



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 944**

51 Int. Cl.:
C12N 15/31 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02745388 .5**
96 Fecha de presentación : **14.06.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1404838**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.04.2004**

54 Título: **Proceso para la preparación de L-aminoácidos usando cepas de la familia Enterobacteriaceae con sobreexpresión fba.**

30 Prioridad: **06.07.2001 DE 101 32 946**
10.07.2001 US 303790 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.08.2010

73 Titular/es: **Evonik Degussa GmbH**
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es: **Rieping, Mechthild**

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

ES 2 343 944 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

Proceso para la preparación de L-aminoácidos usando cepas de la familia Enterobacteriaceae con sobreexpresión fba.

Campo de la invención

Esta invención se relaciona con un proceso para la preparación de L-aminoácidos, en particular L-treonina, usando cepas de la familia Enterobacteriaceae en la que al menos el gen fba está sobreexpresado.

Arte anterior

Los L-aminoácidos, en particular L-treonina, son usados en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria de la alimentación y muy particularmente en la nutrición animal.

Es conocido preparar L-aminoácidos por fermentación de las cepas de Enterobacteriaceae, en particular *Escherichia coli* (*E. Coli*) y *Serratia marcescens*. Debido a su gran importancia, se experimenta constantemente para mejorar los procesos de preparación. El mejoramiento del proceso puede relacionarse con medidas de fermentación, tales como por ejemplo agitación y suministro de oxígeno, o la composición del medio nutriente, tales como por ejemplo la concentración de azúcar durante la fermentación, o la preparación de la forma de producto, por ejemplo cromatografía de intercambio iónico, o propiedades de rendimiento intrínseco del propio microorganismo.

Los métodos de mutagénesis, selección y selección de mutante son usados para mejorar las propiedades de rendimiento de éstos microorganismos. Las cepas que son resistentes a los antimetabolitos, son obtenidas de esta manera tales como por ejemplo el análogo de treonina ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV), o son autotróficos para los metabolitos de importancia regulatoria y produce L-aminoácido, tal como por ejemplo L-treonina.

Los métodos de la técnica de ADN recombinante han sido también empleados durante algunos años para mejorar la cepa de las cepas de la familia de Enterobacteriaceae que produce L-aminoácidos, amplificando genes individuales de la biosíntesis de aminoácidos e investigando el efecto en la producción.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es proporcionar nuevas medidas para la preparación fermentativa mejorada de L-aminoácidos, en particular de L-treonina.

Descripción de la invención

La invención proporciona un proceso para la preparación de L-aminoácidos, en particular de L-treonina, usando microorganismos de la familia Enterobacteriaceae que en particular ya producen L-aminoácidos y en que la secuencia nucleotídica que codifica para el gen fba está incrementado.

Donde los L-aminoácidos o aminoácidos son mencionados en lo que sigue, esto significa uno o más aminoácidos, que incluyen sus sales, seleccionados del grupo que consiste en L-treonina, L-valina, y L-lisina. L-treonina es particularmente preferido.

El término "incremento" en este contexto describe el aumento en la actividad intracelular de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo que están codificadas por el correspondiente ADN, por ejemplo aumentando el número de copias de el gen o genes, usando un potente promotor o un gen o alelo que codifica para una correspondiente enzima o proteína con una alta actividad, y opcionalmente combinando estas medidas.

Mediante las medidas de incremento, en particular la sobre-expresión, la actividad o concentración de la correspondiente proteína es en general aumentada en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% ó 500%, hasta un máximo de 1000% ó 2000%, basado en la proteína del tipo-salvaje o la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

El proceso para la preparación de L-aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en L-treonina, L-lisina y L-valina se caracteriza porque los pasos siguientes son llevados a cabo:

- a) fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae que producen el L-aminoácido deseado y en el cual el gen fba de *Escherichia coli* está sobreexpresado, donde la sobreexpresión se logra aumentando el número de copias del gen o colocando dicho gen bajo un promotor fuerte.
- b) la concentración del correspondiente L-aminoácido en el medio o en las células de los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, y
- c) aislamiento del L-aminoácido deseado, constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o porciones (> 0 a 100%) de los mismos que permanecen opcionalmente en el producto.

ES 2 343 944 T3

Los microorganismos que proporciona la presente invención pueden producir los L-aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, opcionalmente almidón, opcionalmente celulosa o de glicerol y etanol. Estos son representativos de la familia de Enterobacteriaceae seleccionados a partir del género de *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*. Los géneros *Escherichia*, y *Serratia* son preferidos. Del género *Escherichia* las especies *Escherichia coli* y del género *Serratia* las especies *Serratia marcescens* serán mencionadas en particular.

Las cepas apropiadas, que producen L-treonina en particular, del género *Escherichia*, en particular de las especies *Escherichia coli*, son, por ejemplo

10 ***Escherichia coli* TF427**
***Escherichia coli* H4578**
15 ***Escherichia coli* KY10935**
***Escherichia coli* VNIIGenetika MG442**
***Escherichia coli* VNIIGenetika M1**
20 ***Escherichia coli* VNIIGenetika 472T23**
***Escherichia coli* BKIIDM B-3996**
25 ***Escherichia coli* kat 13**
***Escherichia coli* KCCM-10132.**

30 Las cepas apropiadas que producen L-treonina del género *Serratia*, en particular de las especies *Serratia marcescens*, son, por ejemplo

35 ***Serratia marcescens* HNr21**
***Serratia marcescens* TLR156**
***Serratia marcescens* T2000.**

40 Las cepas de la familia Enterobacteriaceae que producen L-treonina tienen preferentemente, entre otras, una o más características genéticas o fenotípicas seleccionadas a partir del grupo que consiste en: resistencia al ácido α -amino- β -hidroxivalérico, resistencia a la tialisina, resistencia a etionina, resistencia a α -metilserina, resistencia al ácido diaminosuccínico, resistencia al ácido α -aminobutírico, resistencia a la borrelidina, resistencia al rifampicina, resistencia a los análogos de valina, tales como, por ejemplo, el hidroxamato de valina, resistencia a los análogos de purina, tales como, por ejemplo, 6-dimetilaminopurina, una necesidad para L-metionina, opcionalmente una necesidad parcial y compensable para L-isoleucina, una necesidad para el ácido meso-diaminopimélico, autotropía con respecto a los dipéptidos que contienen treonina, resistencia a L-treonina, resistencia a L-homoserina, resistencia a L-lisina, resistencia a L-metionina, resistencia al ácido de 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 al fluoropiruvato, treonina dehidrogenasa defectivo, opcionalmente una habilidad para la utilización de sacarosa, incremento del operón treonina, incremento de la homoserina dehidrogenasa I-aspartato quinasa I, preferiblemente la forma resistente a la retroalimentación, incremento de la homoserina quinasa, incremento de la treonina sintasa, incremento de la aspartato quinasa, opcionalmente de la forma resistente a la retroalimentación, incremento de aspartato semialdehído dehidrogenasa, incremento del fosfoenol piruvato carboxilasa, opcionalmente de la forma resistente a la retroalimentación, incremento de la fosfoenolpiruvato sintasa, incremento de la transhidrogenasa, incremento del producto del gen RhtB, incremento del producto del gen RhtC, incremento del producto del gen YfiK, incremento de la piruvato carboxilasa y atenuación de la formación de ácido acético.

60 Se ha encontrado que los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae producen L-aminoácidos, en particular L-treonina, de una manera mejorada después de la sobreexpresión, del gen *fba*.

El uso de genes endógenos es en general preferido. "Genes endógenos" o "secuencias nucleotídicas endógenas" son entendidas como los genes o secuencias nucleotídicas presentes en la población de una especie.

65 Las secuencias nucleotídicas de los genes de *Escherichia coli* pertenecen al arte anterior y también pueden encontrarse en la secuencia genómica de *Escherichia coli* publicada por Blattner y otros (Science 277: 1453-1462 (1997)).

ES 2 343 944 T3

La información siguiente sobre el gen de fba es conocida, entre otros, a partir del arte anterior:

Descripción: Fructosa bisfosfato aldolasa (clase II)

5 EC No.: 4.1.2.13

Referencia: Alefounder y otros; *Biochemical Journal* 257(2): 529-34 (1989) Zgiby y otros; *European Journal of Biochemistry* 267(6): 1858-1868 (2000) Baldwin y otros; *Biochemical Journal* 169(3): 633-641 (1978)

10 No de acceso: AE000376

Nombres de genes alternativos: fda, ald.

15 Las secuencias de ácidos nucleicos pueden encontrarse en los bancos de datos del Centro Nacional para la Información de la Biotecnología (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina (Bethesda, MD, E.U.), las bases de datos de secuencias nucleotídicas de los Laboratorios de Biología Molecular Europeo (EMBL, Heidelberg, Alemania o Cambridge, Reino Unido) o las bases de datos de ADN de Japón (DDBJ, Mishima, Japón).

20 Alelos del gen fba que resulta de la degeneración del código genético o debido a las “mutaciones con sentido” de la función neutral además pueden ser usados.

25 Para lograr un incremento, pueden ser aumentadas, por ejemplo, la expresión de los genes o las propiedades catalíticas de las proteínas. Las dos medidas pueden ser opcionalmente combinadas.

30 Para lograr una sobreexpresión, el número de copias de los genes correspondientes pueden aumentarse, o el promotor y la región de la regulación o el sitio de unión del ribosoma aguas arriba del gen estructural puede mutarse. Los casetes de expresión que son incorporados aguas arriba del gen estructural actúan de la misma manera. Mediante promotores inducibles, es posible adicionalmente incrementar la expresión en el curso de la producción fermentativa de L-treonina. La expresión se mejora igualmente mediante medidas para prolongar la vida del ARN-m. Además, la actividad enzimática es también incrementada previniendo la degradación de la proteína enzimática. Los genes o construcciones de genes pueden estar presentes en los plásmidos con un número diverso de copias, o puede integrarse y amplificarse en el cromosoma.

35 Alternativamente, una sobreexpresión de los genes en cuestión además puede lograrse cambiando la composición de los medios y el procedimiento de cultivo.

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

50 Los vectores plasmídicos que son capaces de la replicación en Enterobacteriaceae, tales como por ejemplo los vectores de clonaje derivados del pACYC184 (Bartolomé y otros; *Gene* 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann y otros; *Gene* 69: 301-315 (1988)) o derivados de pSC101 (Vocke y Bastia, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80(21): 6557-6561 (1983)) pueden ser usados. Una cepa transformada con un vector plasmídico, donde el vector plasmídico porta al menos una secuencia nucleotídica que codifica para el gen fba, puede emplearse en un proceso de acuerdo con la invención.

55 También es posible transferir mutaciones que afectan la expresión del gen particular en varias cepas por intercambio de secuencia (Hamilton y otros (*Journal of Bacteriology* 171: 4617-4622 (1989)), conjugación o transducción.

60 Esto puede ser además ventajoso para la producción de L-treonina, con cepas de la familia Enterobacteriaceae para incrementar una o más enzimas de la ruta conocida de la biosíntesis de la treonina o enzimas del metabolismo anapleótico o enzimas para la producción de fosfato dinucleótido adenina nicotinamida reducido, además del incremento del gen fba.

De esta manera, por ejemplo, uno o más de los genes seleccionados a partir del grupo que consiste en

- 65 • el operón thrABC que codifica para la aspartato quinasa, homoserina dehidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa (US-A-4,278,765),
- el gen pyc que codifica para la piruvato carboxilasa (DE-A-19 831 609),

ES 2 343 944 T3

- el gen pps que codifica para la fosfoenol piruvato sintasa (Molecular and General Genetics 231 (2): 332-336 (1992),
 - el gen ppc que codifica para fosfoenol piruvato carboxilasa (Gene 31: 279-283 (1984)),
 - los genes pntA y pntB que codifican para la transhidrogenasa (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
 - el gen rhtB que imparte resistencia a la homoserina (EP-A-0 994 190),
 - el gen mpo que codifica para la malato:quinona oxidoreductasa (WO 02/06459),
 - el gen rhtC que imparte resistencia a la treonina(EP-A-1 013 765),
 - el gen thrE de *Corynebacterium glutamicum* que codifica para la proteína exportadora de treonina (WO 01/92545),
 - el gen gdhA que codifica para la glutamato dehidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
 - el gen dps que codifica para el regulador global Dps (Genes & Development 6 (12B):2646-2654 (1992); No de Acceso AE000183),
 - el gen ptsG que codifica para el componente IIBC glucosa-específico del sistema PTS de la fosfotransferasa (Journal of Biological Chemistry 269 (35): 16398-16403 (1986), No de Acceso AE000210),
 - el gen lrp que codifica para el regulador del regulón Lrp leucina y sistemas de transporte de alta-afinidad de aminoácidos de cadena-ramificada (Journal of Biological Chemistry 266 (17): 10768-10774 (1991). No de Acceso AE000191),
 - el gen ptsH de el operón ptsHIcrr que codifica para la proteína fosfohistidina hexosa fosfotransferasa del sistema PTS de la fosfotransferasa (Journal of Biological Chemistry 262 (33): 16241-16253 (1987). No de Acceso AE000329),
 - el gen ptsI del operón ptsHIcrr que codifica para la enzima I del sistema PTS de la fosfotransferasa (Journal of Biological Chemistry 262 (33): 16241-16253 (1987). No de Acceso AE000329),
 - el gen crr del operón ptsHIcrr que codifica para el componente IIA glucosa-específico del sistema PTS de la fosfotransferasa (Journal of Biological Chemistry 262 (33):16241-16253 (1987), No de Acceso. AE000329),
 - el gen mopB que codifica para la chaperona GroES (Journal of Biological Chemistry 261 (26):12414-12419 (1986), No de Acceso. AE000487),
 - el gen ahpC del operón ahpCF que codifica para la subunidad menor de la alquil hidroperóxido reductasa (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92 (17): 7617-7621 (1995),No de Acceso AE000166),
 - el gen ahpF del operón ahpCF que codifica para la subunidad mayor de la alquil hidroperóxido reductasa (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92 (17): 7617-7621 (1995),No de Acceso AE000166),
- 50 pueden ser sobre-expresados, donde la sobreexpresión es lograda aumentando el número de copias del gen o colocando dicho gen bajo un promotor fuerte.

El uso de genes endógenos es en general preferido.

Además puede ser ventajoso para la producción de L-treonina, además del incremento del gen fba, para uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en

- el gen tdh que codifica para la treonina dehidrogenasa (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- el gen mdh que codifica para malato dehidrogenasa (E.C. 1.1.1.37 (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- el producto del gen yjfA del marco de lectura abierto (orf) (Número de Acceso AAC77180 del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD, E.U.)),
- el producto del gen ytfP del marco de lectura abierto (orf) (Número de Acceso AAC77179 del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD, E.U.)),

ES 2 343 944 T3

- el gen *pckA* que codifica para la enzima fosfoenol piruvato carboxiquinasa (Journal of Bacteriology 172;7151-7156 (1990)),
- el gen *poxB* que codifica para la piruvato oxidasa (Nucleic Acids Research 14 (13): 5449-5460 (1986)),
- el gen *aceA* que codifica para la enzima isocitrato liasa (Journal of Bacteriology 170: 4528-4536 (1988)),
- el gen *dgsA* que codifica para el regulador DgsA del sistema de la fosfotransferasa (Bioscience; Biotechnology and Biochemistry 59: 256-251 (1995)) y es también conocido bajo el nombre del gen *mlc*,
- el gen *fruR* que codifica para el represor de la fructosa (Molecular and General Genetics 226: 332-336 (1991)) y es también conocido bajo el nombre del gene *cra*, y
- el gen *rpoS* que codifica para el factor sigma³⁸ (WO 01/05939) y es también conocido bajo el de nombre del gen *katF*

para ser eliminada o para que la expresión de los mismos sea reducida.

El término “atenuación” en este contexto describe la reducción o la eliminación de la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo que son codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo usando un promotor débil o un gen o alelo que codifica para una enzima correspondiente con una baja actividad o desactiva la enzima correspondiente (proteína) o el gen, y opcionalmente combinando estas medidas.

Mediante las medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente es, en general reducida de 0 a 75%, 0 a 50%, 0 a 25%, 0 a 10% o 0 a 5% de la actividad o concentración de la proteína tipo salvaje o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

Esto puede ser además ventajoso para la producción de L-aminoácidos, en particular, L-treonina, además para el incremento del gen *fba*, para eliminar las reacciones colaterales indeseables (Nakayama: “Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms”, en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.). Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

Los microorganismos producidos de acuerdo con la invención pueden cultivarse en el proceso por lotes (cultivo por lotes), alimentación por lotes (proceso de alimentación) o proceso reiterado de alimentación por lotes (proceso reiterado de alimentación). Un resumen de métodos de cultivo conocidos es descrito en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Tecnología de Bioprocadores 1. Introducción a la Tecnología de Bioprocadores (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Biozeaktoren und periphere Einrichtungen [Bioreactores y Equipamiento Periférico] (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo a ser usado debe reunir los requerimientos de las cepas particulares en una manera apropiada. Las descripciones del medio de cultivo para varios microorganismos están contenidas en el libro de texto “Manual of Methods for General Bacteriology” de la Sociedad Americana de Bacteriología (Washington D.C., E.U., 1981).

Los azúcares y carbohidratos, tales como por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y opcionalmente celulosa, aceites y grasas, tales como por ejemplo aceite de soya, aceite de girasol, aceite de maní y grasa 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, pueden usarse como fuente de carbón. Estas sustancias pueden usarse individualmente o como una mezcla.

Los compuestos que contienen nitrógeno orgánico, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz macerado, harina del frijol 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, pueden usarse como fuente de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse individualmente o como una mezcla.

El ácido fosfórico, fosfato de dihidrógeno potasio o fosfato hidrógeno de dipotasio o las sales correspondientes que contienen sodio pueden usarse como fuente de fósforo. El medio de cultivo además debe comprender sales de metales, tales como por ejemplo el sulfato de magnesio o el sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, sustancias esenciales para el crecimiento, tales como los aminoácidos y las vitaminas, pueden emplearse además de las sustancias anteriormente citadas. Precursores apropiados además pueden adicionarse al medio de cultivo. Las sustancias de partida mencionadas pueden adicionarse al cultivo en forma de un solo lote, o pueden introducirse durante el cultivo de una manera apropiada.

Los compuestos básicos, tales como el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, el amoníaco o el amoníaco acuoso, o los compuestos ácidos, tales como el ácido fosfórico o el ácido sulfúrico, pueden emplearse de una manera apropiada para controlar el pH del cultivo. Los antiespumantes, tales como por ejemplo ésteres de ácidos grasos de poliglicol, pueden emplearse para controlar el desarrollo de la espuma. Las sustancias apropiadas que tienen una

ES 2 343 944 T3

acción selectiva, por ejemplo antibióticos, pueden adicionarse al medio para mantener la estabilidad de los plásmidos. Para mantener las condiciones aeróbicas, oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire, son introducidas dentro del cultivo. La temperatura del cultivo es usualmente de 25°C a 45°C, y preferiblemente de 30°C a 40°C. El cultivo es continuado hasta que el máximo de L-aminoácidos o L-treonina se ha formado. Este objetivo usualmente es alcanzado dentro de 10 horas a 160 horas.

El análisis de los L-aminoácidos puede ser llevado a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico con la posterior derivatización de la ninidrina, como es descrito por Spackman y otros (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)), o esto puede tener lugar mediante HPLC en fase reversa como es descrito por Lindroth y otros (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

El proceso de acuerdo con la invención es usado para la preparación fermentativa de L-aminoácidos, L-treonina, L-valina, y L-lisina, en particular L-treonina.

La presente invención es explicada con más detalle seguidamente con ayuda de los ejemplos de realización.

Los medios mínimo (M9) y completo (LB) para *Escherichia coli* usados son descritos por J.H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento del ADN plasmídico a partir de *Escherichia coli*, y todas las técnicas de restricción, ligazón, Klenow y el tratamiento con fosfatasa alcalina son llevados a cabo por el método de Sambrook y otros (Molecular Cloning- A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). A menos que se describa lo contrario, la transformación de *Escherichia coli* es llevada a cabo por el método de Chung y otros (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175 (1989)).

La temperatura de incubación para la preparación de las cepas y los transformantes es de 37°C.

Ejemplo 1

Construcción del plásmido de expresión pTrc99Afb

El gen fba a partir de *E. coli* K12 es amplificado usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia nucleotídica del gen fba en *E. coli* K12 MG1655 (Número de Acceso AE000376, Blattner y otros (Science 277: 1453-1462 (1997))), los cebadores del PCR son sintetizados (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania):

fba1: 5' - CGACGATACAGGACAAGAGAC - 3' (SEQ ID No. 1)

fba2: 5' - GCAGAAAGGAATATCTTACAG - 3' (SEQ ID No. 2)

El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655 empleado para el PCR es aislado de acuerdo con las instrucciones del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN de aproximadamente 1100 pb en tamaño puede amplificarse con los cebadores específicos bajo condiciones estándares para el PCR (Innis y otros (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con Pfu-ADN polimerasa (Promega Corporation, Madison, E.U.). El producto PCR se liga con el vector pCR-Blunt II-TOPO (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se transforma en la cepa de *E. coli* TOP10. La selección de las células portadoras de plásmido tiene lugar sobre agar LB, al que se añaden 50 µg/ml de kanamicina. Después de aislamiento del DNA plasmídico, el vector pCR-Blunt II-TOPO-fba se escinde con las enzimas de restricción SpeI y XbaI y, después de separación en gel de agarosa al 0,8% con ayuda del Kit de Extracción de Gel QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania), se aísla el fragmento fba. El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se escinde con la enzima XbaI y se lleva a cabo la ligación con el fragmento fba aislado. La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF (Stratagene, La Jolla, E.U.) es transformada con el lote de ligazón y las células portadoras de plásmido son seleccionadas en agar-LB, a las que son adicionadas 50 µg/ml de ampicilina. La clonación exitosa puede demostrarse después del aislamiento del ADN plasmídico mediante el corte controlado con las enzimas HindIII y PvuII. El plásmido es denominado pTrc99Afb (figura 1).

Ejemplo 2

Preparación de la L-treonina con la cepa MG442/pTrc99Afb

La cepa de *E. coli* MG442 productora de L-treonina es descrita en la especificación de la patente US-A-4,278,765 y depositada como CMIM B-1628 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia).

ES 2 343 944 T3

La cepa MG442 es transformada con el plásmido de expresión pTrc99Afba descrito en el ejemplo 1 y con el vector pTrc99A y las células portadoras de plásmido son seleccionadas en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. Las cepas MG442/pTrc99Afba y MG442/pTrc99A son formadas de esta manera. Las colonias individuales seleccionadas son entonces multiplicadas además en medio mínimo con la siguiente composición: 3.5 g/l de Na₂HPO₄*2H₂O, 1.5 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de NH₄Cl, 0.1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina es chequeada en los cultivos por lotes de 10 ml contenidos en frascos cónicos de 100 ml. Para ello, 10 ml del medio de precultivo de la siguiente composición: 2 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1 g/l de KH₂PO₄, 0.5 g/l de MgSO₄*7H₂O, 15 g/l de CaCO₃, 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina son inoculados y el lote es incubado durante 16 horas a 37°C y 180 rpm en una incubadora ESR de Kühner AG (Birsfelden, Suiza). Porciones de 250 µl de este precultivo son transinoculadas dentro de 10 ml del medio de producción (25 g/l de (NH₄)₂SO₄, 2 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 0.03 g/l de FeSO₄*7H₂O, 0.018 g/l de MnSO₄*1H₂O, 30 g/l de CaCO₃, 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina) y el lote es incubado durante 48 horas a 37°C. La formación de L-treonina por la cepa de partida MG442 es investigada de la misma manera, pero sin que ocurra la adición de la ampicilina al medio. Después de la incubación la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo es determinada con un fotómetro LP2W del Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una medida de longitud de onda de 660 nm.

La concentración de L-treonina formada es entonces determinada en el sobrenadante de cultivo estéril filtrado con un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Alemania) mediante cromatografía de intercambio iónico y una reacción post-columna con la detección de ninidrina.

El resultado del experimento es mostrado en la Tabla 1.

TABLA 1

Cepa	DO (660 nm)	L-Treonina g/l
MG442	5.6	1.4
MG442/pTrc99A	3.8	1.3
MG442/pTrc99Afba	5.9	2.6

Breve descripción de la figura

- Figura 1: Mapa del plásmido pTrc99Afba que contiene el gen fba.

Los datos de longitud pueden ser comprendidos como datos aproximados. Las abreviaturas y designaciones usadas tienen los significados siguientes:

- Amp: Gen de la resistencia a la ampicilina
- lacI: Gen de la proteína represora del promotor trc
- Ptrc: Región del promotor trc, inducible a IPTG
- fba: Región codificadora del gen fba
- 5S: Región 5S del ARNr
- rrrBT: región terminal del ARNr

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

- HindIII: Endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae* R_d
- PuvII: Endonucleasa de restricción de *Proteus vulgaris*
- SpeI: Endonucleasa de restricción de la especie *Sphaerotilus* ATCC 13923
- XbaI: Endonucleasa de restricción de *Xanthomonas campestris*.

ES 2 343 944 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un proceso para la preparación de L-aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en L-treonina, L-lisina y L-valina, donde los pasos siguientes son llevados a cabo:

- 10 a) fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae que producen el L-aminoácido deseado y en el que el gen *fba* de *Escherichia coli* está sobre-expresado, donde la sobreexpresión se logra aumentando el número de copias del gen o colocando dicho gen bajo un promotor fuerte,
- 15 b) concentración del L-aminoácido deseado en el medio o en las células de los microorganismos, y
- c) aislamiento del L-aminoácido deseado, constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o porciones (> 0 a 100%) de las mismas que permanecen opcionalmente en el producto.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la expresión del polinucleótido que codifica para el gen *fba* es aumentada.

20 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde para la preparación de L-treonina los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae son fermentados en el cual además al mismo tiempo uno o más genes seleccionados a partir del grupo que consiste en:

- 25 3.1 el operón *thrABC* que codifica para la aspartato quinasa, homoserina dehidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa,
- 3.2 el gen *pyc* que codifica para piruvato carboxilasa,
- 3.3 el gen *pps* que codifica para fosfoenol piruvato sintasa,
- 30 3.4 el gen *ppc* que codifica para fosfoenol piruvato carboxilasa,
- 3.5 los genes *pntA* y *pntB* que codifican para transhidrogenasa,
- 35 3.6 el gen *rhtB* que imparte resistencia a la homoserina,
- 3.7 el gen *mqo* que codifica para malato:quinona oxidoreductasa,
- 3.8 el gen *rhtC* que imparte resistencia a la treonina,
- 40 3.9 el gen *thrE* que codifica para la proteína exportadora de treonina,
- 3.10 el gen *gdhA* que codifica para glutamato dehidrogenasa,
- 45 3.11 el gen *dps* que codifica para el regulador global *Dps*,
- 3.12 el gen *lrp* que codifica para el regulador del regulón *Lrp* de la leucina,
- 3.13 el gen *ptsG* que codifica para el componente IIBC glucosa-específico,
- 50 3.14 el gen *ptsH* que codifica para la proteína fosfohistidina hexosa fosfotransferasa,
- 3.15 el gen *ptsI* que codifica para la enzima I del sistema de la fosfotransferasa,
- 55 3.16 el gen *crr* que codifica para el componente IIA glucosa-específico,
- 3.17 el gen *mopB* que codifica para la chaperona GroES,
- 3.18 el gen *ahpC* que codifica para la subunidad menor de la alquil hidroperóxido reductasa,
- 60 3.19 el gen *ahpF* que codifica para subunidad mayor de la alquil hidroperóxido reductasa,

es o son sobre-expresados, donde la sobreexpresión es lograda aumentando el número de copias del gen o colocando dicho gen bajo un promotor fuerte.

65 4. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde para la preparación de L-treonina los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae son fermentados en el cual además al mismo tiempo uno o más genes seleccionados a partir del grupo que consiste en:

ES 2 343 944 T3

- 4.1 el gen *tdh* que codifica para la treonina dehidrogenasa,
- 4.2 el gen *mdh* que codifica para la malato dehidrogenasa,
- 5 4.3 el producto del gen *yjfA* del marco de lectura abierto (orf),
- 4.4 el producto del gen *ytfP* del marco de lectura abierto (orf),
- 10 4.5 el gen *pckA* que codifica para fosfoenol piruvato carboxiquinasa,
- 4.6 el gen *poxB* que codifica para piruvato oxidasa,
- 4.7 el gen *aceA* que codifica para isocitrato liasa,
- 15 4.8 el gen *dgsA* que codifica para el regulador DgsA del sistema de la fosfotransferasa,
- 4.9 el gen *fruR* que codifica para el represor de la fructosa,
- 20 4.10 el gen *rpoS* que codifica para el factor σ^{38}

es o son eliminados o reducidos en la expresión.

25 5. Microorganismos que producen L-treonina de la familia Enterobacteriaceae, donde el gen *fba* de *E. coli* y el operón *thrABC*, cuyos genes codifican para la aspartato quinasa, homoserina dehidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa; son sobreexpresados.

30 6. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 5, donde los microorganismos son originados a partir del género *Escherichia*.

35 7. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 6, donde los microorganismos son originados a partir de la especie *E. coli*.

40

45

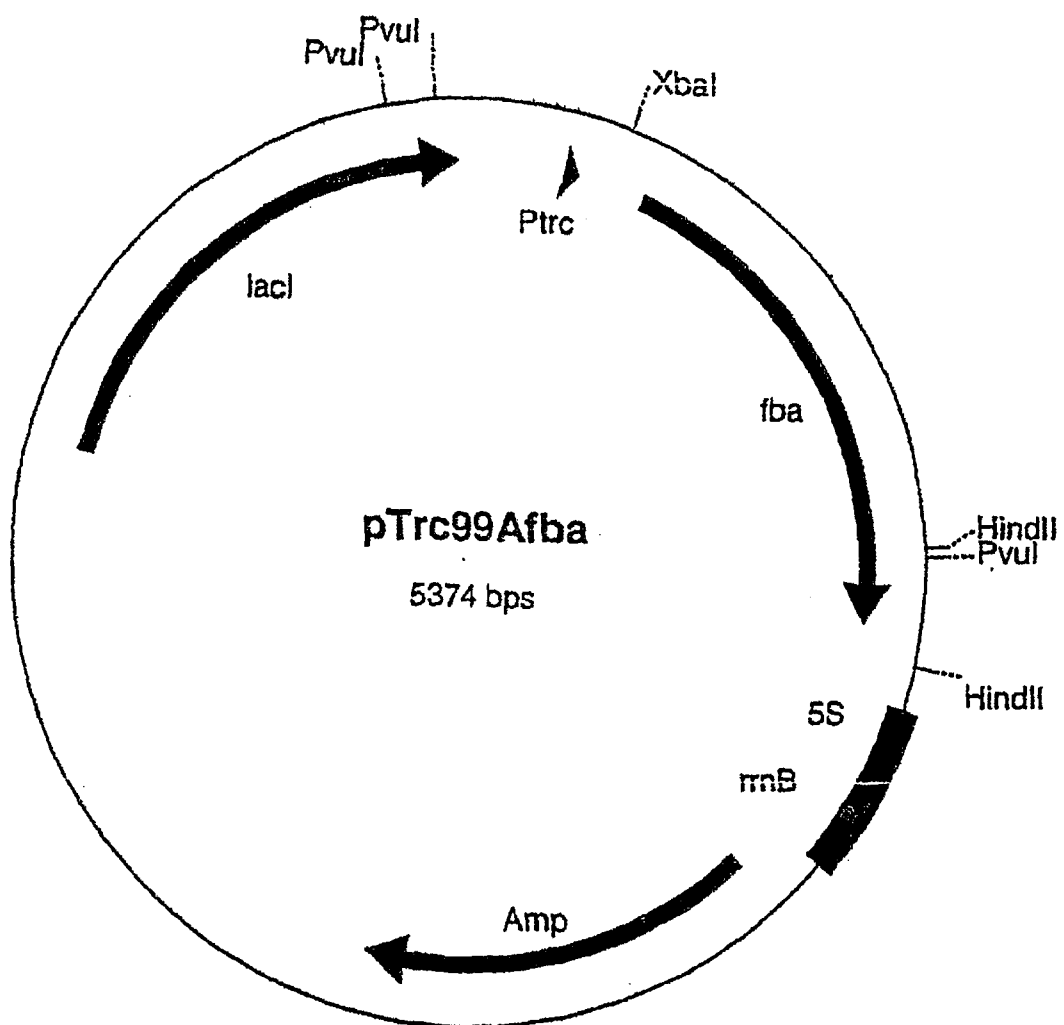
50

55

60

65

Figura 1:



ES 2 343 944 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Degussa AG
- 5 <120> Proceso para la preparación de L-aminoácidos usando cepas de la familia Enteriobacteriaceae
- <130> 020097 BT
- 10 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.1
- 15 <210> 1
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial
- 20 <220>
<221> Cebador
<222> (1)..(21)
- 25 <223> fba1
- <400> 1
- 30 cgacgataca ggacaagaga c 21
- <210> 2
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<221> Cebador
<222> (1)..(21)
<223> fba2
- 40 <400> 2
- 45 gcagaaagga atatcttaca c 21
- 50
- 55
- 60
- 65