



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 229**

51 Int. Cl.:
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02743259 .0**
96 Fecha de presentación : **03.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1407027**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Proceso para la preparación de L-treonina utilizando cepas de la familia Enterobacteriáceas que contienen genes sucC y sucD intensificados.**

30 Prioridad: **18.07.2001 DE 101 35 053**
23.07.2001 US 306869 P

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.11.2009

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

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.11.2009

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

ES 2 328 229 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-treonina utilizando cepas de la familia Enterobacteriáceas que contienen genes sucC y sucD intensificados.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a un proceso para la preparación de L-aminoácidos, en particular L-treonina, utilizando cepas de la familia Enterobacteriáceas en las cuales al menos están sobreexpresados los genes sucC y sucD.

10 **Técnica anterior**

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

15 Es conocida la preparación de L-aminoácidos por fermentación de cepas de Enterobacteriáceas, en particular *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*. Debido a su gran importancia, se están realizando continuamente trabajos para mejorar los procesos de preparación. Las mejoras del proceso pueden referirse a las condiciones de fermentación, tales como v.g. agitación y suministro de oxígeno, o a la composición de los medios nutrientes, tal como 20 v.g. la concentración de azúcar durante la fermentación, o la elaboración hasta la forma del producto, mediante, v.g. cromatografía de cambio iónico, o las propiedades intrínsecas de producción del microorganismo propiamente dicho.

Para mejorar las propiedades de producción de estos microorganismos se utilizan métodos de mutagénesis, selección y selección de mutantes. De este modo se obtienen cepas que son resistentes a antimetabolitos, tales como 25 v.g. el análogo de treonina ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV) o son auxótrofas para metabolitos de importancia reguladora y producen L-aminoácidos, tales como v.g. L-treonina.

Se han empleado también desde hace varios años métodos de la técnica del DNA recombinante para ampliar la variedad de cepas de la familia Enterobacteriáceas que producen L-aminoácidos, por amplificación de genes individuales 30 de la biosíntesis de aminoácidos e investigación del efecto sobre la producción.

Objeto de la invención

El objeto de la invención es proporcionar nuevas medidas para la preparación mejorada por fermentación de L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina. 35

Sumario de la invención

La invención proporciona un proceso para la preparación fermentativa de dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, utilizando microorganismos de la familia Enterobacteriáceas que producen ya en particular L-aminoácidos y en los cuales al menos están sobreexpresados los genes sucC y sucD. 40

Descripción detallada de la invención

45 Donde se mencionan L-aminoácidos o aminoácidos en lo que sigue, esto significa uno o más aminoácidos, con inclusión de sus sales, seleccionados del grupo constituido por L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina. Se prefiere particularmente L-treonina.

El término "intensificación" describe en este contexto el aumento de la actividad intracelular de una o más enzimas 50 o proteínas en un microorganismo que están codificadas por el DNA correspondiente, por ejemplo por aumento del número de copias del gen o genes, utilizando un promotor potente o un gen o alelo que codifica una enzima o proteína correspondiente con actividad alta, y opcionalmente combinación de estas medidas.

Por medidas de intensificación, en particular sobreexpresión, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se incrementa en general al menos en un 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, 55 hasta un máximo de 1000% o 2000%, basada en la de la proteína de tipo salvaje o la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

El proceso comprende la realización de los pasos siguientes:

- 60 a) fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriáceas en los cuales los genes sucC y sucD, están sobreexpresados,
- b) concentración de dicho(s) L-aminoácido(s) en el medio o en las células de los microorganismos de la familia 65 Enterobacteriáceas, y
- c) aislamiento de dicho o dichos L-aminoácidos, quedando opcionalmente en el producto constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o porciones (> 0 a 100%) de la misma.

ES 2 328 229 T3

Los microorganismos que proporciona la presente invención pueden 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 del género *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*. Se prefieren los géneros *Escherichia* y *Serratia*. Del género *Escherichia* puede mencionarse en particular la especie *Escherichia coli*, y del género *Serratia* la especie *Serratia marcescens*.

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

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

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

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

Las cepas de la familia Enterobacteriáceas que producen L-treonina tienen preferiblemente, entre otras, una o más características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo constituido por:

- 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-dimetil-aminopurina, necesidad de L-metionina, opcionalmente necesidad parcial y compensable de L-iso-leucina, necesidad de ácido meso-diaminopimélico, auxotrofia con respecto 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, treonina-deshidrogenasa deficiente, opcionalmente capacidad para utilización de sacarosa, intensificación del operón treonina, intensificación de la homoserina-deshidrogenasa I-aspartato-quinasa I, preferiblemente de la forma resistente a la realimentación, intensificación de homoserina-quinasa, intensificación de treonina-sintasa, intensificación de aspartato-quinasa, opcionalmente de la forma resistente a la realimentación, intensificación de aspartato-semialdehído-deshidrogenasa, intensificación de fosfoenolpiruvato-carboxilasa, opcionalmente de 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 los microorganismos de la familia Enterobacteriáceas producen dichos L-aminoácidos, en particular L-treonina, de manera incrementada después de sobreexpresión de los genes *sucC* y *sucD*.

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

65

ES 2 328 229 T3

La información siguiente, entre otras, acerca de los genes sucC y sucD se conoce por la técnica anterior:

5	Gen sucC	
	Descripción:	Subunidad β de succinil-CoA-sintetasa
	EC N°	6.2.1.5
10	Referencia:	Buck et al.; Biochemistry 24(22): 6245-6252 (1985); Buck y Guest; Biochemical Journal 260(3): 737-747 (1989); Cronan y Laporte; en: Neidhardt (ed), Escherichia coli and Salmonella, American Society for Microbiology, Washington, D.C., EEUU: 206-216 (1996)
15		
20	N° de Acceso:	AE000176
25		
	Gen sucD	
30	Descripción:	Subunidad α de succinil-CoA-sintetasa
	EC N°	6.2.1.5
35	Referencia:	Buck et al.; Biochemistry 24(22): 6245-6252 (1985); Buck y Guest; Biochemical Journal 260(3): 737-747 (1989); Cronan y Laporte; en: Neidhardt (ed), Escherichia coli and Salmonella, American Society for Microbiology, Washington, D.C., EEUU: 206-216 (1996)
40		
45		
50	N° de Acceso:	AE000176

Las secuencias de ácido nucleico pueden encontrarse en los bancos de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EEUU), el banco de datos de secuencias de nucleótidos de los European Molecular Biologies Laboratories (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 de texto mencionadas pueden utilizarse de acuerdo con la invención. Adicionalmente, pueden utilizarse alelos de los genes que resultan de la degeneración del código genético o debidos a "mutaciones sentido" de función neutra.

Para lograr una intensificación, por ejemplo, pueden aumentarse la expresión de los genes o las propiedades catalíticas de las proteínas. Las dos medidas pueden combinarse opcionalmente.

Para conseguir una sobreexpresión, puede aumentarse el número de copias de los genes correspondientes, o pueden mutarse el promotor y la región reguladora del sitio de fijación de ribosoma aguas arriba del gen estructural. Casetes de expresión que se incorporan aguas arriba del gen estructural actúan del mismo modo. Con ayuda de promotores indu-

ES 2 328 229 T3

cibles, es posible aumentar adicionalmente la expresión en el curso de la producción de L-treonina por fermentación. La expresión se mejora análogamente por medidas para prolongar la vida del m-RNA. Adicionalmente, la actividad enzimática se aumenta también por prevención de la degradación de la proteína enzimática. Los genes o constructos génicos pueden estar presentes en plásmidos con un número variable de copias, o pueden integrarse y amplificarse en el cromosoma. Como alternativa, puede conseguirse adicionalmente una sobreexpresión de los genes en cuestión por cambio de la composición de los medios y el procedimiento de cultivo.

Instrucciones en este contexto pueden ser encontradas por los expertos, *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 *et al.* (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), en LaVallie *et al.* (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), en PCT/US97/13359, 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 plasmídicos que son capaces de replicación en Enterobacteriáceas, tales como v.g. 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 y Bastia; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80 (21): 6557-6561 (1983)). Una cepa transformada con un vector plasmídico, donde el vector plasmídico lleva al menos uno o más de los genes seleccionados del grupo constituido por sucC y sucD, o secuencias de nucleótidos que codifican éstos, pueden emplearse en un proceso de acuerdo con la invención.

Asimismo, es posible transferir mutaciones que afectan a la expresión del gen particular en diversas cepas por cambio de secuencia (Hamilton *et al.*; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), conjugación o transducción.

Adicionalmente, puede ser ventajosa para la producción de L-treonina con cepas de la familia Enterobacteriáceas, además de la sobreexpresión de los genes sucC y sucD, la intensificación de una o más enzimas del camino conocido de biosíntesis de la treonina o enzimas del metabolismo anaplerótico o enzimas para la producción de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido o enzimas de la glicólisis o enzimas PTS o enzimas del metabolismo del azufre.

Así, por ejemplo, pueden sobreexpresarse al mismo tiempo uno o más de los genes seleccionados del grupo constituido por:

- 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 fosfoenol-piruvato-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 *mqo* que codifica malato:quinona-oxidoreductasa (WO 02/06459),
- el gen *rhtC* que imparte resistencia a treonina (EP-A-1 013 765),
- el gen *thrE* de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la proteína exportadora de treonina (WO 01/92545),
- 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-bisfosfato-aldolasa (Biochemical Journal 257: 529-534 (1989)),
- el gen *ptsH* del operón *ptsHI* que codifica la fosfohistidina-protein-hexosa-fosfotransferasa del sistema de fosfotransferasa PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),

ES 2 328 229 T3

- el gen *ptsI* del operón *ptsHicrr* que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- 5 • el gen *crr* del operón *ptsHicrr* que codifica el componente IIA específico de glucosa del sistema de fosfo-transferasa 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)),
- 10 • 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)), y es conocido también por el nombre *groES*,
- 15 • el gen *ahpC* del operón *ahpCF* que codifica 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 la subunidad grande de alquil-hidroperóxido-reductasa (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92: 7617-7621 (1995)),
- 20 • el gen *cysK* que codifica 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)),
- 25 • 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)),
- 30 • 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 adenilil-sulfato-reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- 35 • el gen *phoE* que codifica la proteína E de la membrana exterior de la célula (Journal of Molecular Biology 163 (4): 513-532 (1983)),
- el gen *malE* que codifica la proteína periplásmica de fijación del transporte de maltosa (Journal of Biological Chemistry 259 (16): 10606-10613 (1984)),
- 40 • el gen *pykF* que codifica piruvato-quinasa I estimulada por fructosa (Journal of Bacteriology 177 (19): 5719-5722 (1995)),
- 45 • 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-sigmaE (Molecular Microbiology 24 (2): 355-371 (1997)),
- 50 • el gen *rseC* del operón *rseABC* que codifica un regulador global del factor sigmaE (Molecular Microbiology 24 (2): 355-371 (1997)),
- 55 • el gen *sodA* que codifica superóxido-dismutasa (Journal of Bacteriology 155 (3): 1078-1087 (1983)),
- el gen *phoB* del operón *phoBR* que codifica el regulador positivo PhoB del regulón *pho* (Journal of Molecular Biology 190 (1): 37-44 (1986)),
- 60 • 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 *sucA* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato-deshidrogenasa (European Journal of Biochemistry 141 (2): 351-359 (1984)) y
- 65 • 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)).

ES 2 328 229 T3

Adicionalmente, puede ser ventajosa para la producción de L-treonina, además de la sobreexpresión de los genes *sucC* y *sucD*, la eliminación de uno o más de los genes seleccionados del grupo constituido por:

- 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 producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yjFA* (Número de Acceso AAC77180 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.),
- el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *ytfP* (Número de Acceso AAC77179 del National Center for Biotechnology Information (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)),
- 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: 256-251 (1995)) que es conocido también como el gen *mlc*,
- el gen *fruR* que codifica el represor fructosa (Molecular and General Genetics 226: 332-336 (1991)), y es conocido también con el nombre de gen *cra* y
- el gen *rpoS* que codifica el factor sigma³⁸ (WO 01/05939), y es conocido también con el nombre de gen *katF*.

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

Por medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce en general a 0 hasta 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 de 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 la sobreexpresión de los genes *sucC* y *sucD*, eliminar reacciones secundarias 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 de lotes (cultivo discontinuo), el proceso de lote alimentado (proceso de alimentación), o el proceso de realimentación repetida (proceso de alimentación repetitivo). Un sumario de métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Bioprocess Technology 1. Introduction to Bioprocess Technology (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Bioreactors and Peripheral Equipment] (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo a utilizar debe satisfacer los requerimientos de las cepas particulares de manera adecuada. Descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos se contienen en el libro de texto “Manual of Methods for General Bacteriology” de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EEUU, 1981).

Azúcares y carbohidratos, tales como v.g. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidón y opcionalmente celulosa, aceites y grasas, tales como v.g. aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos tales como v.g. ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como v.g. glicerol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como v.g. ácido acético pueden utilizarse como la fuente de carbono. Estas sustancias pueden utilizarse individualmente o como una mezcla.

Compuestos orgánicos nitrogenados, tales como peptonas, extractos de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz, harina de semilla 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 utilizarse como la fuente de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno pueden utilizarse individualmente o en forma de mezcla.

ES 2 328 229 T3

Ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio pueden utilizarse como la fuente de fósforo. El medio de cultivo debe comprender adicionalmente sales de metales, tales como v.g. sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, sustancias esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas, pueden emplearse además de las sustancias arriba mencionadas. Adicionalmente, pueden añadirse al medio de cultivo precursores adecuados. Las sustancias de partida mencionadas pueden añadirse al cultivo en la forma de un lote simple, o pueden alimentarse durante el cultivo de manera adecuada.

Compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, pueden emplearse de manera adecuada para controlar el pH del cultivo. Antiespumantes, tales como v.g. ésteres poliglicólicos de ácidos grasos, pueden emplearse para controlar el desarrollo de espuma. Sustancias adecuadas que tienen una acción selectiva, v.g. antibióticos, pueden añadirse al medio para mantener la estabilidad de los plásmidos. Para mantener condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como v.g. aire. La temperatura del cultivo es usualmente 25°C a 45°C, y preferiblemente 30°C a 40°C. El cultivo se continúa hasta que se ha formado un máximo de L-aminoácidos o L-treonina. Esta meta se alcanza usualmente dentro de 10 horas a 160 horas.

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

El proceso de acuerdo con la invención se utiliza para la preparación fermentativa de L-aminoácidos, tales como, por ejemplo, L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina, en particular L-treonina.

La presente invención se explica con mayor detalle a continuación con ayuda de ejemplos de realización.

El medio mínimo (M9) y medio completo (LB) para *Escherichia coli* utilizados han sido descritos por J.H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento de DNA plasmídico de *Escherichia coli* y todas las técnicas de restricción, ligación, Klenow y tratamiento con fosfatasa alcalina se llevan a cabo por el método de 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 lleva a cabo por el método de Chung *et al.* (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 cepas y transformantes es 37°C.

Ejemplo 1

40 Construcción del plásmido de expresión pTrc99A*sucCD*

Los genes *sucC* y *sucD* de *E. coli* K12 se amplifican utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y oligonucleótidos sintéticos. Partiendo desde la secuencia de nucleótidos de los genes *sucC* y *sucD* en *E. coli* K12 MG1655 (Número de Acceso AE000176, Blattner *et al.* (Science 277:1453-1462 (1997))), se sintetizan iniciadores PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Las secuencias de los iniciadores se modifican de tal manera que se forman sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. La secuencia de reconocimiento para XbaI se selecciona para el iniciador *sucCD1* y la secuencia para HindIII para el iniciador *sucCD2*, que están marcadas por subrayado en las secuencias de nucleótidos que se muestran a continuación:

sucCD1: 5' - GGATCTAGACGATTACTGAAGGATGGACAGAAC - 3'
(SEQ ID No. 1)

sucCD2: 5' - GAGAAGCTTGGCGAGGGCTATTTCTTATTAC - 3'
(SEQ ID No. 2)

El DNA cromosómico de *E. coli* K12 MG1655 empleado para la PCR se aísla de acuerdo con las instrucciones del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de DNA de aproximadamente 2100 pb de tamaño puede amplificarse con los iniciadores específicos en condiciones PCR estándar (Innis *et al.* (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con DNA-polimerasa Pfu (Promega Corporation, Madison, EE.UU.).

El producto PCR se escinde con las enzimas de restricción XbaI y HindIII y se liga con el vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), que se ha digerido con las enzimas XbaI y HindIII. La cepa de *E. coli* XL1-BlueMRF' (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) se transforma con el lote de ligación y las células portadoras del plásmido se selec-

ES 2 328 229 T3

cionan en agar LB, al que se añaden 50 µg/ml de ampicilina. La clonación satisfactoria puede demostrarse después de aislamiento del DNA plasmídico por restricción de control con las enzimas EcoRV, HpaI y SspI. El plásmido se designa pTrc99AsucCD (Figura 1).

5

Ejemplo 2

Preparación de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99AsucCD

10 La cepa de *E. coli* MG442 productora de L-treonina se describe en la memoria descriptiva de patente US-A-4278765 y está depositada como CMIM B-1628 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia).

15 La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99AsucCD descrito en el Ejemplo 1 y con el vector pTrc99A, y las células portadoras del plásmido se seleccionan en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. De este modo se forman las cepas MG442/pTrc99AsucCD y MG442/pTrc99A. Se multiplican luego adicionalmente las colonias individuales seleccionadas en medio mínimo con 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, y 50 mg/l ampicilina. La formación de L-treonina se comprueba en cultivos discontinuos de 10 ml contenidos en matraces cónicos de 100 ml. Para esto, se inoculan 10 ml del 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, y 50 mg/l ampicilina y el lote se incuba durante 16 horas a 37°C y 180 rpm en una incubadora ESR de Kühner AG (Birsfelden, Suiza).

25 Porciones de 250 µl de este precultivo se transinoculan en 10 ml de medio de producción (25 g/l (NH₄)₂SO₄, 2 g/l KH₂PO₄, 1 g/l MgSO₄*7H₂O, 0,03 g/l FeSO₄*7H₂O, 0,018 g/l MnSO₄*1H₂O, 30 g/l CaCO₃, 20 g/l glucosa, 50 mg/l ampicilina) y el lote se incuba durante 48 horas a 37°C. La formación de L-treonina por la cepa de partida MG442 se investiga del mismo modo, pero sin que tenga lugar adición alguna de ampicilina al medio. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo con un fotómetro LP2W del Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una longitud de onda de medida de 660 nm.

30

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

35 El resultado del experimento se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

40

Cepa	DO (660 nm)	L-Treonina g/l
MG442	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	3,8	1,3
MG442/pTrc99AsucCD	5,7	2,6

55

Breve descripción de la figura

Figura 1: Mapa del plásmido pTrc99AsucCD que contiene los genes sucC y sucD.

60 Los datos de longitud deben entenderse como datos aproximados. Las abreviaturas y designaciones utilizadas tienen el significado siguiente:

- Amp: resistencia a ampicilina
- lacI: gen para la proteína represora del promotor trc
- P_{trc}: región promotora trc, inducible por IPTG

65

ES 2 328 229 T3

- sucC: región codificante del gen sucC
- sucD: región codificante del gen sucD
- 5S: región de rRNA 5S
- rrnBT: región terminadora de rRNA

Las abreviaturas para las enzimas de restricción tienen el significado siguiente

- EcoRV: endonucleasa de restricción de *Escherichia coli* B946
- HindIII: endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae*
- HpaI: endonucleasa de restricción de *Haemophilus parainfluenzae*
- SspI: endonucleasa de restricción de *Sphaerotilus species* ATCC 13925
- XbaI: endonucleasa de restricción de *Xanthomonas campestris*

REIVINDICACIONES

5 1. Un proceso para la producción de L-aminoácidos, seleccionados del grupo L-treonina, L-valina, L-homoserina y L-lisina, en el que se realizan los pasos siguientes:

- a) fermentación de microorganismos modificados de la familia Enterobacteriáceas que producen dicho o dichos L-aminoácidos,
- 10 b) concentración de dicho o dichos L-aminoácidos en el medio o en las células de los microorganismos, y
- c) aislamiento de dicho o dichos aminoácidos, en donde constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o porciones (> 0 a 100%) de la misma quedan opcionalmente en el producto,

15 en donde el microorganismo modificado comparado con el microorganismo no modificado comprende un gen *sucC* sobreexpresado y un gen *sucD* sobreexpresado, los dos cuales codifican subunidades de succinil-CoA-sintetasa o secuencias de nucleótidos sobreexpresadas que codifican los productos génicos de dichos genes.

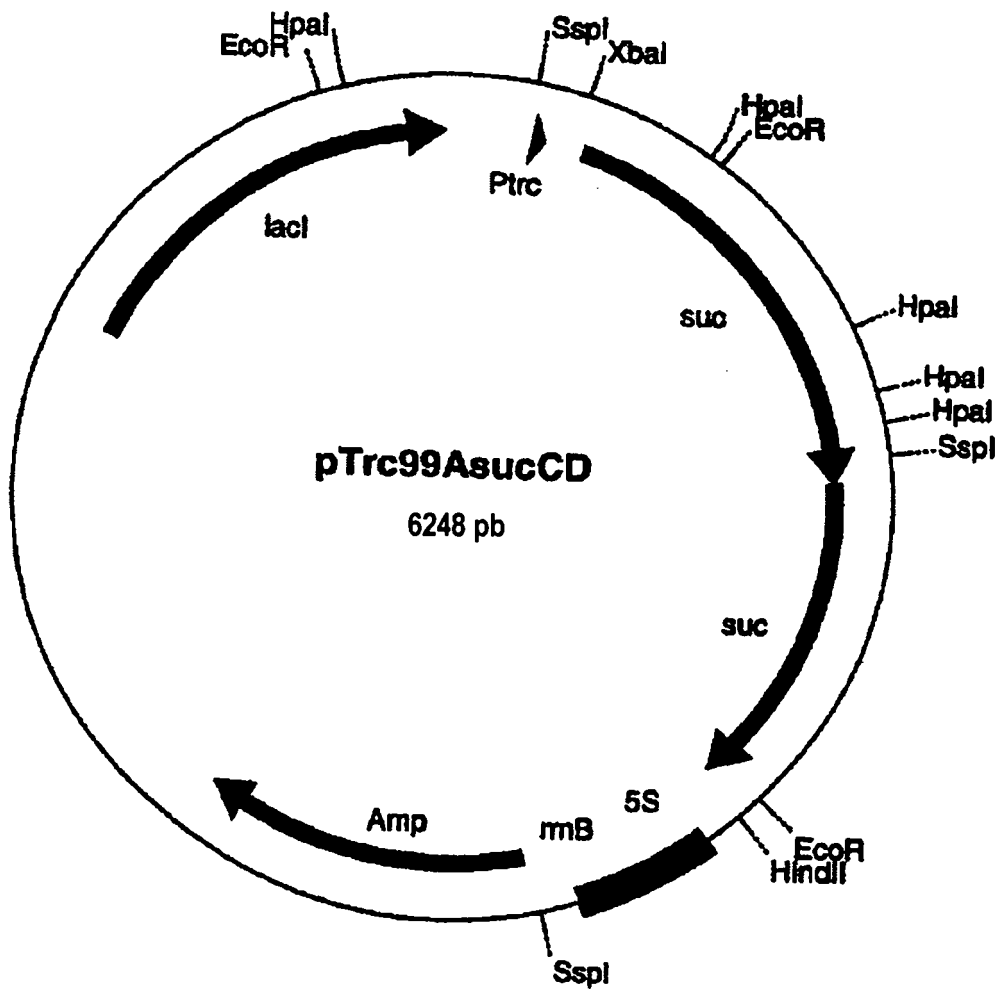
20 2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se produce L-treonina por fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriáceas en la cual se sobreexpresa(n) adicionalmente al mismo tiempo uno o más de los genes seleccionados del grupo constituido por:

- 2.1 el operón *thrABC* que codifica aspartato-quinasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-quinasa y treonina-sintasa,
- 25 2.2 el gen *pyc* que codifica piruvato-carboxilasa,
- 2.3 el gen *pps* que codifica fosfoenol-piruvato-sintasa,
- 30 2.4 el gen *ppc* que codifica fosfoenolpiruvato carboxilasa,
- 2.5 los genes *pntA* y *pntB* que codifican transhidrogenasa,
- 2.6 el gen *rhtB* de *Escherichia coli* que codifica una proteína que imparte resistencia a homoserina,
- 35 2.7 el gen *mqo* que codifica malato:quinona-oxidoreductasa,
- 2.8 el gen *rhtC* de *Escherichia coli* que codifica una proteína que imparte resistencia a treonina,
- 40 2.9 el gen *thrE* que codifica la proteína exportadora de treonina,
- 2.10 el *gdhA* gen que codifica glutamato-deshidrogenasa
- 2.11 el gen *hns* que codifica la proteína de fijación de DNA HLP-II,
- 45 2.12 el gen *pgm*, que codifica fosfoglucoisomerasa,
- 2.13 el gen *fba* que codifica fructosa-bisfosfato-aldolasa,
- 50 2.14 el gen *ptsH* que codifica la fosfohistidina-protein-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 IIA específico de glucosa,
- 55 2.17 el gen *ptsG* que codifica el componente IIBC específico de glucosa,
- 2.18 el gen *lrp*, que codifica el regulador del regulón leucina,
- 60 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,
- 65 2.22 el gen *cysK*, que codifica cisteína-sintasa A,

ES 2 328 229 T3

- 2.23 el gen *cysB*, que codifica el regulador del regulón *cys*,
- 2.24 el gen *cysJ*, que codifica la flavoproteína de la NADPH-sulfito-reductasa,
- 5 2.25 el gen *cysI*, que codifica la hemoproteína de la NADPH-sulfito-reductasa,
- 2.26 el gen *cysH*, que codifica adenilil-sulfato-reductasa,
- 2.27 el gen *phoE* que codifica la proteína E de la membrana exterior de la célula,
- 10 2.28 el gen *malE*, que codifica la proteína periplásmica de fijación del transporte de maltosa,
- 2.29 el gen *pykF*, que codifica piruvato-quinasa I estimulada por fructosa,
- 15 2.30 el *pfkB* *gene* que codifica 6-fosfofructoquinasa II,
- 2.31 el gen *talB* que codifica transaldolasa B,
- 2.32 el gen *rseA*, que codifica una proteína de membrana que actúa como regulador negativo de la actividad de
- 20 *sigmaE*,
- 2.33 el gen *rseC*, que codifica un regulador global del factor *sigmaE*,
- 2.34 el gen *sodA*, que codifica superóxido-dismutasa,
- 25 2.35 el gen *phoB* que codifica el regulador positivo PhoB del regulón *pho*, y
- 2.36 el gen *phoR* que codifica la proteína sensora del regulón *pho*.
- 30 3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde se produce L-treonina por fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriáceas en la cual se elimina(n) al mismo tiempo uno o más de los genes seleccionados del grupo constituido por:
- 3.1 el gen *tdh* que codifica treonina-deshidrogenasa,
- 35 3.2 el gen *mdh* que codifica malato-deshidrogenasa,
- 3.3 el producto génico del marco de lectura abierto (orf) *yjfA* de *E. coli*, cuando dicho organismo es *Escherichia coli*,
- 40 3.4 el producto génico del marco de lectura abierto (orf) *ytfP* de *E. coli*, cuando dicho organismo es *Escherichia coli*,
- 3.5 el gen *pckA* que codifica fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa,
- 45 3.6 el gen *poxB* que codifica piruvato-oxidasa,
- 3.7 el gen *aceA* que codifica isocitrato-liasa,
- 50 3.8 el gen *dgsA* que codifica el regulador DgsA del sistema de fosfotransferasa,
- 3.9 el gen *fruR* que codifica el represor fructosa, y
- 55 3.10 el gen *rpoS* que codifica el factor *sigma*³⁸.
4. Microorganismos recombinantes del género *Escherichia*, que producen L-treonina, y en donde al menos:
- a) el operón *thrABC*, cuyos genes codifican aspartato-quinasa, homoserina-deshidrogenasa, homoserina-quinasa y treonina-sintasa, y
- 60 b) los genes *sucC* y *sucD*, los dos cuales codifican subunidades de succinil-CoA-sintetasa, o secuencias de nucleótidos que codifican los productos génicos de dichos genes,
- están sobreexpresados.
- 65 5. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los microorganismos se originan de la especie *E. coli*.

Fig. 1:



ES 2 328 229 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Degussa AG

5 <120> Proceso para la preparación de L-aminoácidos utilizando cepas de la familia Enterobacteriáceas que contienen un gen sucC o sucD intensificado

<130> 010293BT

10

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.1

15

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Iniciador

25

<222> (1)..(33)

<223> sucCD1

<400> 1

30

ggatctagac gattactgaa ggatggacag aac

33

35 <210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<221> Iniciador

<222> (1)..(31)

45

<223> sucCD2

<400> 2

50

gagaagcttg gogagggcta tttcttatta c

31

55

60

65