttta cctggcagcc aatgggttatg atgttgacgc atgggataaa      180
aatgccatga gtatcgccaa cgtcgagcgc attaaatoca ttgaaaatct ggataattta      240
cacaccgag toggtgatct gaataacctc acatttgata gacagtacga ttttattctt      300
tcgactgtgg tgctgatgtt ccttgaggct aaaaccatcc ccgggttgat tgccaatatg      360
caacggttga ctaaacctgg tggttacaac ctgattgtgg cggcgatgga taccgctgat      420
tatccatgta ccgtcggctt cccgtttgcc ttcaaagagg gagaattacg tcgatattac      480
gaaggctggg agagggtgaa atacaatgaa gacgtcggcg agctgcaccg cacogacgcc      540
aacggtaatc gtattaaact gcgtttcgcc acgatgctgg cacgtaaaaa atga          594

```

25 <210> 2
<211> 197

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Metiltransferasa dependiente de S-ádenosil-L-metionina prevista

<400> 2

35

```

Met Ile Ile Arg Asp Glu Asn Tyr Phe Thr Asp Lys Tyr Glu Leu Thr
  1             5             10             15

Arg Thr His Ser Glu Val Leu Glu Ala Val Lys Val Val Lys Pro Gly
          20             25             30

Lys Thr Leu Asp Leu Gly Cys Gly Asn Gly Arg Asn Ser Leu Tyr Leu
          35             40             45

Ala Ala Asn Gly Tyr Asp Val Asp Ala Trp Asp Lys Asn Ala Met Ser
          50             55             60

```

Ile Ala Asn Val Glu Arg Ile Lys Ser Ile Glu Asn Leu Asp Asn Leu
65 70 75 80

His Thr Arg Val Val Asp Leu Asn Asn Leu Thr Phe Asp Arg Gln Tyr
85 90 95

Asp Phe Ile Leu Ser Thr Val Val Leu Met Phe Leu Glu Ala Lys Thr
100 105 110

Ile Pro Gly Leu Ile Ala Asn Met Gln Arg Cys Thr Lys Pro Gly Gly
115 120 125

Tyr Asn Leu Ile Val Ala Ala Met Asp Thr Ala Asp Tyr Pro Cys Thr
130 135 140

Val Gly Phe Pro Phe Ala Phe Lys Glu Gly Glu Leu Arg Arg Tyr Tyr
145 150 155 160

Glu Gly Trp Glu Arg Val Lys Tyr Asn Glu Asp Val Gly Glu Leu His
165 170 175

Arg Thr Asp Ala Asn Gly Asn Arg Ile Lys Leu Arg Phe Ala Thr Met
180 185 190

Leu Ala Arg Lys Lys
195

<210> 3
<211> 879
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> gen nadK

<400> 3

atgaataatc atttcaagtg tatttggcatt gtgggacacc cacggcaccc cactgcactg	60
acaacacatg aaatgctcta ccgctggctg tgcacaaaag gttacgaggt catogttgag	120
caacaaatcg ctcacgaact gcaactgaag aatgtgaaaa ctggcacgct cgoggagatt	180
gggcaactag ctgatctcgc ggtagtcggt ggtggcgacg gtaatatgct gggcgcgga	240
cgcacactcg ccggttacga tattaaagtt attggaatca accgtggcaa cctgggtttc	300
ctgactgacc ttgacccoga taacgcccag caacagttag ccgatgtgct ggaaggccac	360
tacatcagcg agaaacgttt tttgctggaa gcgcaagtct gtcagcaaga ttgccagaaa	420
cgcacatcagca ccgcgataaa tgaagtgggt cttcatccag gcaaagtggc gcatatgatt	480
gagttcgaag tgtatatcga cgagatcttt gcgttttctc agcgatctga tggactaatt	540
atttcgacgc caacaggctc caccgcctat tccctctctg caggcggtcc tattctgacc	600
cctctctctg atgcgattac cctggtgccc atgttcccgc atacgttgtc agcacgacca	660
ctggtcataa acagcagcag cagcatccgt ctgcgttttt cgcacgccc taacgacctg	720
gaaatcagtt gcgacagcca gatagcactg ccgattcagg aaggtgaaga tgtcctgatt	780
cgtcgctgtg attacatct gaatctgatt catccgaaag attacagtta tttcaacaca	840
ttaagcacca agctcggctg gtcaaaaaaa ttattctaa	879

<210> 4
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> NAD quinasa

<400> 4

Met	Asn	Asn	His	Phe	Lys	Cys	Ile	Gly	Ile	Val	Gly	His	Pro	Arg	His	1	5	10	15
Pro	Thr	Ala	Leu	Thr	Thr	His	Glu	Met	Leu	Tyr	Arg	Trp	Leu	Cys	Thr	20	25	30	
Lys	Gly	Tyr	Glu	Val	Ile	Val	Glu	Gln	Gln	Ile	Ala	His	Glu	Leu	Gln	35	40	45	
Leu	Lys	Asn	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile	Gly	Gln	Leu	Ala	50	55	60	
Asp	Leu	Ala	Val	Val	Val	Gly	Gly	Asp	Gly	Asn	Met	Leu	Gly	Ala	Ala	65	70	75	80
Arg	Thr	Leu	Ala	Arg	Tyr	Asp	Ile	Lys	Val	Ile	Gly	Ile	Asn	Arg	Gly	85	90	95	
Asn	Leu	Gly	Phe	Leu	Thr	Asp	Leu	Asp	Pro	Asp	Asn	Ala	Gln	Gln	Gln	100	105	110	
Leu	Ala	Asp	Val	Leu	Glu	Gly	His	Tyr	Ile	Ser	Glu	Lys	Arg	Phe	Leu	115	120	125	
Leu	Glu	Ala	Gln	Val	Cys	Gln	Gln	Asp	Cys	Gln	Lys	Arg	Ile	Ser	Thr	130	135	140	
Ala	Ile	Asn	Glu	Val	Val	Leu	His	Pro	Gly	Lys	Val	Ala	His	Met	Ile	145	150	155	160
Glu	Phe	Glu	Val	Tyr	Ile	Asp	Glu	Ile	Phe	Ala	Phe	Ser	Gln	Arg	Ser	165	170	175	
Asp	Gly	Leu	Ile	Ile	Ser	Thr	Pro	Thr	Gly	Ser	Thr	Ala	Tyr	Ser	Leu	180	185	190	
Ser	Ala	Gly	Gly	Pro	Ile	Leu	Thr	Pro	Ser	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Leu	195	200	205	
Val	Pro	Met	Phe	Pro	His	Thr	Leu	Ser	Ala	Arg	Pro	Leu	Val	Ile	Asn	210	215	220	
Ser	Ser	Ser	Thr	Ile	Arg	Leu	Arg	Phe	Ser	His	Arg	Arg	Asn	Asp	Leu	225	230	235	240
Glu	Ile	Ser	Cys	Asp	Ser	Gln	Ile	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	Glu	Gly	Glu	245	250	255	
Asp	Val	Leu	Ile	Arg	Arg	Cys	Asp	Tyr	His	Leu	Asn	Leu	Ile	His	Pro	260	265	270	
Lys	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Phe	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Lys	Leu	Gly	Trp	Ser	275	280	285	
Lys	Lys	Leu	Phe													290			

<210> 5
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 664 837 T3

<220>

<223> Producto de PCR obtenido con el uso de Cebador 7 y Cebador 8

<400> 5

5

```

cccgaattcg cgtcagctca atgccttcaa ccatcgcaga catatccggg ttagctttat      60
cagccacttc cagcgcacga tccaggctat caatcacogg cagcaattcg ttgatgaatt      120
tctccagcgc gaatttgtgg gctttttcaa tatccagttc agtacgacga cgcaggtttt      180
ccatttcggc ttttacacgc aaaatgcogt caggttcacg ggtctgggct tcagccagct      240
gagcttcgag attcgcaact ttttcacgc gcggatccac ctgctcagca gaagcttctg      300
gctcaactgc ctcaatctct tcgtgctgat ccatgataat ttcttcoggg gcttgccctt      360
caggcgtttt ctgttcttta ctactcatga atttctccgc gtttttttctg cattcatctc      420
gctaacttctg cttattatgg ggatcagttt cagggtttca aggaagcac tcacattgtc      480
atcaatcttc gcaacaagga cctcggaata atgaataatc atttcaagtg tattggcatt      540
gtgggacacc cagggcacc cactgactg acaacacatg aaatgctcta ccgctggctg      600
tgcacaaaag gttacgaggt catcggtgag caacaaatcg ctcacgaact gcaactgaag      660
aatgtgaaaa ctggcacgct cggcgagatt gggcaactag ctgatctcgc ggtagtcgtt      720
ggtggcgacg gtaatatgct gggcgcgga cgcacactcg ccggttacga tattaagtt      780
attggaatca accgtggcaa cctgggttct ctgactgacc ttgacccga taacgccag      840
caacagttag ccgatgtgct ggaaggccac tacatcagcg agaaacgttt ttgctggaa      900
gcgcaagtct gtcagcaaga ttgccagaaa cgcacagca ccgcgataaa tgaagtggg      960
cttcatccag gcaagtggc gcatatgatt gagttcgaag tgtatatcga cgagatcttt      1020
gcgttttctc agcgatctga tggactaatt atttcgacgc caacaggctc caccgcctat      1080
tcctctctcg caggcggtcc tattctgacc cctctctggt atgcgattac cctggtgccc      1140
atgttccgcg atacgttgct agcacgacca ctggtcataa acagcagcag cagatccgt      1200
ctgcgttttt cgcacgcgcg taacgacctg gaaatcagtt gcgacagcca gatagcactg      1260
cogattcagg aaggtgaaga tgtcctgatt cgtcgctgtg attaccatct gaatctgatt      1320
catccgaaag attacagta tttcaacaca ttaagcacca agctcggctg gtcaaaaaaa      1380
ttattctaatt tttacgccag ctctaga      1407

```

<210> 6

<211> 80

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador 1

<400> 6

15

```

gcacacactc tgaagtactg gaagcgggta aagtgggtta accgggtaaa acgctggatt      60
aggtgacact atagaacgcg      80

```

ES 2 664 837 T3

5	<210> 7 <211> 80 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador 2	
	<400> 7 caccctctcc cagccttcgt aatatcgacg taattctccc tctttgaagg caaacgggaa	60
10	tagtggatct gatgggtacc	80
15	<210> 8 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador 3 gtgacgaaaa ctattttact gataaatatg aattaaccog cacacactct gaagtactg	59
20	<210> 9 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador 4	
25	<400> 9 gtcggtgcgg tgcagctcgc cgacgtcttc attgtatttc accctctccc agccttcgta	60 60
30	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador 5	
40	<400> 10 tttaggcgca ggcgttttct	20
45	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador 6	
50	<400> 11 tttacgtgc cagcatcgtg	20
55	<210> 12 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador 7	
60	<400> 12 cccgaattcg cgtcagctca atgccttca	29

5 <210> 13
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 8
 <400> 13
 10 **gggtctagag ctggcgtaaa attagaata** 29
 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 9
 20 <400> 14
tggtattcac tccagagcga 20
 <210> 15
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador 10
 30 <400> 15
gcacacgac cgcgataaa 19
 <210> 16
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador 11
 <400> 16
catgtgtgt cagtcagt 19
 45 <210> 17
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador 12
 <400> 17
 55 **cgcgatatct agcatatgcc gggtagcgca ctagtgaga gtaaacggcg aagt** 54
 <210> 18
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador 13
 <400> 18

attcgccgg agccctgcag gtgcacgagt acatttgagc gactgt 46

5 <210> 19
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador 14

<400> 19
cactgcagtg gggtaaagtc catcg 25

15 <210> 20
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador 15

<400> 20
aacggccgctc tcgggtgctca ttact 25

25 <210> 21
<211> 9129
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Vector pAcscBAR'-mak

<400> 21

tatggcaatg aaagacgggtg agctgggtgat atgggatagt gttcaccott gttacaccgt 60

tttccatgag caaactgaaa cgttttcatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg 120

gcagtttcta cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctatatt 180

ccctaaagggt tttattgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttcac 240

cagttttgat ttaaactgtg ccaatatgga caacttcttc gccccggtt tcaccatggg 300

caaattattat acgcaaggcg acaagggtgct gatgcccgtg gcgattcagg ttcacatgc 360

cgtctgtgat ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcgatga 420

gtggcagggc ggggcgtaat ttttttaagg cagttattgg tgccctaaa cgcctggtgc 480

tacgcctgaa taagtataa taagcggatg aatggcagaa attcgaaaagc aaattcgacc 540

cggtcgtcgg ttcagggcag ggtcggttaa tagccgctta tgtctattgc tggtttaccg 600

gtttattgac taccggaagc agtgtgaccg tgtgcttctc aaatgcctga ggccagtttg 660

ctcaggctct ccccgtagg gtaataattg acgatatgat catttattct gcctccaga 720

gcctgataaa aacgggttagc gcttcgttaa tacagatgta ggtgttccac agggtagcca 780

gcagcatcct gcgatgcaga tccggaacat aatgggtgcag ggcgcttgtt tcggcgtggg 840

tatggtggca gggcccggtg ccgggggact gttgggcgct gccggcacct gtcctacgag 900

ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata gtcatgcccc gcgcccaccg 960

gaaggagcta ccggacagcg gtgcccactg ttgtaactca gaataagaaa tgaggccgct 1020

35

catggcggttg	actctcagtc	atagtatcgt	ggtatcaccg	gttggttcca	ctctctgttg	1080
cgggcaactt	cagcagcacg	taggggactt	ccgcgtttcc	agactttacg	aaacacggaa	1140
accgaagacc	attcatgttg	ttgctcaggt	cgcagacggt	ttgcagcagc	agtcgcttca	1200
cgttcgctcg	cgtatcggtg	attcattctg	ctaaccagta	aggcaacccc	gccagcctag	1260
ccgggtcctc	aacgacagga	gcacgatcat	gcgcacccgt	ggccaggacc	caacgctgcc	1320
cgagatgctc	cgcgtgcggc	tgctggagat	ggcggacgcg	atggatatgt	tctgccaaag	1380
gttggtttgc	gcattcacag	ttctccgcaa	gaattgattg	gtccaattc	ttggagtgg	1440
gaatccgtta	gcgaggtgcc	gccggcttcc	attcaggtcg	agggtggccc	gctccatgca	1500
ccgcgacgca	acgcggggag	gcagacaagg	tatagggcgg	cgcctacaat	ccatgccaac	1560
ccgttccatg	tgctcgccga	ggcggcataa	atcgccgtga	cgatcagcgg	tccagtgatc	1620
gaagttaggc	tgtaagagc	cgcgagcgat	ccttgaagct	gtccctgatg	gtcgtcatct	1680
acctgcctgg	acagcatggc	ctgcaacgcg	ggcatcccga	tgccgcggga	agcgagaaga	1740
atcataatgg	ggaaggccat	ccagcctcgc	gtcgcgaacg	ccagcaagac	gtagcccagc	1800
gcgtcgcccg	tctcggtgct	cattacttat	tgcgggatgc	ggcgtgaacg	cottatccgc	1860
cctacgcggg	tctggcacat	tttgcaaggc	tgataagacg	cggcaagcgt	cgcacagggc	1920
atcggagcac	ttattgccgg	atgcggcggt	aacgccttat	ccggcctacg	gttctggcac	1980
cttttgtagg	cctgataaga	cgcggcaagc	gtcgcacag	gcacgatgcg	ccaattgcct	2040
acgtttttta	ctcttgtggc	cataaccacg	cagcgcgcg	tacgcgcgtg	gaatcacctg	2100
gcttcgcctt	acgcaccggc	gtttcacatt	cgcgcgcgaa	gacaaattgt	ttaatcaact	2160
gcccacccgt	ttgatataaa	cggctctacat	tgctcatccc	gccccccagg	acaatcacat	2220
ccggatogag	aatattcacg	acatgtgcca	gcgattttgc	cagccgcagc	togtagcgac	2280
gcaatgccag	ttccgctacc	ggatcgcttt	cttcaaccag	gcggataatt	tactgcctt	2340
tcagcgcgat	tccgctcaaa	cgcgcgataat	ccatcgcgaa	tcccggtgcc	gaaataaagg	2400
tttcaataca	accttgttta	ccgcaataac	aagggaactt	ctcgcgataa	cgcagttcgt	2460
cttcgtccat	ccacggtagc	ggattgtgtc	cccactcacc	tgcgcgtcca	ttgccgcgca	2520
tatgcgcgcc	ccatttgaat	gccacgcccc	cgcgcgatcc	cgtgccgata	atcacggcaa	2580
ataccgtctg	cgtcccgct	gccgcgccat	ctactgcttc	tgaaaccgcc	agacagttag	2640
cgtcatttgc	cagccgcact	tcccgctgca	acctcgcgct	taagtcttta	togaatggct	2700
gaccgttgag	ccaggttgaa	ttggcattct	tcaccacacc	ggtgtaaggc	gaaattgagc	2760
caggaatgcc	catacctacc	gttcgcgcgt	gccccgtcgc	ctgctccgcc	atatcaacca	2820
acgtggcgat	cgtttcaata	gtctgcgggt	aatcatcacg	cggcgtgggc	agacgatggc	2880
ggtacaactg	ctcccctgca	tcgccagtg	caatcacttc	agttttggtg	ccgcctaaat	2940

cgatacctat acgcacggta ctctccttat ttttttcaat atcaatagcg tagagacgga	3000
caaccggatt ggcaatgcaa ggccgcgcgac aattcggttat catgcccgt aaattttaacg	3060
acaaggccgt ggaaattatc atgctgtggt tcaaaaattt aatggtttac cgtcttagcc	3120
gcgagatttc gctgcgtgca gaagagatgg aaaaacagct agcctcgatg gcattttacc	3180
cactgcaggt gcacgagtac atttgagcga ctgtaccaga acatgaatga ggcgtttgga	3240
ttaggcgatt attagcaggg ctaagcattt tactattatt attttcgggt tgagggatat	3300
agagctatcg acaacaaccg gaaaaagttt acgtctatat tgctgaagg acaggcggtt	3360
ccataactat ttgctcgcgt tttttactca agaagaaaat gccaaatagc aacatcaggc	3420
agacaatacc cgaaattgcg aagaaaactg tctggtagcc tgctgggtca aagagtatcc	3480
cagtcggcgt tgaaagcagc acaatcccaa gcgaactggc aatttgaaaa ccaatcagaa	3540
agatcgtcga cgacaggcgc ttatcaaagt ttgccacgct gtatttgaag acggatatga	3600
cacaaagtgg aacctcaatg gcattgtaaca acttcactaa tgaaataatc cagggggtta	3660
cgaacagcgc gcaggaaagg atacgcaacg ccataatcac aactccgata agtaatgcat	3720
tttttgccc taccgatcc acaaagaaag gaataatcgc catgcacagc gcttcgagta	3780
ccacctggaa tgagttgaga taaccataca ggcgcgttcc tacatcgtgt gattcgaata	3840
aacctgaata aaagacagga aaaagttggt gatcaaaaat gttatagaaa gaccacgtcc	3900
ccacaataaa tatgacgaaa acccagaagt ttcgatcctt gaaaactgcg ataaaaatcct	3960
ctttttttac ccctcccgca tctgcgcgta cgcactggtg atccttatct ttaaaacgca	4020
tggtgatcat cataaataca gcgccaaata gcgagaccaa ccagaagttg atatggggac	4080
tgatactaaa aaatatgccg gcaaagaacg cgccaatagc atagccaaaa gatccccagg	4140
cgcgcgctgt tccatattcg aaatgaaaat ttcgcgccat tttttcgggtg aagctatcaa	4200
gcaaaccgca toccgccaga taccgccagc caaaaaacag cgccccaga attagacct	4260
cagaaaaatt gctttgcagt aacggttcat aaacgtaaat cataaacggt ccggtcaaga	4320
ccaggatgaa actcatacac cagatgagcg gtttcttcag accgagttta tcctgaacga	4380
tgccgtagaa catcataaat agaatgctgg taaactggtt gaccgaataa agtgtacct	4440
attccgtccc tgtcaaccct agatgtcctt tcagccaaat agcgtataac gaccaccaca	4500
gcgaccagga aataaaaaag agaaatgagt aactggatgc aaaacgatag tacgcatttc	4560
tgaatggaat actcagtgcc ataattacct gcctgtcgtt aaaaaattca cgtcctattt	4620
agagataaga gogacttcgc cgtttacttc tcaactagt gcgtaccgg catatgctag	4680
atatcgactc cctcagttag cagcgttctt tgcattaacg caccaaaagg atcatcccc	4740
acccgacct taaaccact tgttcgcgct aatctggcga ttcccaccgc aacgttagct	4800

ggcgcgccgc caggacaagg cagtaggcgc ccgtctgatt ctggcaagag atctacgacc	4860
gcatccccta aaaccatac tttggctgac atttttttcc cttaaattca tctgagttac	4920
gcatagtgat aaacctcttt ttcgcaaaat cgtcatggat ttactaaaac atgcatattc	4980
gatcacaaaa cgtcatagtt aacgttaaca tttgtgatat tcatcgcat t atgaaagta	5040
agggacttta tttttataaa agttaacggt aacaattcac caaatttgct taaccaggat	5100
gattaaaaatg acgcaatctc gattgcatgc ggcgcaaaac gccctagcaa aacttcatga	5160
gcaccggggt aacactttct atccccattt tcacctgcgc cctcctgccg ggtggatgaa	5220
cgatccaaac ggcctgatct ggtttaacga tcgttatcac gcgttttata aacatcatcc	5280
gatgagcgaa cactgggggc caatgcactg gggacatgcc accagcgacg atatgatcca	5340
ctggcagcat gagcctattg cgctagcgcc aggagacgat aatgacaaag acgggtgttt	5400
ttcaggtagt gctgtcgatg acaatgggtg cctctcactt atctacaccg gacacgtctg	5460
gctcgatggt gcaggtaatg acgatgcaat tcgcgaagta caatgtctgg ctaccagtcg	5520
ggatggtatt catctcgaga aacaggggtg gatcctcact ccaccagaag gaatcatgca	5580
cttcggcgat cctaaagtgt ggcgtgaagc cgacacatgg tggatggtag tcggggcgaa	5640
agatccaggc aacacggggc agatcctgct ttatcgcggc agttcgttgc gtgaatggac	5700
cttcgatcgc gtactggccc acgctgatgc gggtgaaagc tatatgtggg aatgtccgga	5760
ctttttcagc cttggcgatc agcattatct gatgttttcc ccgcagggaa tgaatgccga	5820
gggatacagt taccgaaatc gctttcaaag tggcgtaata cccggaatgt ggtcgccagg	5880
acgacttttt gcacaatccg ggcattttac tgaacttgat aacgggcatg acttttatgc	5940
accacaaaagc tttttagcga aggatggtcg gcgtattggt atcggctgga tggatatgtg	6000
ggaatcgtca atgccctcaa aacgtgaagg atgggcaggc tgcattgacgc tggcgcgcca	6060
gctatcagag agcaatggca aacttctaca acgcccggta cacgaagctg agtcgttaag	6120
ccagcagcat caatctgtct ctccccgcac aatcagcaat aaatatgttt tgcaggaaaa	6180
cgcgcaagca gttgagattc agttgcagtg ggcgtgaag aacagtgatg ccgaacatta	6240
cggattacag ctcggcactg gaatgcggct gtatattgat aaccaatctg agcgacttgt	6300
tttgtggcgg tattaccocac acgagaattt agacggctac cgtagtattc cctcccgca	6360
gcgtgacacg ctcgccctaa ggatatttat cgatacatca tccgtggaag tatttattaa	6420
cgacggggaa gcggtgatga gtagtcgaat ctatccgcag ccagaagaac gggaaactgtc	6480
gctttatgcc toccacggag tggctgtgct gcaacatgga gcaactotggc tactgggtta	6540
acataatatc aggtggaaca acggatcaac agcgggcaag ggatccgcgt cactcttccc	6600
ccttcacgac cttcaataat atgcaatgca gcttcccgcc cgataatgtc atgtggaagc	6660
tgaattgtgg tcagcggcgg taaaaacaga tgcccgacgc caaccagatt atcaaagccc	6720

attacggcga catcctgcgg gattcgtacc cccttcgcca gaagaacctg ataagccaca	6780
aaggctgcgc gatcgttacc acatatcaga acatcaaaat ctggtttgcc cggtttgaag	6840
tgggcattga gtaaaacttg gagatcgggtg tagtgatcat cacctgttgc catgtgaaat	6900
tgtttcacct cagccagatc tcgttcagca tcacgccagg cctgctcaaa tccctgccga	6960
cgataccctg ttgccaacgc actttccggt agccagaagc ataacgggtg acgatagccc	7020
gccgcgagca aatgctgtgt tgattcatat tgtgcagtgt aatcatcagg gatataactg	7080
ggtaacgctg ggtcatccgc cacacagttc gccaatacaa tattttcacc atacagagac	7140
tcaggcagcg tgatatatcg cagccccatt gtagtataga taatgccatc cggacgggtg	7200
gcaagcagct gacgtgccgc gcgggcagcg tcattctcag aaaaaatatt gattaaaaaa	7260
ctattccagc cgaactogct ggcggtttgc tcaatggcaa gcagaatatc aacagagaaa	7320
ggagtggtag ccgtgtcctg cgcagcacg gcgagagtcg acggcttacg tccttgagcg	7380
cgcattctac gggcggaag atcaggaaca taattcaggg tctggattgc ctgcaatacg	7440
cggtcacgcg ttgcaggacg cacagattct gcattatgca tcaccggga gactgtcatc	7500
atcgacactc ccgccaggcg tgcgacatcc tttaatgaag ccatacccaa gccgtttgcc	7560
gtaaaacggg cactgtagca gaaacagacg tcactggcga gatocaacgc cctatcacct	7620
gacacagcaa tacaataaaa aataacaata attcccggac aattgtcccc agttccgcct	7680
ctgttctcgc caacgagtct agaaatattt tatctgatta ataagatgat cttcttgaga	7740
togttttggt ctgcgcgtaa tctcttgctc tgaaaacgaa aaaaccgcct tgcagggcgg	7800
tttttcgaag gttctctgag ctaccaactc tttgaaccga ggtaactggc ttggaggagc	7860
gcagtcacca aaacttgtcc tttcagttta gccttaaccg gcgcatgact tcaagactaa	7920
ctcctctaaa tcaattacca gtggctgctg ccagtgggtc ttttgcatgt ctttccgggt	7980
tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc ggactgaacg gggggttcgt	8040
gcatacagtc cagcttggag cgaactgcct acccggaact gagtgtcagg cgtggaatga	8100
gacaaacgcg gccataacag cggaatgaca ccggtaaacc gaaaggcagg aacaggagag	8160
cgcacgaggg agccgccagg gggaaacgcc tggatatctt atagtccgtg cgggtttcgc	8220
caccactgat ttgagcgtca gatttcgtga tgcttgtcag gggggcggag cctatggaaa	8280
aacggctttg ccgcggccct ctcaactccc tgtaagtat cttcctggca tcttcagga	8340
aatctccgcc ccgttcgtaa gccatttcgc ctgcgcgag tcgaacgacc gagcgtagcg	8400
agtcagtgag cgaggaagcg gaatatatcc tgtatcacat attctgctga cgcaccggtg	8460
cagccttttt tctcctgcc catgaagcac ttactgaca ccctcatcag tgccaacata	8520
gtaagccagt atacactccg ctagcgtga tgccggcg tgcttttgcc gttacgcacc	8580

ES 2 664 837 T3

accccgtcag tagctgaaca ggagggacag ctgatatgaaa cagaagccac tggagcacct	8640
caaaaacacc atcatacact aaatcagtaa gttggcagca tcaccgacg cactttgccc	8700
cgaataaata cctgtgacgg aagatcactt cgcagaataa ataaatcctg gtgtccctgt	8760
tgataccggg aagccctggg ccaacttttg gcgaaaatga gacgttgatc ggcaagtaag	8820
aggttccaac tttcaccata atgaaataag atcactaccg ggcgtatttt ttgagttatc	8880
gagattttca ggagctaagg aagctaaaaat ggagaaaaaa atcactggat ataccaccgt	8940
tgatatatcc caatggcatc gtaaagaaca ttttgaggca tttcagtcag ttgctcaatg	9000
tacctataac cagaccgttc agctggatat tacggccttt ttaaagaccg taaagaaaaa	9060
taagcacaag ttttatccgg cctttattca cattcttgcc cgctgatga atgctcatcc	9120
ggaattcog	9129

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo del género *Escherichia* que tiene productividad de L-aminoácido, en el que se transforma el microorganismo para tener una actividad de NAD quinasa potenciada y una actividad inactivada de la enzima que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2 codificada por el gen *tehB*.
5
2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la NAD quinasa es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4.
3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se potencia la actividad de NAD quinasa a través de uno o más métodos de aumento del número de copias por inserción cromosómica o introducción de vector, sustitución o modificación de la región reguladora de expresión.
10
4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la inactivación se lleva a cabo a través de uno o más métodos de delección de la totalidad o una parte del gen por recombinación homóloga, supresión de la expresión de enzima por inserción de transposón dentro del gen correspondiente y supresión de expresión de enzima por inserción de genes con resistencia a antibiótico.
15
5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo del género *Escherichia* es *E.coli*.
20
6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el L-aminoácido es L-treonina o L-triptófano.
7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que se proporciona capacidad de asimilación de sacarosa al microorganismo del género *Escherichia*.
25
8. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo del género *Escherichia* es un *E. coli* productor de L-treonina, CA03-448, que tiene el No. de depósito KCCM11167P o CA03-449, que tiene el No. de depósito KCCM11168P.
30
9. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo del género *Escherichia* es un *E. coli* productor de L-triptófano, CA04-2001, que tiene el No. de depósito KCCM11166P.
10. Un método para producir L-aminoácidos que comprende las etapas de inoculación y cultivo del microorganismo del género *Escherichia* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en un medio de cultivo que contiene total o parcialmente sacarosa o glucosa como fuente de carbono, y separación del L-aminoácido del medio de cultivo.
35
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el L-aminoácido es L-treonina o L-triptófano.

[Fig. 1]

