



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 300 888**

(51) Int. Cl.:
C12P 13/06 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05004526 .9**
(86) Fecha de presentación : **26.09.2002**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1548120**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

(54) Título: **Proceso para la producción de L-aminoácidos utilizando cepas de la familia Enterobacteriáceas que contienen un gen fadR intensificado.**

(30) Prioridad: **02.11.2001 DE 101 54 102**

(73) Titular/es: **Evonik Degussa GmbH**
Bennigsenplatz 1
40474 Düsseldorf, DE

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2008

(72) Inventor/es: **Rieping, Mechthild y**
Siebelt, Nicole

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2008

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Proceso para la producción de L-aminoácidos utilizando cepas de la familia enterobacteriáceas que contienen un gen fadR intensificado.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la producción de L-aminoácidos, seleccionados del grupo de L-valina, L-homoserina, L-lisina y L-treonina, que utiliza cepas de la familia Enterobacteriáceas, en las cuales el gen fadR está sobreexpresado.

Técnica anterior

Los L-aminoácidos, en particular L-treonina, se utilizan en medicina humana y en la industria de productos farmacéuticos, en la industria alimentaria y muy particularmente en nutrición animal.

Es sabido que los L-aminoácidos se producen por fermentación de cepas de Enterobacteriáceas, en particular *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*. Debido a su gran importancia, se están realizando continuamente esfuerzos para mejorar el proceso de producción. Las mejoras en el proceso pueden referirse a medidas que conciernen a la tecnología de la fermentación, tales como por ejemplo agitación y suministro de oxígeno, o a la composición del medio nutriente, tal como por ejemplo la concentración de azúcar durante la fermentación, o a preparar el terreno para la obtención del producto mediante, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, o a las características intrínsecas de eficiencia del microorganismo propiamente dicho.

Las características de eficiencia de estos microorganismos se mejoran utilizando métodos de mutagénesis, selección y selección de mutantes. De esta manera, se obtienen cepas que son resistentes a antimetabolitos, tales como por ejemplo el análogo de treonina ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV), o son auxótrofas para metabolitos importantes en cuanto a la regulación y producen L-aminoácidos, tales como por ejemplo L-treonina.

Desde hace algunos años, se han estado utilizando análogamente métodos de la tecnología del DNA recombinante para mejorar las cepas de la familia Enterobacteriáceas que producen L-aminoácidos por amplificación de genes de la biosíntesis de aminoácidos individuales e investigación del efecto sobre la producción.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es proporcionar nuevas medidas para la producción mejorada por fermentación de L-aminoácidos, seleccionados del grupo L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina.

Sumario de la invención

La invención proporciona un proceso para la producción por fermentación de dichos L-aminoácidos utilizando microorganismos de la familia Enterobacteriáceas, que producen ya en particular dichos L-aminoácidos y en los cuales el gen fadR o una o más secuencias de nucleótidos que codifica(n) el producto génico de dicho gen fadR está(n) sobreexpresado(s).

Descripción detallada de la invención

Debe entenderse que cualquier mención subsiguiente de L-aminoácidos o aminoácidos significa uno o más aminoácidos, con inclusión de las sales de los mismos, seleccionados del grupo que comprende L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina. Se prefiere particularmente L-treonina.

En este contexto, el término "intensificación" describe el aumento en la actividad intracelular de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo, enzimas o proteínas que están codificadas por el DNA correspondiente, por ejemplo por aumento del número de copias del gen o genes, por utilización de un promotor fuerte o un gen o alelo que codifica una enzima o proteína correspondiente que tiene actividad elevada, y opcionalmente por combinación de estas medidas.

La intensificación, en particular sobreexpresión, mide el aumento de la actividad o concentración de la proteína correspondiente en general al menos en un 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, como máximo en 1000% o 2000%, con relación a la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

La invención proporciona un proceso para la producción de L-aminoácidos seleccionados del grupo L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina, en el cual se llevan a cabo los pasos siguientes:

- a) fermentación de microorganismos modificados de la familia Enterobacteriáceas que producen el L-aminoácido deseado, en donde la sobreexpresión del gen fadR de *Escherichia coli* o de secuencias de nucleótidos que codifican el producto del gen fadR conduce a un aumento de al menos 10% de la actividad o concentra-

ES 2 300 888 T3

ción de dicha proteína fadR, con relación a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida,

b) acumulación del L-aminoácido deseado en el medio o en las células de los microorganismos de la familia Enterobacteriáceas y

c) aislamiento del L-aminoácido deseado, en donde los constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o fracciones de la misma (>0 hasta 100%) quedan opcionalmente en el producto.

Los microorganismos proporcionados por la presente invención son capaces de producir dichos L-aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, opcionalmente almidón, opcionalmente celulosa o a partir de glicerol y etanol. Los mismos son representativos de la familia Enterobacteriáceas seleccionados de los géneros *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*. Se prefieren los géneros *Escherichia* y *Serratia*. Dentro del género *Escherichia*, puede mencionarse en particular la especie *Escherichia coli* y, dentro del género *Serratia*, la especie *Serratia marcescens*.

Cepas adecuadas del género *Escherichia*, en particular cepas productoras de L-treonina, en particular de la especie *Escherichia coli* son por ejemplo

Escherichia coli TF427

Escherichia coli H4578

Escherichia coli KY10935

Escherichia coli VNIIGenetika MG442

Escherichia coli VNIIGenetika M1

Escherichia coli VNIIGenetika 472T23

Escherichia coli BKIIM B-3996

Escherichia coli kat 13

Escherichia coli KCCM-10132.

Cepas productoras de L-treonina adecuadas del género *Serratia*, en particular de la especie *Serratia marcescens* son por ejemplo

Serratia marcescens HNr21

Serratia marcescens TLR156

Serratia marcescens T2000.

Las cepas productoras de L-treonina de la familia Enterobacteriáceas tienen preferiblemente, entre otras, una o más de las características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo: resistencia a ácido α -amino- β -hidroxivalérico, resistencia a tialisina, resistencia a etionina, resistencia a α -metilserina, resistencia a ácido diaminosuccínico, resistencia a ácido α -aminobutírico, resistencia a borrelidina, resistencia a rifampicina, resistencia a análogos de valina tales como por ejemplo hidroxamato de valina, resistencia a análogos de purina, tales como por ejemplo 6-dimetilaminopurina, dependencia de L-metionina, opcionalmente dependencia parcial y contrarrestable de L-isoleucina, dependencia de ácido meso-diaminopimélico, auxotrofia con relación a dipéptidos que contienen treonina, resistencia a L-treonina, resistencia a L-homoserina, resistencia a L-lisina, resistencia a L-metionina, resistencia a ácido L-glutámico, resistencia a L-aspartato, resistencia a L-leucina, resistencia a L-fenilalanina, resistencia a L-serina, resistencia a L-cisteína, resistencia a L-valina, sensibilidad a fluoropiruvato, déficit de treonina-deshidrogenasa, facultad opcional de utilizar sacarosa, intensificación del operón treonina, intensificación de la homoserina-deshidrogenasa L-aspartato-quinasa I, preferiblemente la forma resistente a la realimentación, intensificación de homoserina-quinasa, intensificación de treonina-sintasa, intensificación de aspartato-quinasa, opcionalmente la forma resistente a la realimentación, intensificación de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, intensificación de fosfo-enolpiruvato-carboxilasa, opcionalmente la forma resistente a la realimentación, intensificación de fosfoenolpiruvato-sintasa, intensificación de transhidrogenasa, intensificación del producto del gen RhtB, intensificación del producto del gen RhtC, intensificación del producto del gen YfiK, intensificación de una piruvato-carboxilasa, y atenuación de la formación de ácido acético.

Se ha encontrado que, después de la sobreexpresión del gen fadR, los microorganismos de la familia Enterobacteriáceas producen dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, de manera mejorada.

ES 2 300 888 T3

Las secuencias de nucleótidos de los genes de *Escherichia coli* forman parte de la técnica anterior y pueden ser obtenidas también por la secuencia del genoma de *Escherichia coli* publicada por Blattner *et al.* (Science 277: 1453-1462 (1997)).

Gen *iclR* (no es parte de la invención):

Descripción: Regulador del metabolismo central intermedio, represor del operón *aceBAK* (*iclR*)

Referencia: Sunnarborg *et al.*; Journal of Bacteriology 172(5): 2642-2649 (1990); Cortay *et al.*; EMBO Journal 10(3): 675-679 (1991)

No. de Acceso: AE000475

Gen *fadR*:

Descripción: Regulador del metabolismo de ácidos grasos y acetato (*FadR*)

Referencia: DiRusso; Nucleic Acids Research 16(16): 7995-8009 (1988); Raman *et al.*; Journal of Biological Chemistry 272(49): 30645-30650 (1997)

No. de Acceso: AE000217

Nombres alternativos de genes: *dec*, *ole*, *thdB*

Las secuencias de ácido nucleico pueden obtenerse de las bases de datos del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI), la Librería Nacional de Medicina (Bethesda, MD, EE.UU.), la base de datos de secuencias de nucleótidos de los Laboratorios Europeos de Biología Molecular (EMBL, Heidelberg, Alemania o Cambridge, Reino Unido) o el Banco de Datos de DNA de Japón (DDBJ, Mishima, Japón).

Los genes descritos en las referencias indicadas pueden utilizarse de acuerdo con la invención. Pueden utilizarse también alelos de los genes originados por la degeneración del código genético o por mutaciones de sentido funcionalmente neutras.

La intensificación puede conseguirse, por ejemplo, por aumento de la expresión génica o de las propiedades catalíticas de las proteínas. Ambas medidas pueden combinarse opcionalmente.

La sobreexpresión puede conseguirse por aumento del número de copias de los genes correspondientes o por mutación del promotor y la región reguladora o el sitio de fijación de ribosoma localizado aguas arriba del gen estructural. Las casetes de expresión incorporadas aguas arriba del gen estructural actúan de la misma manera. Adicionalmente, es posible aumentar la expresión durante la producción de L-treonina por fermentación mediante promotores inducibles. La expresión se mejora también por medidas para extender la vida útil del mRNA. La actividad enzimática se intensifica además por prevención de la degradación de la proteína enzimática. Los genes o constructos de genes pueden o bien estar presentes en plásmidos en un número de copias variable, o integrarse en el cromosoma y amplificarse. Alternativamente, la sobreexpresión de los genes en cuestión puede conseguirse también por modificación de la composición de los medios y las condiciones de cultivo.

Las personas expertas en la técnica encontrarán orientaciones en este sentido, entre otros lugares, en Chang y Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), en Hartley y Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), en Amann y Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), en de Broer *et al.* (Proceedings de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 80: 21-25 (1983)), en Lavallie *et al.* (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), en PCT/US 97/13359, en Llosa *et al.* (Plasmid 26: 222-224 (1991)), en Quandt y Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), en Hamilton *et al.* (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), en Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular.

Pueden utilizarse vectores de plásmidos replicables en Enterobacteriáceas, tales como por ejemplo vectores de clonación derivados de pACYC184 (Bartolomé *et al.*; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann *et al.*; Gene 69: 301-315 (1988)) o derivados de pSC101 (Vocke and Bastia; Proceedings de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 80 (21): 6557-6561 (1983)). Una cepa transformada con un vector de plásmido puede utilizarse en un proceso de acuerdo con la invención, en donde el vector de plásmido lleva el gen *fadR*, o secuencias de nucleótidos que codifican el producto génico de dicho gen *fadR*.

Es también posible introducir mutaciones que afectan a la expresión de los genes particulares en diversas cepas por intercambio de secuencia (Hamilton *et al.*; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), conjugación o transducción.

ES 2 300 888 T3

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, con cepas de la familia Enterobacteriáceas, además de sobreexpresar el gen *fadR*, sobreexpresar una o más enzimas del camino conocido de biosíntesis de la treonina, o enzimas de metabolismo anaplerótico o enzimas para la producción de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducida o enzimas de la glicólisis o enzimas PTS o enzimas del metabolismo del azufre.

Por ejemplo, es posible sobreexpresar simultáneamente, uno o más de los genes seleccionados del grupo

- el operón *thrABC*, que codifica aspartato-quinasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-quinasa y treonina-sintasa (US-A-4.278.765),
- el gen *pyc* de *Corynebacterium glutamicum*, que codifica piruvato-carboxilasa (WO 99/18228),
- el gen *pps*, que codifica fosfoenolpiruvato-sintasa (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),
- el gen *ppc* que codifica fosfoenolpiruvato-carboxilasa (Gene 31: 279-283 (1984)),
- los genes *pntA* y *pntB*, que codifican transhidrogenasa (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- el gen *rhtB*, que imparte resistencia a homoserina (EP-A-0 994 190),
- el gen *mgo*, que codifica malato:quinona-oxidoreductasa (Journal of Bacteriology 182: 6892-6899 (2000)),
- el gen *rhtC*, que imparte resistencia a treonina (EP-A-1013765),
- el gen *thrE* de *Corynebacterium glutamicum*, que codifica la proteína de exportación de treonina (EP-A-1085091),
- el gen *gdhA*, que codifica glutamato-deshidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- el gen *hns*, que codifica la proteína de fijación de DNA HLP-II (Molecular and General Genetics 212: 199-202 (1988)),
- el gen *pgm*, que codifica fosfoglucomutasa (Journal of Bacteriology 176: 5847-5851 (1994)),
- el gen *fba*, que codifica fructosa-bifosfato-aldolasa (Biochemical Journal 257: 529-534 (1989)),
- el gen *ptsH* del operón *ptsHIcrr*, que codifica la proteína fosfohistidina-hexosa-fosfotransferasa del sistema de fosfotransferasa, PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen *ptsI* del operón *ptsHIcrr* que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa, PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen *crr* del operón *ptsHIcrr* que codifica el componente IIA específico de glucosa del sistema de fosfotransferasa, PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen *ptsG*, que codifica el componente IIBC específico de glucosa (Journal of Biological Chemistry 261: 16398-16403 (1986)),
- el gen *lrp*, que codifica el regulador del regulón leucina (Journal of Biological Chemistry 266, 10768-10774 (1991)),
- el gen *mopB*, que codifica la chaperona de 10 kD (Journal of Biological Chemistry 261: 12414-12419 (1986)), que es conocido también por el nombre *groES*,
- el gen *ahpC* del operón *ahpCF* que codifica la subunidad pequeña de la alquil-hidroperóxido-reductasa (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 7617-7621 (1995)),
- el gen *ahpF* del operón *ahpCF* que codifica la subunidad grande de la alquil-hidroperóxido-reductasa (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 7617-7621 (1995)),
- el gen *cysK*, que codifica la cisteína-sintasa A (Journal of Bacteriology, 170: 3150-3157 (1988)),
- el gen *cysB*, que codifica el regulador del regulón *cys* (Journal of Biological Chemistry 262: 5999-6005 (1987)),

ES 2 300 888 T3

- el gen *cysJ* del operón *cysJIH* que codifica la flavoproteína de la NADPH-sulfito-reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- el gen *cysI* del operón *cysJIH* que codifica la hemoproteína de la NADPH-sulfito-reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- el gen *cysH* del operón *cysJIH* que codifica la adenilil-sulfato-reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- el gen *phoB* del operón *phoBR* que codifica el regulador positivo *phoB* del regulón *pho* (Journal de Molecular Biology 190 (1): 37-44 (1986)),
- el gen *phoR* del operón *phoBR* que codifica la proteína sensora del regulón *pho* (Journal of Molecular Biology 192 (3): 549-556 (1986)),
- el gen *phoE*, que codifica la proteína E de la membrana celular exterior (Journal of Molecular Biology 163 (4): 513-532 (1983)),
- el gen *malE*, que codifica la proteína de fijación periplasmática del transporte de maltosa (Journal of Biological Chemistry 259 (16): 10606-10613 (1984)),
- el gen *pykF*, que codifica la piruvato-quinasa I estimulada por fructosa (Journal of Bacteriology 177 (19): 5719-5722 (1995)),
- el gen *pfkB*, que codifica 6-fosfofructoquinasa II (Gene 28(3): 337-342 (1984)),
- el gen *talB*, que codifica transaldolasa B (Journal of Bacteriology 177(20): 5930-5936 (1995)),
- el gen *rseA* del operón *rseABC* que codifica una proteína de membrana con actividad anti-sigma E (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997)),
- el gen *rseC* del operón *rseABC* que codifica un regulador global del factor sigma E (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997)),
- el gen *sodA*, que codifica superóxido-dismutasa (Journal of Bacteriology 155(3): 1078-1087 (1983)),
- el gen *sucA* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato-deshidrogenasa (European Journal of Biochemistry 141(2): 351-359 (1984)),
- el gen *sucB* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-cetoglutarato-deshidrogenasa (European Journal of Biochemistry 141(2): 361-374 (1984)),
- el gen *sucC* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad β de succinil-CoA-sintetasa (Biochemistry 24 (22): 6245-6252 (1985)) y
- el gen *sucD* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad α de la succinil-CoA-sintetasa (Biochemistry 24(22): 6245-6252 (1985)).

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, además de sobreexpresar el gen *fadR*, atenuar, en particular suprimir o reducir la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo

- el gen *tdh*, que codifica treonina-deshidrogenasa (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- el gen *mdh*, que codifica malato-deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- el marco de lectura abierto (orf) *yjfA* (número de acceso AAC77180 del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.)),
- el marco de lectura abierto (orf) *ytfP* (número de acceso AAC77179 del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.)),
- el gen *pckA*, que codifica la enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (Journal of Bacteriology 172: 7151-7156 (1990)),
- el gen *poxB*, que codifica piruvato-oxidasa (Nucleic Acids Research 14(13): 5449-5460 (1986)),

ES 2 300 888 T3

- el gen *aceA*, que codifica la enzima isocitrato-*liasa* (*Journal of Bacteriology* 170: 4528-4536 (1988)),
- el gen *dgsA*, que codifica el regulador *DgsA* del sistema de fosfotransferasa (*Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 59: 256-261 (1995)), que es conocido también por el nombre de gen *mlc*,
- el gen *fruR*, que codifica el represor fructosa (*Molecular and General Genetics* 226: 332-336 (1991)), que es conocido también por el nombre de gen *cra*,
- el gen *rpoS*, que codifica el factor Sigma³⁸ (WO 01/05939), que es conocido también por el nombre de gen *katF*,
- el gen *aspA*, que codifica la aspartato-amonio-*liasa* (aspartasa) (*Nucleic Acids Research* 13(6): 2063-2074 (1985)) y
- el gen *aceB*, que codifica la malato-sintasa A (*Nucleic Acids Research* 16(19): 9342 (1988)).

En este contexto, el término “atenuación” significa reducción o supresión de la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo, enzimas que son codificadas por el DNA correspondiente, por ejemplo por utilización de un promotor débil o un gen o alelo que codifica una enzima correspondiente que tiene una actividad baja o desactiva la enzima (proteína) o gen correspondiente y opcionalmente por combinación de estas medidas.

Las medidas de atenuación reducen la actividad o concentración de la proteína correspondiente en general hasta 0 a 75%, 0 a 50%, 0 a 25%, 0 a 10% o 0 a 5% de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, además de sobreexpresar el gen *fadR*, suprimir las reacciones secundarias no deseadas (Nakayama: “Breeding of Amino Acid Producing Micro-Organisms”, en: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek, (compiladores), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

Los microorganismos producidos de acuerdo con la invención pueden cultivarse utilizando el proceso de lotes, el proceso de alimentación por lotes (“fed batch”) o el proceso de alimentación por lotes repetida. Un sumario de métodos de cultivo conocidos se da en el libro de texto por Chmiel (*Bioprozess-technik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (*Bioreaktoren und periphere Einrichtungen* (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo a utilizar debe satisfacer adecuadamente los requerimientos de las cepas particulares. Medios de cultivo para diversos microorganismos se describen en “Manual of Methods for General Bacteriology” de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981).

Fuentes de carbono que pueden utilizarse incluyen azúcares y carbohidratos, tales como por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidón y opcionalmente celulosa, aceites y grasas, tales como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos, tales como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como por ejemplo glicerol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como por ejemplo ácido acético. Estas sustancias pueden utilizarse individualmente o en forma de mezclas.

Fuentes de nitrógeno que pueden utilizarse comprenden compuestos orgánicos nitrogenados, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz, harina de soja y urea o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno pueden utilizarse individualmente o en forma de mezclas.

Fuentes de fósforo que pueden utilizarse son ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico, o las sales correspondientes que contienen sodio. El medio de cultivo debe contener adicionalmente sales de metales, tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, por ejemplo que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, sustancias esenciales promotoras de crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas pueden utilizarse también además de las sustancias arriba indicadas. Adicionalmente, pueden añadirse precursores adecuados al medio de cultivo. Las sustancias de alimentación indicadas pueden añadirse al cultivo como un solo lote o alimentarse adecuadamente durante el cultivo.

Compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o agua amoniacal, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se utilizan adecuadamente para controlar el pH del cultivo. La formación de espuma puede controlarse utilizando agentes antiespumantes tales como poliglicolésteres de ácidos grasos, por ejemplo. Sustancias de acción selectiva adecuadas, tales como por ejemplo antibióticos, pueden añadirse al medio a fin de mantener la estabilidad del plásmido. Oxígeno o mezclas gaseosas que contiene oxígeno, tales como por ejemplo aire, se introducen en el cultivo a fin de mantener condiciones aerobias. La temperatura del cultivo es normalmente de 25°C a 45°C, y preferiblemente de 30°C a 40°C. El cultivo se continúa hasta que se ha formado la cantidad máxima de L-aminoácidos o L-treonina. Esta finalidad se alcanza normalmente dentro de 10 a 160 horas.

ES 2 300 888 T3

El análisis de L-aminoácidos puede realizarse por cromatografía de intercambio de aniones por derivación con ninhidrina subsiguiente, como se describe en Spackman *et al.* (Analytical Chemistry, 30, 1190-1206 (1958)) o puede analizarse por HPLC en fase inversa, como se describe en Lindroth *et al.* (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

- 5 El propósito del proceso de acuerdo con la invención es la producción fermentativa de L-aminoácidos, seleccionados del grupo L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina, en particular L-treonina.

La presente invención se ilustra con mayor detalle en los ejemplos prácticos que siguen.

- 10 El medio mínimo (M9) y medio completo (LB) utilizados para *Escherichia coli* se describen por J.H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento del DNA plasmídico a partir de *Escherichia coli* y todas las técnicas de tratamiento de restricción, ligación, Klenow y fosfatasa alcalina se llevaron a cabo de acuerdo con Sambrook *et al.* (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). A no ser que se indique otra cosa, la transformación de *Escherichia coli* se realizó de acuerdo con Chung *et al.* (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175 (1989)).

La temperatura de incubación durante la producción de cepas y transformantes es 37°C.

20 Ejemplo 1

Producción de L-treonina utilizando el gen fadR

1a) Construcción del plásmido de expresión pTrc99AfadR

- 25 El gen fadR de *E. coli* K12 se amplifica utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y oligonucleótidos sintéticos. Se sintetizan los iniciadores PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) sobre la base de la secuencia de nucleótidos del gen fadR en *E. coli* K12 MG1655 (No. de Acceso AE000217, Blattner *et al.* (Science 277: 1453-1462 (1997))). Las secuencias iniciadoras se modifican de tal manera que se obtienen sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción. Para el iniciador fadR3 se selecciona, la secuencia de reconocimiento por XbaI, mientras que para el iniciador fadR4 se selecciona la secuencia de reconocimiento por HindIII, viniendo indicadas estas secuencias por las porciones subrayadas de las secuencias de nucleótidos que se muestran a continuación:

35 fadR3: 5' - GTCCAACTTTGTCTAGATGAGTTATGG - 3' (SEQ ID no. 1)

fadR4: 5' - GAGGGGTTTGAAGCTTAAACGGAAGGG - 3' (SEQ ID no. 2)

- 40 El DNA cromosómico de *E. coli* K12 MG1655 utilizado para la PCR se aísla utilizando "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Puede amplificarse un fragmento de DNA de aprox. 800 pb con los iniciadores específicos en condiciones PCR estándar (Innis *et al.* (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) utilizando DNA-polimerasa Pfu (Promega Corporation, Madison, EE.UU.). El producto PCR se liga de acuerdo con las instrucciones del fabricante con el vector pCR-Blunt II-TOPO (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se transforma en la cepa TOP10 de *E. coli*. Las células que llevan el plásmido se seleccionan en agar LB que se ha combinado con 50 µg/ml de kanamicina. Después de aislamiento del DNA plasmídico, el vector pCR-Blunt II-TOPO-fadR se escinde con las enzimas de restricción HindIII y XbaI y, después de la separación, se aísla el fragmento fadR en gel de agarosa al 0,8% utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se escinde con las enzimas HindIII y XbaI y se liga con el fragmento fadR aislado. La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagen, La Jolla, EE.UU.) se transforma con el lote de ligación y las células que llevan el plásmido se seleccionan en agar LB, que se ha combinado con 50 µg/ml de ampicilina. El éxito de la clonación puede comprobarse después de aislamiento del DNA plasmídico por realización de una escisión de ensayo con las enzimas AccI, HincII y SspI. El plásmido se designa pTrc99AfadR (Figura 1).

55 1b) Producción de L-treonina con la cepa MG442/pTrc-99AfadR

La cepa de *E. coli* MG442 productora de L-treonina se describe en la Patente US-A-4.278.765 y ha sido depositada como CMIM B-1628 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia).

- 60 La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99AfadR descrito en el Ejemplo 1a y el vector pTrc99A y las células que llevan el plásmido se seleccionan en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. De esta manera, se obtienen las cepas MG442/pTrc99AfadR y MG442/pTrc99A. Las colonias individuales seleccionadas se multiplican luego adicionalmente en medio mínimo de la composición siguiente: 3,5 g/l Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 g/l KH₂PO₄, 1 g/l NH₄Cl, 0,1 g/l MgSO₄*7H₂O, 2 g/l glucosa, 20 g/l agar, 50 mg/l ampicilina. La formación de L-treonina se comprueba en cultivos de lotes de 10 ml en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Dicho cultivo se inocula con 10 ml de medio de precultivo de la composición siguiente: 2 g/l extracto de levadura, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 1 g/l KH₂PO₄, 0,5 g/l MgSO₄*7H₂O, 15 g/l CaCO₃, 20 g/l glucosa, 50 mg/l ampicilina y se incuba durante 16 horas a 37°C y 180 rpm en una incubadora ESR de Kühner AG (Birsfelden, Suiza).

ES 2 300 888 T3

Porciones de 250 μ l de este precultivo se transfieren en 10 ml de medio de producción (25 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,03 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,018 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 g/l CaCO_3 , 20 g/l glucosa, 50 mg/l ampicilina) y se incuban durante 48 horas a 37°C. La formación de L-treonina por la cepa de partida MG442 se comprueba de la misma manera, pero sin la adición de ampicilina al medio. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo a una longitud de onda de medida de 660 nm utilizando un fotómetro LP2W de la compañía Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania).

La concentración de L-treonina formada se determina luego en el sobrenadante de cultivo filtrado en condiciones estériles utilizando un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) por cromatografía de intercambio iónico y reacción post-columna con detección con ninhidrina.

La Tabla 1 muestra los resultados del ensayo.

TABLA 1

Cepa	DO (660 nm)	L-treonina, g/l
MG442	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	3,8	1,3
MG442/pTrc99AfadR	4,0	1,6

Breve descripción de las figuras

Figura 1: mapa del plásmido pTrc99AfadR que contiene el gen fadR

Las longitudes indicadas deben considerarse como aproximadas. Las abreviaturas y términos utilizados tienen el significado siguiente:

- Amp: gen de resistencia a ampicilina
- lacI: gen para la proteína represora del promotor trc
- P_{trc}: región del promotor trc, inducible por IPTG
- fadR: región codificante del gen fadR
- 5S: región de rRNA 5S
- rrnBT: región terminadora de rRNA

Las abreviaturas para las enzimas de restricción tienen el significado siguiente:

- AccI: endonucleasa de restricción de *Acinetobacter calcoaceticus*
- HincII: endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae* R_c
- HindIII: endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae*
- SspI: endonucleasa de restricción de *Sphaerotilus*, especie ATCC 13925
- XbaI: endonucleasa de restricción de *Xanthomonas campestris*.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de L-aminoácidos seleccionados del grupo L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina, en el cual se llevan a cabo los pasos siguientes:

- a) fermentación de microorganismos modificados de la familia Enterobacteriáceas que producen el L-aminoácido deseado, en donde la sobreexpresión del gen *fadR* de *Escherichia coli* o de secuencias de nucleótidos que codifican el producto del gen *fadR* conduce a un aumento de al menos 10% de la actividad o concentración de dicha proteína *fadR*, con relación a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida,
- b) acumulación del L-aminoácido deseado en el medio o en las células de los microorganismos y
- c) aislamiento del L-aminoácido deseado, en donde los constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o fracciones de la misma (>0 hasta 100%) quedan opcionalmente en el producto.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los L-aminoácidos deseados se producen por fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriáceas en los cuales se incrementa además al mismo tiempo la actividad o concentración de una o más de las proteínas codificadas por los genes seleccionados del grupo constituido por:

- 2.1 el operón *thrABC* que codifica aspartato-quinasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-quinasa y treonina-sintasa,
- 2.2 el *pyc* gen que codifica piruvato-carboxilasa,
- 2.3 el gen *pps* que codifica fosfoenolpiruvato-sintasa,
- 2.4 el gen *ppc* que codifica fosfoenolpiruvato-carboxilasa,
- 2.5 los genes *pntA* y *pntB* que codifican transhidrogenasa,
- 2.6 el gen *rhtB* que imparte resistencia a homoserina,
- 2.7 el gen *mqr* que codifica malato:quinona-oxidoreductasa,
- 2.8 el gen *rhtC* que imparte resistencia a treonina,
- 2.9 el gen *thrE* que codifica la proteína de exportación de treonina,
- 2.10 el gen *gdhA* que codifica glutamato-deshidrogenasa,
- 2.11 el gen *hns* que codifica la proteína de fijación de DNA HLP-II,
- 2.12 el *pgm* gen que codifica fosfoglucoisomerasa,
- 2.13 el gen *fba* que codifica fructosa-bisfosfato aldolasa,
- 2.14 el gen *ptsH* que codifica la proteína fosfohistidina hexosa-fosfotransferasa,
- 2.15 el gen *ptsI* que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa,
- 2.16 el gen *crr* que codifica el componente específico de glucosa IIA,
- 2.17 el gen *ptsG* que codifica componente el específico de glucosa IIBC,
- 2.18 el gen *lrp* que codifica el regulador del regulón leucina,
- 2.19 el gen *mopB* que codifica la chaperona de 10 kD,
- 2.20 el gen *ahpC* que codifica la subunidad pequeña de alquil-hidroperóxido-reductasa,
- 2.21 el gen *ahpF* que codifica la subunidad grande de alquil-hidroperóxido-reductasa,
- 2.22 el gen *cysK* que codifica cisteína-sintasa A,
- 2.23 el gen *cysB* que codifica el regulador del regulón *cys*,

ES 2 300 888 T3

- 2.24 el gen *cysJ* que codifica la flavoproteína de NADPH-sulfito-reductasa,
2.25 el gen *cysI* que codifica la hemoproteína de NADPH-sulfito-reductasa,
5 2.26 el gen *cysH* que codifica adenilil-sulfato-reductasa,
2.27 el gen *phoB* que codifica el regulador positivo PhoB del regulón *pho*,
2.28 el gen *phoR* que codifica la proteína sensora del regulón *pho*,
10 2.29 el gen *phoE* que codifica la proteína E de la membrana celular externa,
2.30 el gen *malE* que codifica la proteína de fijación periplasmática de transporte de maltosa,
15 2.31 el gen *pykF* que codifica piruvato-quinasa I,
2.32 el gen *pfkB* que codifica la 6-fosfofructo-quinasa II estimulada por fructosa,
2.33 el gen *talB* que codifica transaldolasa B,
20 2.34 el gen *rseA* que codifica una proteína de membrana que actúa como un regulador negativo de la actividad σ factor E,
2.35 el gen *rseC* que codifica un regulador global del factor σ factor E,
25 2.36 el gen *sodA* que codifica superóxido-dismutasa,
2.37 el gen *sucA* que codifica la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato-deshidrogenasa,
30 2.38 el gen *sucB* que codifica la subunidad dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-cetoglutarato-deshidrogenasa,
2.39 el gen *sucC* que codifica la subunidad β de succinil-CoA-sintetasa, y
2.40 el gen *sucD* que codifica la subunidad α de succinil-CoA-sintetasa

35 al menos en un 10%, con relación a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida, por sobreexpresión de uno o más de dichos genes.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el cual se producen L-aminoácidos por fermentación
40 de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae en las cuales se reduce además al mismo tiempo la actividad o concentración de una o más de las proteínas codificadas por los genes seleccionados del grupo constituido por:

- 3.1 el gen *tdh* que codifica treonina-deshidrogenasa,
45 3.2 el gen *mdh* que codifica malato-deshidrogenasa,
3.3 el marco de lectura abierto (orf) *yjfA*,
3.4 el marco de lectura abierto (orf) *ytfP*,
50 3.5 el gen *pckA* que codifica fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa,
3.6 el gen *poxB* que codifica piruvato-oxidasa,
55 3.7 el gen *aceA* que codifica isocitrato-liasa,
3.8 el gen *dgsA* que codifica el regulador DgsA del sistema de fosfotransferasa,
3.9 el gen *fruR* que codifica el represor fructosa,
60 3.10 el gen *rpoS* que codifica el factor σ factor³⁸,
3.11 el gen *aspA* que codifica aspartato-amonio-liasa (aspartasa) y
65 3.12 el gen *aceB* que codifica malato-sintasa A

hasta 0% a 75%, de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida por atenuación de uno o más de dichos genes.

ES 2 300 888 T3

4. Microorganismos modificados de la familia Enterobacteriáceas de acuerdo con la reivindicación 1, en los cuales se incrementa al mismo tiempo la actividad o concentración de una o más proteínas codificadas por un gen o genes adicionales al menos en un 10%, con relación a la actividad o concentración de las proteínas en el microorganismo de partida en condiciones de fermentación similares, por sobreexpresión de los genes, en donde dichos genes adicionales se seleccionan del grupo, constituido por:

4.1 el operón thrABC que codifica aspartato-quinasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-quinasa y treonina-sintasa,

4.2 el gen pyc que codifica piruvato-carboxilasa,

4.3 el gen pps que codifica fosfoenolpiruvato-sintasa,

4.4 el gen ppc que codifica fosfoenolpiruvato-carboxilasa,

4.5 los genes pntA y pntB que codifican transhidrogenasa,

4.6 el gen rhtB que imparte resistencia a homoserina,

4.7 el gen mqo que codifica malato:quinona-oxidoreductasa,

4.8 el gen rhtC que imparte resistencia a treonina,

4.9 el gen thrE que codifica la proteína de exportación de treonina,

4.10 el gen gdhA que codifica glutamato-deshidrogenasa,

4.11 el gen hns que codifica la proteína de fijación de DNA HLP-II,

4.12 el gen pgm que codifica fosfoglucoisomerasa,

4.13 el gen fba que codifica fructosa-bisfosfato aldolasa,

4.14 el gen ptsH que codifica la proteína fosfohistidina hexosa-fosfotransferasa,

4.15 el gen ptsI que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa,

4.16 el gen crr que codifica el componente específico de glucosa IIA,

4.17 el gen ptsG que codifica el componente específico de glucosa IIBC,

4.18 el gen lrp que codifica el regulador del regulón leucina,

4.19 el gen mopB que codifica la chaperona de 10 kD,

4.20 el gen ahpC que codifica la subunidad pequeña de alquil-hidroperóxido-reductasa,

4.21 el gen ahpF que codifica la subunidad grande de alquil-hidroperóxido-reductasa,

4.22 el gen cysK que codifica cisteína-sintasa A,

4.23 el gen cysB que codifica el regulador del regulón cys,

4.24 el gen cysJ que codifica la flavoproteína de NADPH-sulfito-reductasa,

4.25 el gen cysI que codifica la hemoproteína de NADPH-sulfito-reductasa,

4.26 el gen cysH que codifica adenilil-sulfato-reductasa,

4.27 el gen phoB que codifica el regulador positivo PhoB del regulón pho,

4.28 el gen phoR que codifica la proteína sensora del regulón pho,

4.29 el gen phoE que codifica la proteína E de la membrana celular externa,

4.30 el gen malE que codifica la proteína de fijación periplasmática de transporte de maltosa,

4.31 el gen pykF que codifica estimulada por fructosa piruvato-quinasa I,

ES 2 300 888 T3

4.32 el gen *pfkB* que codifica 6-fosfofructoquinasa II,

4.33 el gen *talB* que codifica transaldolasa B,

5 4.34 el gen *rseA* que codifica una proteína de membrana que actúa como un regulador negativo de la actividad σ^{70} ,

4.35 el gen *rseC* que codifica un regulador global del factor σ^{70} ,

10 4.36 el gen *sodA* que codifica superóxido-dismutasa,

4.37 el gen *sucA* que codifica la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato-deshidrogenasa,

15 4.38 el gen *sucB* que codifica la subunidad dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-cetoglutarato-deshidro-genasa,

4.39 el gen *sucC* que codifica la subunidad β de succinil-CoA-sintetasa, y

4.40 el gen *sucD* que codifica la subunidad α de succinil-CoA-sintetasa.

20 5. Microorganismos modificados de la familia Enterobacteriáceas de acuerdo con la reivindicación 1, en los cuales al mismo tiempo la actividad o concentración de una o más proteínas codificadas por un gen o genes adicionales se reduce a 0 hasta 75%, con relación a la actividad o concentración de dicha o dichas proteínas en el microorganismo de partida en condiciones de fermentación similares, por atenuación de uno o más del gen o genes adicionales, en donde dichos genes adicionales se seleccionan del grupo, constituido por:

25 5.1 el gen *tdh* que codifica treonina-deshidrogenasa,

5.2 el gen *mdh* que codifica malato-deshidrogenasa,

30 5.3 el marco de lectura abierto (orf) *yjgA*,

5.4 el marco de lectura abierto (orf) *ytfP*,

35 5.5 el gen *pckA* que codifica fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa,

5.6 el gen *poxB* que codifica piruvato-oxidasa,

5.7 el gen *aceA* que codifica isocitrato-liasa,

40 5.8 el gen *dgsA* que codifica el regulador DgsA del sistema de fosfotransferasa,

5.9 el gen *fruR* que codifica el represor fructosa,

45 5.10 el gen *rpoS* que codifica el factor σ^{32} .

6. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en donde los microorganismos se originan del género *Escherichia*.

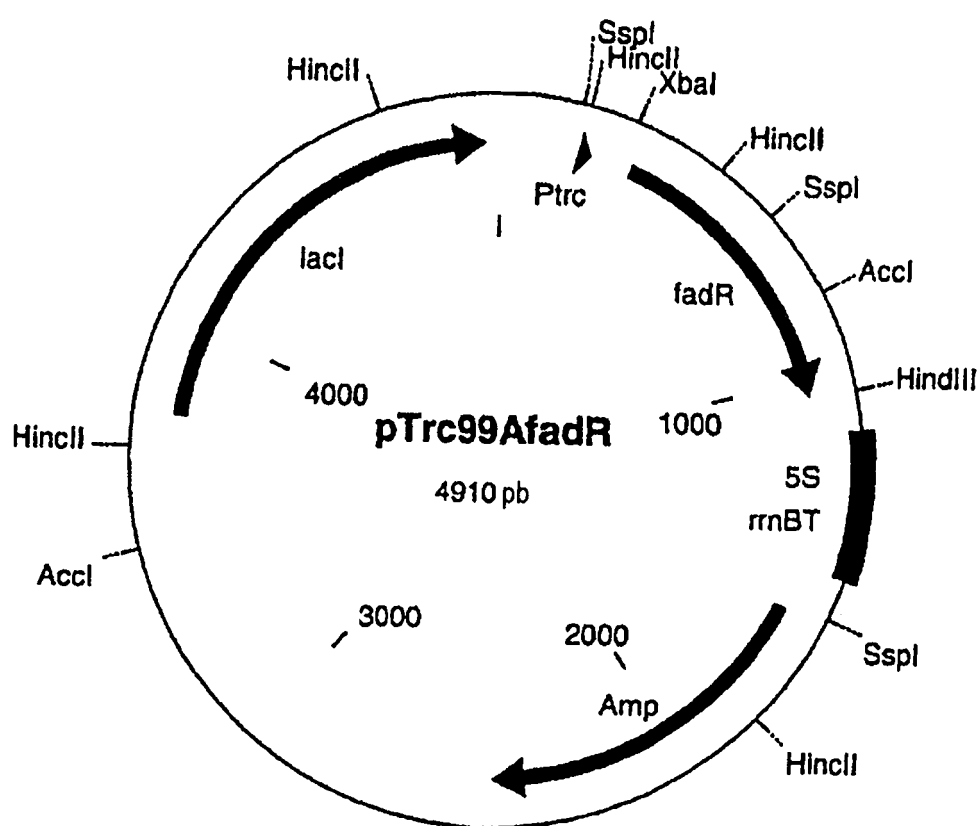
50 7. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en donde los microorganismos se originan de la especie *E. coli*.

55

60

65

Figura 1 :



ES 2 300 888 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Degussa AG

5 <120> Proceso para la producción de L-aminoácidos que utiliza cepas de la familia Enterobacteriáceas que contienen un gen fadR o iclR intensificado

<130> 010455 BT

10

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.1

15

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

20

<213> Secuencia sintética

<220>

<221> Iniciador

25

<222> (1)..(27)

<223> fadR3

<400> 1

30

gtccaacttt gtctagatga gttatgg

27

<210> 2

35

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia sintética

40

<220>

<221> Iniciador

<222> (1)..(27)

45

<223> fadR4

<400> 2

50

gagggggttg aagcttaaac ggaaggg

27

55

60

65