



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 645**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02802285 .3**
96 Fecha de presentación : **26.09.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1446493**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2004**

54 Título: **Un proceso para la producción de L-aminoácidos usando cepas de la familia de Enterobacteriaceae que contiene un gen iclR mejorado.**

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

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

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

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

Un proceso para la producción de L-aminoácidos usando cepas de la familia de Enterobacteriaceae que contiene un gen *iclR* mejorado.

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 usando cepas de la familia Enterobacteriaceae, en la cual el gen *iclR* está sobreexpresado.

Arte anterior

Los L-amino ácidos, en particular L-treonina, son usados en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria alimenticia y muy particularmente en la nutrición animal.

Es conocido que los L-aminoácidos son producidos mediante fermentación de cepas de Enterobacteriaceae, en particular *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*. Debido a su gran importancia, constantemente son realizados esfuerzos para mejorar el proceso de producción. Las mejoras en el proceso pueden referirse a medidas concernientes a la tecnología de fermentación, tales como por ejemplo la agitación y el suministro de oxígeno, o a la composición de los medios nutrientes, tales como por ejemplo la concentración de azúcar durante la fermentación o a trabajar para producir el producto mediante, por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones, o a las características intrínsecas del rendimiento del propio microorganismo.

Las características de rendimiento de estos microorganismos son mejoradas usando métodos de mutagénesis, selección y selección de mutante. De esta manera, son obtenidas cepas que son resistentes a antimetabolitos, tales como por ejemplo ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV) análogo a la treonina, o son auxotróficas para metabolitos regulatoriamente significativos y producen L-aminoácidos, tales como por ejemplo L-treonina.

Durante algunos años, métodos de la tecnología del ADN recombinante han sido usados de la misma manera para mejorar las cepas de la familia Enterobacteriaceae que produce L-aminoácidos mediante la amplificación de genes de biosíntesis de aminoácidos individuales e investigando el efecto en la producción.

Objetivo de la invención

El objetivo de la invención es proporcionar medidas novedosas para la producción fermentativa mejorada de L-aminoácidos seleccionados del grupo de L-treonina, L-valina, L-homoserina, y L-lisina.

Sumario de la invención

La invención proporciona un proceso para la producción fermentativa de dichos L-aminoácidos, usando microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, la cual en particular ya produce dichos aminoácidos y en la cual la secuencia de nucleótidos del gen *iclR* está sobreexpresada.

Descripción detallada de la invención

Cualquier mención posterior a L-aminoácidos o aminoácidos debe ser interpretada como uno o más aminoácidos, incluyendo las sales de los mismos, seleccionados del grupo que comprende L-treonina, L-valina, L-homoserina, y L-lisina. La L-treonina es particularmente preferida.

En este sentido, el término “mejoramiento” describe el incremento en la actividad intracelular de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo, cuyas enzimas o proteínas son codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo aumentando el número de copias del gen o los genes, usando un promotor fuerte o un gen o alelo que codifique a una enzima o proteína correspondiente que tiene actividad elevada y opcionalmente combinando estas medidas.

Las medidas de mejoramiento, en particular la sobreexpresión, incrementan la actividad o concentración de la proteína correspondiente en general en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% y como máximo 1000% ó 2000% con respecto a la actividad o concentración de la proteína de tipo irregular, o la actividad o concentración del microorganismo de partida.

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

- a) fermentación de los microorganismos modificados de la familia Enterobacteriaceae que producen el(los) L-aminoácido(s) deseado(s) y en los cuales la sobreexpresión del gen *iclR* de la *Escherichia coli* o de secuencias de nucleótidos que codifican el producto genético de dicho gen *iclR* conduce a un incremento de al menos 10% de la actividad o concentración de dicha proteína *iclR*, con respecto a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida,

ES 2 311 645 T3

- b) acumulación del L-aminoácido deseado en el medio o en las células de los microorganismos, y
- c) aislamiento de dicho L-aminoácido, en el cual los constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o fracciones (> 0 a 100%) de la misma permanecen 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, melaza, opcionalmente almidón, opcionalmente celulosa o glicerol y etanol. Ellos son representantes de la familia Enterobacteriaceae seleccionados del género *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*. Los géneros *Escherichia* y *Serratia* son preferidos. Dentro del género *Escherichia*, la especie *Escherichia coli* puede ser mencionada en particular y dentro del género *Serratia*, la especie *Serratia marcescens*.

Cepas apropiadas 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 VNIIGentika MG442

Escherichia coli VNIIGentika M1

Escherichia coli VNIIGentika 472T23

Escherichia coli BKIIM B-3996

Escherichia coli kat 13

Escherichia coli KCCM-10132

Cepas apropiadas productoras de L-treonina 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 Enterobacteriaceae, preferiblemente tienen, inter alia, una o más de las características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo: resistencia al ácido α -amino- β -hidroxivalérico, resistencia a la tialisina, resistencia a la etionina, resistencia a la α -metilserina, resistencia al ácido diaminosuccínico, resistencia al ácido α -aminobutírico, resistencia a la borrelidina, resistencia a la rifampicina, resistencia a análogos de la valina tales como por ejemplo el hidroxamato de valina, resistencia a los análogos de purina, tales como por ejemplo 6-dimetilaminopurina, dependencia de L-metionina, opcionalmente dependencia parcial o compensable de la L-isoleucina, dependencia del ácido meso-diaminopimélico, auxotrofia con respecto a dipéptidos que contienen treonina, resistencia a la L-treonina, resistencia a la L-homoserina, resistencia a la L-lisina, resistencia a la metionina L, resistencia al ácido L-glutámico, resistencia al L-aspartato, resistencia a la L-leucina, resistencia a la L-fenilalanina, resistencia a la L-serina, resistencia a la L-cisteína, resistencia a L-valina, sensibilidad al fluoropiruvato, treonina deshidrogenasa defectuosa, habilidad opcional de usar sacarosa, mejoramiento del operón de treonina, mejoramiento de la homoserina deshidrogenasa I-aspartato quinasa I, preferiblemente la forma resistente a la retroalimentación, mejoramiento de la homoserina quinasa, mejoramiento de la treonina sintasa, mejoramiento de la aspartato quinasa, opcionalmente la forma resistente a la retroalimentación, mejoramiento de la aspartato semialdehído deshidrogenasa, mejoramiento de fosfoenolpiruvato carboxilasa, opcionalmente la forma resistente a la retroalimentación, mejoramiento de la fosfoenolpiruvato sintasa, mejoramiento de la transhidrogenasa, mejoramiento del producto del gen RhtB, mejoramiento del producto del gen RhtC, mejoramiento del producto del gen YfiK, mejoramiento de una piruvato carboxilasa y atenuación de la formación de ácido acético.

Ha sido descubierto que, después de la sobreexpresión del gen *iclR*, los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae producen dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, de manera mejorada.

ES 2 311 645 T3

Las secuencias de nucleótidos de los genes de *Escherichia coli* son parte del arte anterior y también pueden ser obtenidos por medio de la secuencia genómica de la *Escherichia coli* publicada por Blattner y otros (Science 277: 1453-1462 (1997)).

5 gen *iclR*:

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

10 Referencia: Sunnarborg y otros; Journal of Bacteriology 172(5): 2642-2649 (1990); Cortay y otros; EMBO Journal 10(3): 675-679 (1991)

Número de acceso: AE000475

15 gen *fadR*: (no es parte de la invención)

Descripción: Regulador y del metabolismo del acetato y del ácido graso (*fadR*)

20 Referencia: DiRusso; Nucleic Acids Research 16 (16): 7995-8009 (1988); Raman y otros; Journal of Biological Chemistry 272(49): 30645-30650 (1997)

Número de acceso: AE000217

25 Nombres alternativos del gen: *dec*, *ole*, *thdB*.

30 Las secuencias de ácido nucleico pueden ser obtenidas a partir de las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.) la base de datos de secuencias de nucleótidos de European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania o Cambridge, Reino Unido) o el DNA Data Bank de Japón (DDBJ, Mishima, Japón).

35 Los genes descritos en las referencias mencionadas pueden ser usados de acuerdo con la invención. Los alelos de los genes surgidos de la degeneración del código genético o de mutaciones de sentido funcionalmente neutrales también pueden ser usados.

El mejoramiento puede ser logrado, por ejemplo, incrementado la expresión genética o las propiedades catalíticas de las proteínas. Ambas medidas pueden ser opcionalmente combinadas.

40 La sobreexpresión puede ser lograda incrementado el número de copias de los genes correspondientes o mutando el promotor y la región de regulación o el sitio de unión de los ribosomas localizados aguas arriba del gen estructural. Los casetes de expresión incorporados aguas arriba del gen estructural actúan de la misma manera. Es posible adicionalmente incrementar la expresión durante la producción fermentativa de L-treonina por medio de promotores inducibles. La expresión es mejorada también por medio de medidas para extender la vida del ARNm. La actividad enzimática es mejorada además evitando la degradación de la proteína de la enzima. Los genes o las estructuras de los genes pueden estar presentes en los plásmidos en un número variable de copias o estar integrados en el cromosoma y ser amplificados. Alternativamente, la sobreexpresión de los genes en cuestión puede ser lograda también modificando la composición de los medios y las condiciones de cultivo.

50 Un especialista en el arte encontrará orientación en este sentido inter alia 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 Kipp (Gene 80:161-169 (1989)), en Hamilton y otros (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), en Jensen y Hammer, (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) y en libros de textos conocidos sobre genética y biología molecular.

55 Los vectores de plásmidos replicables en Enterobacteriaceae, tales como por ejemplo los vectores de clonación derivados del pACYC184 (Bartolomé y otros; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann y otros; Gene 69: 301-315 (1988)) o derivados del pSC101 (Vocke y Bastia; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80 (21): 6557-6561 (1983)), pueden ser usados. Una cepa transformada con un vector de plásmido puede ser usada en un proceso de acuerdo con la invención, en el cual el vector de plásmido posee al menos uno o más de los genes seleccionados del grupo *iclR* y secuencias de nucleótidos que los codifican.

65 También es posible introducir mutaciones que afecten la expresión de genes particulares en varias cepas mediante el intercambio de secuencia (Hamilton y otros; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), conjugación o transducción.

ES 2 311 645 T3

Además pudiera ser ventajoso para la producción de dichos aminoácidos, en particular L-treonina, con cepas de la familia Enterobacteriaceae, además de sobreexpresar el gen *iclR*, sobreexpresar una o más enzimas de la trayectoria biosintética conocida de la treonina o enzimas de metabolismo anaplerótico o enzimas para la producción de fosfato de dinucleótido adenina nicotinamida reducido o enzimas de glicolisis o enzimas PTS o enzimas de metabolismo del azufre.

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

- el operón *thrABC*, que codifica para la aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa (US-A-4,278,765),
- el gen *pyc*, de *Corynebacterium glutamicum*, que codifica para la piruvato carboxilasa (WO 99/18228),
- el gen *pps*, que codifica para la fosfoenolpiruvato sintasa (Molecular and General Genetics 231 (2): 332-336 (1992)),
- el gen *ppc*, que codifica para la fosfoenolpiruvato 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 *mgo*, que codifica para la malato: quinona oxidoreductasa (Journal of Bacteriology 182: 6892-6899 (2000)),
- 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 (EP-A-1 085 091),
- el gen *gdhA*, que codifica para la glutamato deshidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- el gen *hns*, que codifica para la proteína HLP-II de enlace de ADN (Molecular and General Genetics 212: 199-202 (1988)),
- el gen *pmg*, que codifica para la fosfoglucomutasa (Journal of Bacteriology 176: 5847-5851 (1994)),
- el gen *fba*, que codifica para la fructosa bifosfato aldolasa (Biochemical Journal 257: 529-534 (1989)),
- el gen *ptsH* del operón *ptsHicrr* que codifica para la proteína fosfohistidina fosfotransferasa hexosa del sistema de fosfotransferasa, PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen *ptsI* del operón *ptsHicrr* que codifica para la enzima I del sistema de fosfotransferasa, PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen *crr* del operón *ptsHicrr* que codifica para el componente IIA específico de glucosa del sistema de fosfotransferasa, PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen *ptsG*, que codifica al componente IIBC específico de glucosa (Journal of Biological Chemistry 261: 16398-16403 (1986)),
- el gen *lrp*, que codifica para el regulador del regulón de leucina (Journal of Biological Chemistry 266: 10768-10774 (1991)),
- el gen *mopB*, que codifica para la chaperona 10 kD (Journal of Biological Chemistry 261: 12414-112419 (1986)), el que también es conocido con el nombre de *groES*,
- el gen *ahpC* del operón *ahpCF* que codifica para la subunidad pequeña de 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 para la subunidad grande de 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 para la cisteína sintasa A (Journal of Bacteriology 170: 3150-3157 (1988)),

ES 2 311 645 T3

- el gen *cysB*, que codifica para el regulador del regulón de *cys* (Journal of Biological Chemistry 262: 5999-6005 (1987)),
- 5 • el gen *cysJ* del operón *cysJIH* que codifica para la flavoproteína de la NADPH-sulfito reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989)), (Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- 10 • el gen *cysI* del operón *cysJIH* que codifica para 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 para la adenilil sulfato reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989)), (Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- 15 • el gen *phoB* del operón *phoBR* que codifica para el regulador positivo PhoB del regulón de Pho (Journal of Molecular Biology 190 (1): 37-44 (1986)),
- el gen *phoR* del operón *phoBR* que codifica para la proteína sensora del regulón de Pho (Journal of Molecular Biology 192 (3): 549-556 (1986)),
- 20 • el gen *phoE*, que codifica para la proteína E de la membrana celular exterior (Journal of Molecular Biology 163 (4): 513-532 (1983)),
- el gen *malE* que codifica para la proteína de enlace periplasmática de transporte de maltosa (Journal of Biological Chemistry 259 (16): 10606-10613 (1984)),
- 25 • el gen *pykF*, que codifica para la piruvato quinasa I estimulada con fructosa (Journal of Bacteriology 177 (19): 5719-5722 (1995)),
- 30 • el gen *pfkB*, que codifica para la 6-fosfofructoquinasa II (Gene 28 (3): 337-342 (1984)),
- el gen *talB*, que codifica para la transaldolasa B (Journal of Bacteriology 177 (20) 5930-5936 (1995)),
- 35 • el gen *rseA* del operón *rseABC* que codifica para una proteína de membrana con actividad anti-sigmaE (Molecular Microbiology 24 (2): 355-371 (1997)),
- el gen *rseC* del operón *rseABC* que codifica para el regulador global del factor sigmaE (Molecular Microbiology 24 (2): 355-371 (1997)),
- 40 • el gen *sodA*, que codifica para la superóxido dismutasa (Journal of Bacteriology 155 (3): 1078-1087 (1983)),
- el gen *sucA* del operón *sucABCD* que codifica para la subunidad de decarboxilasa de 2-quetoglutarato deshidrogenasa (European Journal of Biochemistry 141 (2): 351-359 (1984)),
- 45 • el gen *sucB* del operón *sucABCD* que codifica para la subunidad de dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-quetoglutarato deshidrogenasa (European Journal of Biochemistry 141 (2): 361-374 (1984)),
- el gen *sucC* del operón *sucABCD* que codifica para la subunidad β de succinil-CoA sintetasa (Biochemistry 24 (22): 6245-6252 (1985)), y
- 50 • el gen *sucD* del operón *sucABCD* que codifica para la subunidad α de la succinil-CoA sintetasa (Biochemistry 24 (22): 6245-6252 (1985))
- 55 • el gen *fadR* que codifica para el regulador *fadR* del metabolismo del acetato y del ácido graso (Nucleic Acids Research 16 (16): 7995-8009 (1988)).

Además pudiera resultar ventajoso para la producción de dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, además de sobreexpresar el gen *iclR*, atenuar, en particular suprimir o reducir la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo

- el gen *tdh*, que codifica para la treonina deshidrogenasa (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- 65 • el gen *mdh*, que codifica para la malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),

ES 2 311 645 T3

- El marco de lectura abierta yjfA (orf) (número de acceso AAC77180 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.)),
- El marco de lectura abierta ytfP (orf) (número de acceso AAC77179 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.)),
- El gen pckA, que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato 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)) el que también es conocido con el nombre de gen mlc,
- El gen fruR, que codifica para el represor de fructosa (Molecular and General Genetics 226: 332-336 (1991)), el que también es conocido con el nombre de gen cra,
- El gen rpoS, que codifica para el factor Sigma³⁸ (WO 01/05939), el que también es conocido con el nombre de gen katF,
- El gen aspA, que codifica para la aspartato amonio liasa de (aspartasa) (Nucleic Acids Research 13 (6): 2063-2074 (1985)) y
- El gen aceB, que codifica para la malato sintasa A (Nucleic Acids Research 16 (19): 9342 (1988)).

En este sentido, el término “atenuación” significa reducir o suprimir la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo, cuyas enzimas son codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo usando un promotor débil o un gen o un alelo que codifica para una enzima correspondiente que tiene una baja actividad o inactiva la correspondiente enzima (proteína) o gen y opcionalmente combinando estas medidas.

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

Por otra parte, pudiera resultar ventajoso para la producción de dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, además de sobreexpresar el gen iclR, suprimir las reacciones secundarias no deseadas (Nakayama: “Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms” en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.) Academic Press, Londres, Gran Bretaña, 1982).

Los microorganismos producidos de acuerdo con la invención pueden ser cultivados usando el proceso por lotes, el proceso por lotes alimentados o proceso repetido por lotes alimentados. Un resumen de los métodos de cultivo conocidos aparece en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 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 ser usado debe satisfacer adecuadamente los requerimientos de las cepas en particular. Los medios de cultivo para varios microorganismos son descritos en el “Manual of Methods for General Bacteriology” de la American Society for Bacteriology (Washington, D.C., EE.UU., 1981)

Las fuentes de carbón que pueden ser usadas incluyen 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 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 ser usadas individualmente o como una mezcla.

Las fuentes de nitrógeno que pueden ser usadas comprenden compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz, harina de soya 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 ser usadas individualmente o como una mezcla.

Las fuentes de fósforo que pueden ser usadas son ácido fosfórico, dihidrógeno fosfato de potasio o hidrógeno fosfato de dipotasio 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 del crecimiento tales como aminoácidos y vitaminas pueden ser usadas además de las sustancias mencionadas con anterioridad. Adicionalmente pueden ser añadidos al medio de

ES 2 311 645 T3

cultivo precursores apropiados. Las sustancias de alimentación antes mencionadas pueden ser añadidas al medio de cultivo como un solo lote o pueden ser añadidas apropiadamente durante el cultivo.

Compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o agua de amoníaco, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico son usados apropiadamente para controlar el pH del cultivo. La espuma puede ser controlada usando agentes antiespumantes tales como por ejemplo ésteres de poliglicol de ácido graso. Sustancias apropiadas que actúan selectivamente, tales como por ejemplo antibióticos, pueden ser añadidas al medio con el fin de mantener la estabilidad de los plásmidos. Oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, tales como por ejemplo aire, son introducidos en el cultivo a fin de mantener las condiciones aeróbicas. La temperatura del cultivo es normalmente de 25°C a 45°C y preferiblemente de 30°C a 40°C. El cultivo es continuado hasta que se haya formado la cantidad máxima de L-aminoácidos o L-treonina. Este objetivo es logrado normalmente dentro de 10 a 160 horas.

El análisis de los aminoácidos puede ser realizado por cromatografía de intercambio aniónico con la subsiguiente derivación de ninhidrina, como es descrito en Spackman y otros (Analytical Chemistry, 30: 1190-1206 (1958)) o puede ser realizada por HPLC de fase inversa, como es descrito en Lindroth y otros (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

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

La presente invención es ilustrada con mayor detalle por los siguientes ejemplos prácticos.

El medio mínimo (M9) y el medio completo (LB) usado para la *Escherichia coli* son descritos por J. H. Millar (A Short Course in Bacterial Genetics (1992)), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento del ADN plásmido de la *Escherichia coli* y todas las técnicas de restricción, de ligación, de Klenow y de tratamiento de fosfatasa alcalina fueron realizadas de acuerdo con Sambrook y otros, (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). A menos que sea planteado lo contrario, la transformación de la *Escherichia coli* fue realizada de acuerdo con Cheng y otros, (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.

Ejemplo 1

Producción de L-treonina usando el gen fadR (no es parte de la invención)

1a) Construcción del plásmido de expresión de pTrc99AfadR

El gen fadR de la *E. coli* K12 es amplificado usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores de PCR son sintetizados (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) sobre la base de la secuencia de nucleótidos del gen fadR en *E. coli* K12 MG1655 (número de acceso AE000217, Blattner y otros (Science 277: 1453-1462 (1997))).

Las secuencias de cebador son modificadas de manera que sean obtenidos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. La secuencia de reconocimiento para XbaI es seleccionada para el cebador fadR3, mientras que la secuencia de reconocimiento para HindIII es seleccionada para el cebador fadR4, estas secuencias siendo indicadas por las porciones subrayadas de la secuencia de nucleótidos mostrada a continuación:

fadR3: 5' - GTCCAACTTTGTCTAGATGAGTTATGG** - 3' (SEC ID no. 1)**

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

El ADN cromosómico de la *E. coli* K12 MG1655 usado para la PCR es aislado usando "Qiagen Genomic-tips 100/G" (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un fragmento de ADN de aproximadamente 800 bp puede ser amplificado con los cebadores específicos en condiciones de PCR estándares (Innis y otros (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) usando polimerasa de ADN Pfu (Promega Corporation, Madison, EE.UU.). El producto de la PCR es ligado 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 transformado en la cepa de *E. coli* TOP10. Las células portadoras de plásmidos son seleccionadas en agar LB que ha sido combinado con 50 µg/ml de kanamicina. Después del aislamiento del ADN plásmido, el vector pCR-Blunt II-TOPO-fadR es segmentado con las enzimas de restricción HindIII y XbaI y, después de la separación, el fragmento fadR es aislado en 0.8% de gel agarosa usando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Farmacia Biotech, Uppsala, Suecia) es segmentado con las enzimas HindIII y XbaI y ligado con el fragmento aislado de fadR. La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) es transformada con el lote de ligación y las células portadoras de plásmidos son seleccionadas en agar LB, que ha sido combinado con

ES 2 311 645 T3

50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. El éxito de la clonación puede ser verificado después del aislamiento del ADN plásmido realizando una segmentación de prueba con las enzimas *AccI*, *HincII* y *SspI*. El plásmido es denominado pTrc99AfadR (figura 1).

1b) Producción de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99AfadR (no es parte de la invención)

La cepa MG442 de *E. coli* productora de L-treonina es descrita en la patente US-A-4, 278,765 y ha sido depositada como CMIM B-1628 en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, Moscú, Rusia).

La cepa MG442 es transformada con el plásmido de expresión pTrc99AfadR descrito en el Ejemplo 1a y el vector pTrc99A y las células portadoras de plásmidos son seleccionadas en agar con 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. De este modo, son obtenidas las cepas MG442/pTrc99AfadR y MG442/pTrc99A. Las colonias individuales seleccionadas son entonces multiplicadas de nuevo sobre medio mínimo de las siguientes composiciones: 3.5 g/l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de NH_4Cl , 0.1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina es verificada en 10 ml de cultivo por lotes en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Dicho cultivo es inoculado con 10 ml de medio de precultivo de la siguiente composición: 2 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l de KH_2PO_4 , 0.5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/l de CaCO_3 , 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina e 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 transferidas a 10 ml del medio de producción (25 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.018 g/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 30 g/l de CaCO_3 , 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina) e incubadas durante 48 horas a 37°C. La formación de la L-treonina por la cepa de partida MG442 es verificada de la misma manera, pero sin la adición de ampicilina al medio. Después de la incubación, la densidad óptica (OD) de la suspensión del cultivo es determinada a una longitud de onda de medición de 660 nm usando un fotómetro LP2W de la compañía Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania).

La concentración de L-treonina formada es entonces determinada en el sobrenadante del cultivo filtrado estéril usando un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) por cromatografía de intercambio iónica y reacción posterior en columna con detección de ninhidrina.

La Tabla 1 muestra el resultado de la prueba.

TABLA 1

Cepa	OD (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	5.6	1.4
MG442/pTrc99A	3.8	1.3
MG442/pTrc99AfadR	4.0	1.6

Ejemplo 2

Producción de L-treonina usando el gen *iclR*

2a) Construcción del plásmido de expresión pTrc99AiclR

El gen *iclR* de *E. coli* K12 es amplificado usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores de PCR son sintetizados (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) sobre la base de la secuencia de nucleótidos del gen *iclR* en *E. coli* K12 MG1655 número de acceso AE000475, Blattner y otros, (Science 277: 1453-1462 (1997)). Las secuencias de cebadores son modificadas de manera tal que sean obtenidos los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción. La secuencia de reconocimiento para *XbaI* es seleccionada para el cebador *iclR3*, mientras la secuencia de reconocimiento para *HindIII* es seleccionada para el cebador *iclR4*, estas secuencias siendo indicadas por las porciones subrayadas de la secuencia de nucleótidos mostrada a continuación:

iclR3: 5' - CAGTTCAGTATCTAGAGCATGAGCTAAC - 3'
(SEC ID no. 3)

iclR4: 5' - GGTATGATGGGCAGAAGCTTGCCTCTGC - 3'
(SEC ID no. 4)

El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655 usado para la PCR es aislado usando "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un fragmento de ADN de aproximadamente 950 bp puede ser amplificado con los cebadores específicos usando condiciones estándares de PCR (Innis y otros, (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) usando polimerasa de ADN Pfu (Promega Corporation, Madison, EE.UU.). El producto de la PCR es ligado 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 transformado en la cepa de *E. coli* TOP10.

Las células portadoras de plásmidos son seleccionadas en agar LB que ha sido combinado con 50 µg/ml de kanamicina. Después del aislamiento del ADN plásmido, el vector pCR-Blunt II-TOPO-fadR es segmentado con las enzimas de restricción HindIII y XbaI y, después de la separación, el fragmento iclR es aislado en 0.8% de gel agarosa usando el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) es segmentado con las enzimas HindIII y XbaI y ligado con el fragmento aislado de iclR. La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) es transformada con el lote de ligación y las células portadoras de plásmidos son seleccionadas en agar LB, que ha sido combinado con 50 µg/ml de ampicilina. El éxito de la clonación puede ser verificado después del aislamiento del ADN plásmido realizando una segmentación de prueba con las enzimas BstEII, MluI y RsaI. El plásmido es denominado pTrc99AiclR (figura 2).

2b) Producción de la L-treonina con la cepa MG442/pTrc99AiclR

La cepa MG442 de *E. coli* productora de L-treonina es descrita en la patente US-A-4,278,765 y ha sido depositada como CMIM B-1628 en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, Moscú, Rusia).

La cepa MG442 es transformada con el plásmido de expresión pTrc99AiclR descrito en el Ejemplo 2a y el vector pTrc99A y las células portadoras de plásmidos son seleccionadas en LB agar con 50 µg/ml de ampicilina. De este modo, son obtenidas cepas MG442/pTrc99AiclR y MG442/pTrc99A. Las colonias individuales seleccionadas son entonces multiplicadas de nuevo sobre un medio mínimo de 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 verificada en 10 ml de cultivo por lotes en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Dicho cultivo es inoculado con 10 ml de 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 e 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 transferidas a 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) e incubadas durante 48 horas a 37°C. La formación de L-treonina por la cepa de partida MG442 es verificada de la misma manera, pero sin la adición de ampicilina al medio. Después de la incubación, la densidad óptica (OD) de la suspensión del cultivo es determinada a una longitud de onda de medición de 660 nm usando un fotómetro LP2W de la compañía Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania).

La concentración de L-treonina formada es entonces determinada en el sobrenadante del cultivo filtrado estéril usando un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) por cromatografía de intercambio iónico y reacción posterior en columna con detección de ninhidrina.

La tabla 2 muestra el resultado de la prueba.

TABLA 2

Cepa	DO (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	5.6	1.4

ES 2 311 645 T3

MG442/pTrc99A	3.8	1.3
MG442/pTrc99AiclR	5.7	2.8

Breve descripción de las figuras

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

Figura 2: mapa del plásmido pTrc99AiclR que contiene el gen iclR.

Las longitudes planteadas deben ser consideradas aproximadas. Las abreviaturas y términos usados tienen el siguiente significado:

- Amp: gen de resistencia a la ampicilina
- lacI: gen para la proteína represora del promotor trc
- Ptrc: región del promotor trc, inducible por IPTG
- fadR: región de codificación del gen fadR
- iclR: región de codificación del gen iclR
- 5s: región ARNr 5s
- rrnBT: región del terminador de ARNr

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

- AccI: endonucleasa de restricción de *Acinetobacter calcoaceticus*
- BstEII: endonucleasa de restricción de *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980
- HincII: endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae* R_c
- HindIII: endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae*
- MluI: endonucleasa de restricción de *Micrococcus luteus* IFO 12992
- RsaI: endonucleasa de restricción *Rhodopseudomonas sphaeroides*
- SspI: endonucleasa de restricción de la especie *Sphaerotilus* ATCC 13925
- XbaI: endonucleasa de restricción de *Xanthomonas campestris*.

REIVINDICACIONES

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

- a) fermentación de microorganismos modificados de la familia Enterobacteriaceae que producen el(los) L-aminoácido(s) deseado(s) y en los cuales la sobreexpresión del gen *iclR* de la *Escherichia coli* o de secuencias de nucleótidos que codifican dicho gen *iclR* conduce a un incremento de al menos 10% de la actividad o concentración de dicha proteína *iclR*, con respecto 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 el cual los constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o fracciones de la misma (>0 a 100%) permanecen opcionalmente en el producto.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual los L-aminoácidos deseados son producidos mediante fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae en la cual además al mismo tiempo la actividad o concentración de una o más de las proteínas codificadas por los genes seleccionados del grupo consistente en:

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

ES 2 311 645 T3

- 2.24 el gen *cysJ*, que codifica para la flavoproteína de NADPH-sulfito reductasa,
- 2.25 el gen *cysI*, que codifica para la hemoproteína de la NADPH-sulfito reductasa,
- 5 2.26 el gen *cysH*, que codifica para la adenilil sulfato reductasa,
- 2.27 el gen *phoB*, que codifica para el regulador positivo de *PhoB* del regulón de *Pho*,
- 2.28 el gen *phoR* que codifica para la proteína sensora del regulón de *Pho*,
- 10 2.29 el gen *phoE*, que codifica para la proteína E de la membrana celular exterior,
- 2.30 el gen *malE*, que codifica para la proteína de enlace periplasmática de transporte de maltosa,
- 15 2.31 el gen *pykF*, que codifica para la piruvato quinasa I estimulada con fructosa,
- 2.32 el gen *pfkB*, que codifica para la 6-fosfofructoquinasa II,
- 2.33 el gen *talB*, que codifica para la transaldolasa B,
- 20 2.34 el gen *rseA*, que codifica para una proteína de membrana que actúa como regulador negativo en la actividad σ de *sigmaE*,
- 2.35 el gen *rseC*, que codifica para un regulador global del factor σ de *sigmaE*,
- 25 2.36 el gen *sodA*, que codifica para la superóxido dismutasa,
- 2.37 el gen *sucA*, que codifica para la subunidad de decarboxilasa de 2-quetoglutarato deshidrogenasa,
- 30 2.38 el gen *sucB*, que codifica para la subunidad de dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-quetoglutarato deshidrogenasa,
- 2.39 el gen *sucC*, que codifica para la subunidad β de la succinil-CoA sintetasa,
- 35 2.40 el gen *sucD*, que codifica para la subunidad α de la succinil-CoA sintetasa, y
- 2.41 el gen *fadR*, que codifica para el regulador *FadR* del ácido graso y el metabolismo del acetato.

40 es incrementada en al menos 10%, con respecto a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida, mediante sobreexpresión de uno o más de dichos genes.

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

- 3.1 el gen *tdh*, que codifica para la treonina deshidrogenasa,
- 50 3.2 el gen *mdh*, que codifica para la malato deshidrogenasa,
- 3.3 el marco de lectura abierta (orf) *yjFA*,
- 3.4 el marco de lectura abierta (orf) *ytfP*,
- 55 3.5 el gen *pckA*, que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa,
- 3.6 el gen *poxB*, que codifica para la piruvato oxidasa,
- 60 3.7 el gen *aceA*, que codifica para la isocitrato liasa,
- 3.8 el gen *dgsA*, que codifica para el regulador *DgsA* del sistema de fosfotransferasa,
- 3.9 el gen *fruR*, que codifica para el represor de fructosa,
- 65 3.10 el gen *rpoS*, que codifica para el factor σ^{38} ,

ES 2 311 645 T3

3.11 el gen aspA, que codifica para la aspartato liasa de amonio (aspartasa) y

3.12 el gen aceB, que codifica para la malato sintasa A.

5 es reducida a 0% ó como máximo a 75% de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida mediante atenuación de uno o más de dichos genes.

10 4. Microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, que producen L-aminoácidos, seleccionados del grupo de L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina en los cuales la actividad o concentración de las proteínas codificadas por el gen iclR de *Escherichia coli* o por secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína iclR y en los cuales la actividad o concentración de una o más proteína(s) codificada(s) por uno o más gen(es) adicional(es) es incrementada en al menos 10%, con respecto a la actividad o concentración de las proteínas en el microorganismo de partida en condiciones similares de fermentación mediante sobreexpresión de dichos genes, en el cual dichos genes adicionales son seleccionados del grupo consistente en:

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

20 4.2 el gen pyc que codifica para la piruvato carboxilasa,

4.3 el gen pps que codifica para la fosfoenolpiruvato sintasa,

25 4.4 el gen ppc que codifica para la fosfoenolpiruvato carboxilasa,

4.5 los genes pntA y pntB que codifican para la transhidrogenasa,

4.6 el gen rhtB que imparte resistencia a la homoserina,

30 4.7 el gen mqo que codifica para la malato:quinona oxidoreductasa,

4.8 el gen rhtC que imparte resistencia a la treonina,

35 4.9 el gen thrE que codifica para la proteína exportadora de treonina,

4.10 el gen gdhA que codifica para la glutamato deshidrogenasa,

4.11 el gen hns que codifica para la proteína HLP-II de enlace de ADN,

40 4.12 el gen pmg, que codifica para la fosfoglucoisomerasa,

4.13 el gen fba, que codifica para la fructosa bifosfato aldolasa,

45 4.14 el gen ptsH, que codifica para la proteína fosfohistidina fosfotransferasa hexosa,

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

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

50 4.17 el gen ptsG que codifica para el componente IIBC específico de la glucosa,

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

55 4.19 el gen mopB, que codifica para la chaperona 10 kD,

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

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

60 4.22 el gen cysK, que codifica para la cisteína sintasa A,

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

65 4.24 el gen cysJ, que codifica para la flavoproteína de la NADPH-sulfito reductasa,

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

ES 2 311 645 T3

- 4.26 el gen *cysH*, que codifica para la adenilil sulfato reductasa,
4.27 el gen *phoB*, que codifica para el regulador positivo de *PhoB* del regulón de *Pho*,
5 4.28 el gen *phoR*, que codifica para la proteína sensora del regulón de *pho*,
4.29 el gen *phoE*, que codifica para la proteína E de la membrana celular exterior,
4.30 el gen *malE*, que codifica para la proteína de enlace periplasmática del transporte de maltosa,
10 4.31 el gen *pykF*, que codifica para la piruvato quinasa I estimulada con fructosa,
4.32 el gen *pfkB*, que codifica para la 6-fosfofructoquinasa II,
15 4.33 el gen *talB*, que codifica para la transaldolasa B,
4.34 el gen *rseAm*, que codifica para una proteína de membrana que actúa como regulador negativo en la actividad σ factor,
20 4.35 el gen *rseC*, que codifica para un regulador global del factor σ factor,
4.36 el gen *sodA*, que codifica para la superóxido dismutasa,
4.37 el gen *sucA*, que codifica para la subunidad de decarboxilasa de 2-quetoglutarato deshidrogenasa,
25 4.38 el gen *sucB*, que codifica para la subunidad de dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-quetoglutarato de deshidrogenasa,
4.39 el gen *sucC*, que codifica para la subunidad β de succinil-CoA sintetasa,
30 4.40 el gen *sucD*, que codifica para la subunidad α de succinil-CoA sintetasa, y
4.41 el gen *fadR*, que codifica para el regulador *FadR* del metabolismo del acetato y del ácido graso.

35 5. Microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, que producen L-aminoácidos, seleccionados del grupo L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina en los cuales la actividad o concentración de las proteínas codificadas por el gen *iclR* de la *Escherichia coli* o por secuencias de nucleótidos que codifican dicha proteína es incrementada en al menos 10%, con respecto a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida, mediante sobreexpresión del gen y en los cuales la actividad o concentración de una o más proteína(s) codificada(s) por gen(es) adicional(es) es reducida a 0 ó como máximo a 75% con respecto a la actividad o concentración de dicha(s) proteína(s) en el microorganismo de partida en condiciones de fermentación similares mediante atenuación de uno o más gen(es) adicional(es), en el cual dichos genes adicionales son seleccionados del grupo consistente en:

- 5.1 el gen *tdh* que codifica para la treonina deshidrogenasa,
45 5.2 el gen *mdh* que codifica para la malato deshidrogenasa,
5.3 el marco de lectura abierta (orf) *yjfA*,
5.4 el marco de lectura abierta (orf) *ytfP*,
50 5.5 el gen *pckA* que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa,
5.6 el gen *poxB* que codifica para la piruvato oxidasa,
55 5.7 el gen *aceA*, que codifica para la isocitrato liasa,
5.8 el gen *dgsA* que codifica para el regulador *DgsA* del sistema de fosfotransferasa,
5.9 el gen *fruR* que codifica para el represor de fructosa,
60 5.10 el gen *rpoS*, que codifica para el factor σ factor³⁸.

65 6. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 en los cuales los microorganismos son originarios del género *Escherichia*.

7. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 en los cuales los microorganismos son originarios de la especie *E. coli*.

Figura 1:

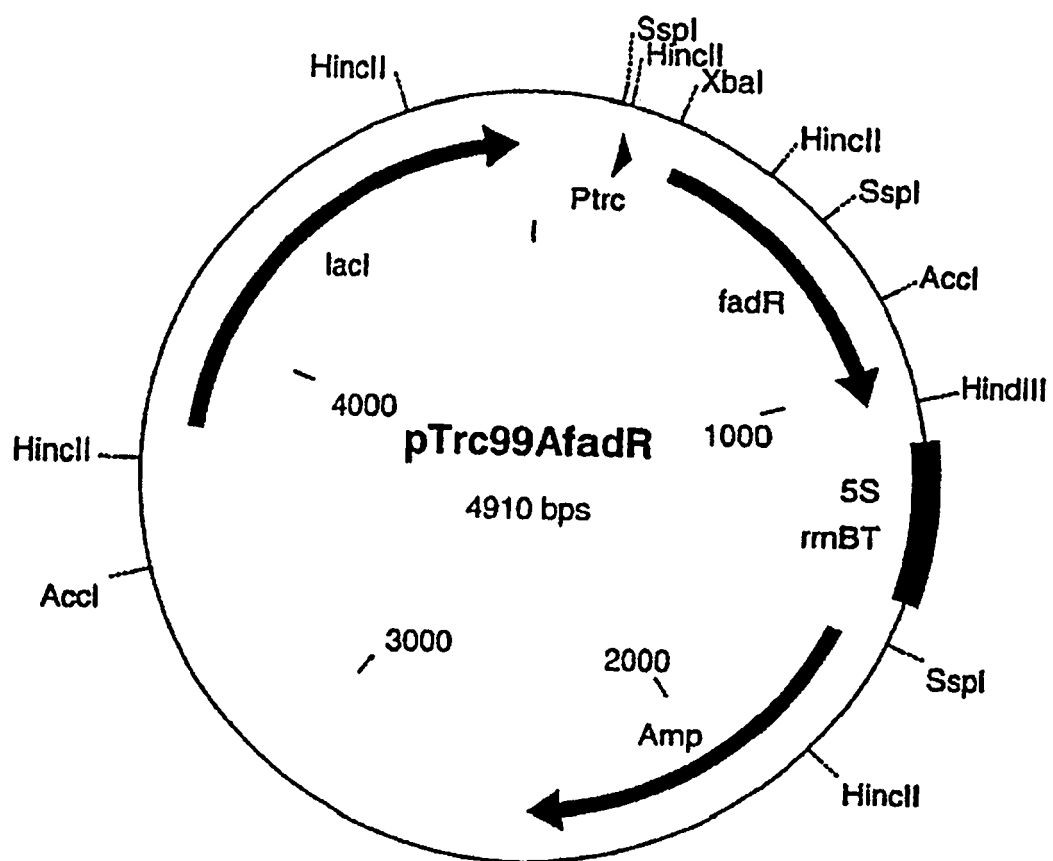
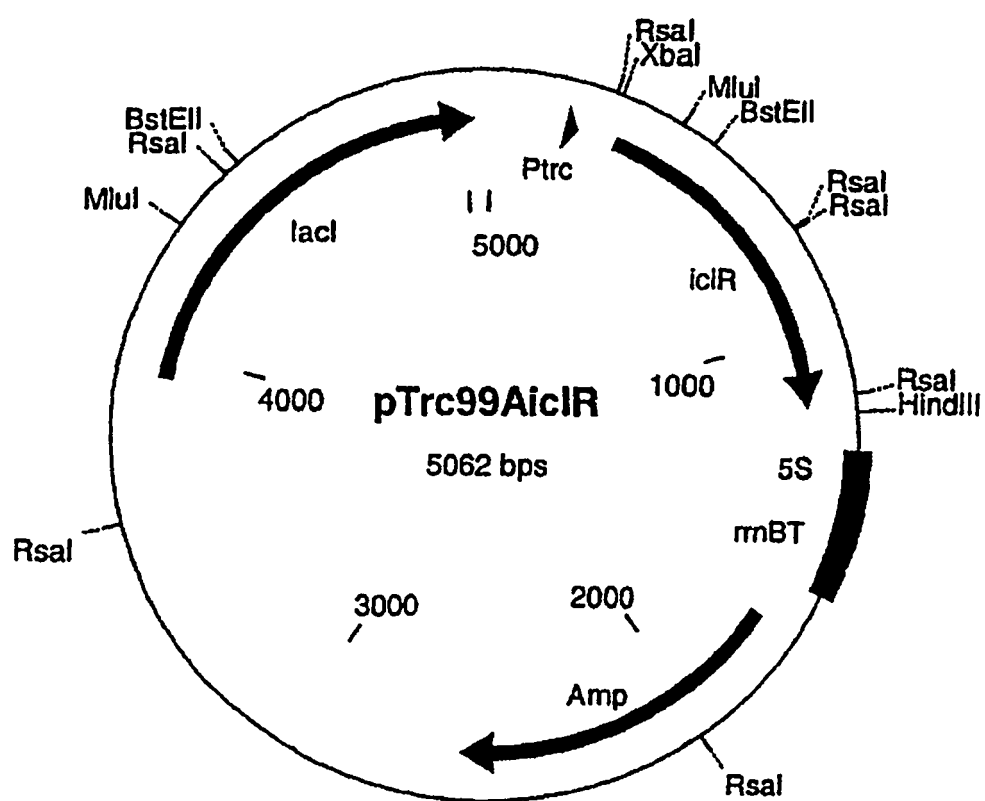


Figura 2:



ES 2 311 645 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Degussa AG	
5	<120> Proceso para la producción de L-aminoácidos usando cepas de la familia Enterobacteriaceae que contienen un gen fadR o iclR mejorado	
	<130> 010455 BT	
10	<160> 4	
	<170> PatentIn versión 3.1	
15	<210> 1	
	<211> 27	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Cebador	
25	<222> (1)..(27)	
	<223> fadR3	
	<400> 1	
30	gtccaacttt gtctagatga gttatgg	27
	<210> 2	
35	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia sintética	
40	<220>	
	<221> Cebador	
	<222> (1)..(27)	
45	<223> fadR4	
	<400> 2	
50	gaggggtttg aagcttaaac ggaaggg	27
	<210> 3	
	<211> 28	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia sintética	
	<220>	
60	<221> Cebador	
	<222> (1)..(28)	
	<223> iclR3	
65	<400> 3	
	cagttcagta tctagagcat gagctaac	28

ES 2 311 645 T3

<210> 4

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Secuencia sintética

<220>

<221> Cebador

10 <222> (1)..(28)

<223> iclR4

<400> 4

15

ggatgatgg gcagaagctt gcctctgc

28

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65