



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 174**

51 Int. Cl.:  
**C12P 13/08** (2006.01)  
**C12R 1/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09003058 .6**  
96 Fecha de presentación : **02.07.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2067864**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2009**

54 Título: **Procedimiento para la producción de la L-lisina que utiliza *Escherichia coli*.**

30 Prioridad: **05.07.2000 JP 2000-204252**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2011**

73 Titular/es: **AJINOMOTO Co., Inc.**  
**15-1, Kyobashi 1-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es: **Nakai, Yuta;**  
**Nakanishi, Kazuo;**  
**Kawahara, Yoshio;**  
**Ito, Hisao y**  
**Kurahashi, Osamu**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 360 174 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

Procedimiento para la producción de la L-lisina que utiliza *Escherichia coli*.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una sustancia que utiliza un microorganismo. En la presente invención, el microorganismo es la *Escherichia coli*. La sustancia que va a producirse es la L-lisina.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 Muchos organismos adquieren energía para las actividades vitales mediante la respiración. En la respiración de los microorganismos, diversos complejos enzimáticos generalmente funcionan según la especie o ambiente de crecimiento, y la eficiencia de captación de la energía también varía significativamente. Los carbohidratos, proteínas y ácidos alifáticos se convierten en acetil-CoA en la glicólisis, en la  $\beta$ -oxidación y similares, y se descomponen en el ciclo del ácido cítrico. La energía conservada en forma de NADH se utiliza para la excreción de protones de las células microbianas con la ayuda de la NADH deshidrogenasa (NDH) y el posterior sistema de transferencia de electrones constituido por oxidorreductasas, y de esta manera se forma un gradiente de concentración de protones entre el interior y el exterior de la membrana citoplasmática. Este gradiente de concentración de protones se utiliza como fuerza motriz para la síntesis de adenosina trifosfato (ATP). En la actualidad existe una ruta que muestra una capacidad de elevada excreción de protones y una ruta que muestra una capacidad de excreción baja de protones entre las rutas de transferencia de electrones, dependiendo de la combinación de NDH y oxidorreductasas. Se considera que una ruta con capacidad elevada de excreción de protones muestra una eficiencia energética elevada y que una ruta de capacidad baja de excreción de protones muestra una eficiencia energética baja. De esta manera, un tipo de microorganismo contiene simultáneamente una pluralidad de rutas respiratorias de cadena de transferencia de electrones en paralelo, y entre estas rutas se incluyen las de eficiencia energética elevada y las de baja eficiencia energética.

20 Existen dos tipos de NDH y dos tipos de oxidasas terminales en la cadena respiratoria de *Escherichia coli* para un estado aeróbico. Es decir, respecto a NDH, son conocidos NDH-1 (codificada por el operón *nuo*) de eficiencia energética elevada, y NDH-II (codificado por *ndh*) de eficiencia energética baja. Además, respecto a la oxidasa terminal, es conocida la citocromo oxidasa tipo bo (codificada por el operón *cyoABCD*), clasificada en tipo SoxM (Castresana, J. y Saraste, M., Trends in Biochem. Sci. 20:443-448, 1995) y que muestra eficiencia energética elevada, y la citocromo oxidasa tipo bd (codificada por *cydAB*), que muestra una eficiencia energética baja. Aunque es conocido que las cantidades de expresión de estos enzimas de cadena respiratoria varían en respuesta al ambiente de crecimiento (Minagawa *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 265:11198-11203, 1990; Tseng *et al.*, Journal of Bacteriology 178:1094-1098, 1996; Green *et al.*, Molecular Microbiology 12:433-444, 1994; Bongaerts *et al.*, Molecular Microbiology 16:521-534, 1995), todavía existen muchos aspectos desconocidos sobre el significado fisiológico de los patrones de expresión de los mismos.

25 Además, en *Corynebacterium glutamicum* existe un complejo citocromo bc1 y se ha confirmado la presencia de por lo menos dos tipos de oxidasa terminal: la oxidasa de tipo SoxM y la citocromo oxidasa de tipo bd (The Second Symposium Concerning Metabolic Engineering, Lecture Abstracts, 1999). Lo expuesto anteriormente demuestra que la ruta de transferencia de electrones desde el reservorio de quinona hasta la molécula de oxígeno incluye dos tipos de ruta: una ruta que utiliza el complejo citocromo bc1 y la oxidasa de tipo SoxM, y una ruta que utiliza únicamente la citocromo oxidasa de tipo bd. Se considera que la primera es una ruta de transferencia de electrones de eficiencia energética elevada, en la que el valor de transferencia de protones para la transferencia de un electrón es reducido.

30 Respecto a la oxidasa terminal de *E. coli*, si se compara el rendimiento de crecimiento en un cultivo aeróbico de una cepa mutante que presenta únicamente la citocromo oxidasa de tipo bo, de una cepa mutante que presenta únicamente la citocromo oxidasa de tipo bd y de una cepa salvaje que presenta ambas, el rendimiento de crecimiento es más bajo en la cepa mutante que presenta únicamente la citocromo oxidasa de tipo bd, y depende del tipo y eficiencia de captación energética de la oxidasa terminal (Annual Meeting of the Society for fermentation and Bioengineering Japón, 1995, Lecture Abstracts, nº 357).

35 Además, se ha informado de la eficiencia energética de mutantes deficientes en algunos enzimas de la cadena respiratoria (Calhoun *et al.*, Journal of Bacteriology 175:3020-3925, 1993).

40 Sin embargo, no se ha informado de cambios de la eficiencia energética mediante amplificación de un gen de la cadena respiratoria que proporciona eficiencia elevada, tal como aquellos para la oxidasa de tipo NDH-I y de tipo SoxM, e incluso no se conocen intentos para la utilización del mismo en la producción de sustancias. Además, no se han realizado intentos para utilizar la delección de un enzima de cadena respiratoria de eficiencia baja, tal como NDH-II y la citocromo oxidasa de tipo bd, en la producción de sustancias.

## Sumario de la invención

Se requiere energía para la biosíntesis de sustancias, tales como L-aminoácidos y ácidos nucleicos en seres vivos. La mayor parte de la energía utilizada consta de poder reductor de NDH, NADPH y similares, y de la energía conservada en forma de ATP. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención se ha concebido que, si se incrementa el suministro de energía utilizado en la producción de sustancias diana en los procedimientos para producir sustancias diana mediante la utilización de microorganismos, se mejoraría la productividad de las sustancias diana. Basándose en este concepto, un objetivo de la presente invención es concebir un microorganismo que muestre una eficiencia energética mejorada y proporcionar un procedimiento para producir una sustancia diana mediante la utilización del mismo.

En el contexto de la presente invención se ha concebido que podría construirse un microorganismo que muestre un suministro energético incrementado, aumentando una ruta de cadena respiratoria que muestre una eficiencia elevada de captación energética o haciendo deficiente la ruta de cadena respiratoria que muestra una eficiencia baja de captación energética. Específicamente, respecto a *E. coli*, se prepararon cepas que se considera que presentan una eficiencia energética mejorada, mediante la amplificación de un gen codificante de una citocromo oxidasa de tipo bo a modo de enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada, o delecionando un gen codificante de NDH-II a modo de enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética baja. A continuación, se llevó a cabo la producción de L-aminoácidos mediante la utilización de dichas cepas y se encontró que la productividad de los L-aminoácidos se encontraba mejorada en las cepas en las que se había mejorado la eficiencia energética. De esta manera se consiguió la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Un procedimiento para producir la L-lisina utilizando una *Escherichia coli* que comprende las etapas que consisten en cultivar la *Escherichia coli* en un medio para producir y acumular la L-lisina en el medio y recoger la L-lisina, en el que la *Escherichia coli* es una cepa mutante o una cepa recombinante genética en la que la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo es aumentada en comparación con la cepa sin modificar mediante el incremento del número de copias de un gen que codifica la citocromo oxidasa de tipo bo, la modificación de una secuencia reguladora de la expresión del gen, o su combinación.

(2) El procedimiento según (1), en el que dicha secuencia reguladora de la expresión es un promotor.

(3) El procedimiento según (1) o (2), en el que dicha citocromo oxidasa de tipo bo se encuentra codificada por el operón *cyo*.

Según la presente invención, puede mejorarse la productividad de la sustancia diana basándose en un principio diferente del utilizado en la estrategia convencional.

## Breve explicación de los dibujos

La figura 1 muestra la construcción del plásmido pTS- $\Delta$ ndh para producir una cepa con alteración del gen NDH-II.

La figura 2 muestra la construcción de pMAN997.

## Descripción detallada de la invención

A continuación, se explica en detalle la presente invención.

La sustancia producida mediante el procedimiento de producción de la presente invención es la L-lisina.

Un microorganismo que presenta la capacidad de producir una sustancia diana, puede ser construido a partir de una cepa parental de un microorganismo que presenta como rutas de cadena respiratoria una ruta de eficiencia energética elevada y una ruta de eficiencia energética baja, y que presenta ambas o una de las características siguientes:

(A) es aumentada la ruta de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada,

(B) la ruta de cadena respiratoria de eficiencia energética baja es deficiente.

En general, los microorganismos, incluyendo *E. coli* y las bacterias corineformes, contienen simultáneamente una pluralidad de cadenas respiratorias de transferencia de electrones en paralelo, y estas rutas incluyen las de elevado valor de transferencia de protones y las de valor reducido de transferencia de protones por electrón. En *E. coli*, por ejemplo, como donantes de electrones de NADH, existen NDHI y NDHII, que catalizan la transferencia de protones desde NADH hasta el reservorio de quinonas. Entre estos, NDHI muestra una eficiencia energética elevada y NDHII

muestra una eficiencia energética baja. Es decir, NDHII muestra un número molecular de protones que pueden excretarse con un electrón (valor de transferencia de protones) de 0, mientras que para NDHI se considera que es 2.

5 Dicha ruta que muestra un elevado valor de transferencia de protones por electrón tal como se ha descrito anteriormente, es decir una ruta de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada, puede ser aumentada, y puede hacerse deficiente una ruta de cadena respiratoria de eficiencia energética baja. La ruta de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada puede aumentarse aumentando la actividad de un enzima de la cadena respiratoria implicado en la ruta de cadena respiratoria. La ruta de cadena respiratoria de eficiencia energética baja puede hacerse deficiente reduciendo o eliminando la actividad de un enzima de la cadena respiratoria implicado en la ruta de la cadena respiratoria.

10 El enzima de cadena respiratoria implicado en una ruta de cadena respiratoria no se encuentra particularmente limitado con la condición de que sea un enzima que forme parte de la ruta de cadena respiratoria. Específicamente, entre los ejemplos de la misma se incluyen deshidrogenasas que catalizan la transferencia de electrones de un donante de electrones hasta el reservorio de quinonas, tales como la ubiquinona, la desmetilmenaquinona y la menaquinona, y oxidasas que catalizan la transferencia de electrones desde el reservorio de quinonas hasta un donante de electrones.

15 Las oxidasas que catalizan una reacción que produce una molécula de agua mediante transferencia de electrones desde un reservorio de quinonas se clasifican en tipo SoxM (tipo bo) y tipo bd. El valor de transferencia de protones de las oxidasas de tipo bo es 2, mientras que para las de tipo bd es 1. Por lo tanto, el tipo bo muestra una eficiencia energética más elevada.

20 En la presente invención, los términos "alto" y "bajo" utilizados para la eficiencia energética no se utilizan con significados absolutos, sino que se utilizan para referirse a conceptos relativos, tales como los descritos anteriormente.

25 En el procedimiento de la presente invención, es aumentada la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo.

30 Se explicarán a continuación en la presente memoria unos medios para aumentar la actividad de un enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada, y unos medios para reducir o eliminar la actividad de un enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética baja.

35 Con el fin de aumentar la actividad de un enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada, por ejemplo puede prepararse un ADN recombinante mediante ligación de un fragmento génico codificante del enzima, con un vector que funcione en una célula de microorganismo, preferentemente un vector de tipo multicopia, e introducirse en el microorganismo para transformar la célula. De esta manera se incrementa el número de copia del gen codificante del enzima en la célula de la cepa transformante y, como resultado, se amplifica la actividad enzimática. Este procedimiento se explica a continuación en la presente memoria mediante el ejemplo del operón *cyo* (*cyoABCDE*) codificante de una citocromo oxidasa de tipo bo como gen de enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada.

40 La secuencia del operón *cyo* de *E. coli* ya ha sido informada (Chepuri *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 265:11185-11192, 1990) y por lo tanto el operón puede clonarse basándose en dicha secuencia. También resulta posible utilizar un gen de bacteria perteneciente al género *Escherichia*, o un gen derivado de otros organismos, tales como bacterias corineformes, como el operón *cyo*.

45 Como vector utilizado para la clonación del gen y la introducción del mismo en un microorganismo, puede utilizarse, por ejemplo, un plásmido de replicación autónoma en células de *E. coli*. Entre los ejemplos específicos del mismo se incluyen pUC19, pUC18, pBR322, pHSG299, pHSG298, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pSTV29 y similares. Para la introducción del gen en bacterias corineformes, preferentemente puede utilizarse un vector lanzadera de replicación autónoma en bacterias corineformes y en *E. coli*. A continuación se mencionan ejemplos de plásmidos de replicación autónoma en bacterias corineformes.

50 pAM330 (ver la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) nº 58-67699),

pHM1519 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 58-77895),

pAJ655 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 58-192900),

60 pAJ611 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 58-192900),

pAJ1844 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 58-192900),

65 pCG1 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 57-134500),

pCG2 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 58-35197),

pCG4 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 57-183799),

5 pCG11 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 57-183799),

pHK4 (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 5-7491).

10 Con el fin de ligar un fragmento de ADN que contiene el operón *cyo* y un vector para formar un ADN recombinante, en primer lugar el vector se digiere con un enzima de restricción adecuado para los extremos del operón *cyo*. La ligación habitualmente se lleva a cabo mediante la utilización de una ligasa, tal como la ADN ligasa de T4.

15 Para introducir el ADN recombinante preparado tal como se ha descrito anteriormente en un microorganismo, puede utilizarse cualquier procedimiento de transformación conocido. Por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento para tratar las células receptoras con cloruro de calcio de manera que se incremente la permeabilidad del ADN, que se ha informado para *E. coli* K-12 (Mandel, M. e Higa, A., J. Mol. Biol. 53:159, 1970); y un procedimiento para preparar células competentes a partir de células que se encuentran en la etapa de crecimiento, seguido de la introducción del ADN en las mismas, que se ha informado para *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H., Wilson, G.A. y Young, F.E., Gene 1:153, 1977). Además de dichos procedimientos, también puede utilizarse un procedimiento para convertir células receptoras de ADN en protoplastos o esferoplastos, que pueden incorporar fácilmente ADN recombinante, seguido de la introducción del ADN recombinante en las células; procedimiento que es conocido que resulta aplicable a *Bacillus subtilis*, a actinomicetes y a levaduras (Chang, S. y Choen, S.N., Molec. Gen. Genet. 168:111, 1979; Bibb, M.J., Ward, J.M. y Hopwood, O.A., Nature 274:398, 1978; Hinnen, A., Hicks, J.B. y Fink, G.R., Proc. Natl. Sci. USA 75:1929, 1978). La transformación de bacterias corineformes puede conseguirse mediante el procedimiento de pulso eléctrico (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 2-207791).

20 La amplificación de la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo también puede conseguirse permitiendo la existencia de múltiples copias del operón *cyo* en ADN cromosómico del huésped. Con el fin de introducir múltiples copias del operón *cyo* en el ADN cromosómico de un microorganismo, tal como una bacteria perteneciente al género *Escherichia* y bacterias corineformes, se lleva a cabo recombinación homóloga mediante la utilización de una secuencia, de la que existen múltiples copias en el ADN cromosómico como dianas. Como secuencias de las que existen múltiples copias en el ADN cromosómico puede utilizarse ADN repetitivo o repeticiones invertidas en el extremo del elemento transponible. Además, tal como se da a conocer en la publicación de patente japonesa no examinada nº 2-109985, también resulta posible incorporar el operón *cyo* en el transposón, permitiendo la transferencia del mismo para introducir múltiples copias del operón *cyo* en el ADN cromosómico. Mediante cualquiera de los procedimientos se incrementa el número de copias del operón *cyo* dentro de las células de la cepa transformante, y como resultado, es aumentada la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo.

30 El aumento de la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo también puede conseguirse, además de basándose en la amplificación génica mencionada anteriormente, en la sustitución de una secuencia reguladora de la expresión del operón *cyo*, tal como un promotor, por uno más fuerte (ver la publicación de patente japonesa no examinada nº 1-215280). Por ejemplo, se conocen como promotores fuertes el promotor *lac*, el promotor *trp*, el promotor *trc*, el promotor *tac*, el promotor  $P_R$  y el promotor  $P_L$  del fago lambda, el promotor *cyo*, el promotor *tet*, el promotor *amyE* y similares. La sustitución de estos promotores aumenta la expresión del operón *cyo* y por lo tanto se incrementa la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo. El incremento de una secuencia reguladora de la expresión puede combinarse con el incremento del número de copia del operón *cyo*.

35 El aumento de la actividad de un enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada también puede conseguirse mediante la introducción de una mutación que permita incrementar la actividad intracelular del enzima mediante un tratamiento de mutagénesis del microorganismo. Los ejemplos de dicha mutación comprenden las mutaciones de la región de codificación que incrementa la actividad específica del enzima, las mutaciones en las secuencias reguladoras de la expresión que incrementan la cantidad de expresión del gen, etc. Como tratamiento de mutagénesis, pueden mencionarse los procedimientos que utilizan el tratamiento por irradiación ultravioleta o el tratamiento con un agente de mutagénesis utilizado habitualmente para el tratamiento de mutación tal como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y el ácido nitroso.

40 Según el procedimiento de la presente invención, la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo es aumentada mediante el incremento del número de copias de un gen que codifica la citocromo oxidasa de tipo bo, la modificación de una secuencia reguladora de la expresión del gen, o su combinación.

45 Con el fin de reducir o eliminar la actividad de un enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética baja, es introducida una mutación en el gen del enzima de manera que la actividad intracelular del enzima debería ser reducida o eliminada, o resulta alterado el gen en el cromosoma del microorganismo de manera que el gen no debería funcionar de manera normal. A continuación se expone el procedimiento de alteración del gen *ndh* mediante la ejemplificación el *ndh* que codifica NDH-II como un gen de un enzima de cadena respiratoria de eficiencia energética baja.

Se ha informado de la secuencia de *ndh* de *E. coli* anteriormente (Young *et al.*, European Journal of Biochemistry 116:165-170, 1981) y por lo tanto el gen puede clonarse basándose en la secuencia. También resulta posible utilizar un gen de una bacteria perteneciente al género *Escherichia*, o un gen derivado de otros organismos, tales como bacterias corineformes, como el gen *ndh*.

Puede alterarse un gen *ndh* en un cromosoma mediante la transformación de un microorganismo con ADN que contenga un gen *ndh* modificado con una delección interna de manera que no produzca funcionalidad NDH-II normalmente (gen *ndh* de tipo delección), y que permita la recombinación entre el gen *ndh* de tipo delección y el gen *ndh* en el cromosoma. Este tipo de destrucción génica mediante recombinación homóloga ya ha sido establecido y existen procedimientos que utilizan un ADN lineal, un plásmido que contiene una región de control de replicación sensible a la temperatura, etc.

Puede sustituirse un gen *ndh* en el cromosoma del huésped por el gen *ndh* de tipo delección, de la manera siguiente. En primer lugar se prepara ADN recombinante mediante la inserción de una región de control de la replicación sensible a la temperatura, un gen *ndh* de tipo delección y un gen marcador para resistencia a un fármaco, ADN recombinante con el que se transforma un microorganismo. Además, la cepa transformante resultante se cultiva a una temperatura a la que no funciona la región de control de la replicación sensible a la temperatura, y después la cepa transformante puede cultivarse en un medio que contiene el fármaco para obtener una cepa transformante en la que se incorpora el ADN recombinante en el ADN cromosómico.

En dicha cepa en la que se ha incorporado ADN recombinante en el ADN cromosómico, se recombina el gen *ndh* de tipo delección con el gen *ndh* originalmente presente en el cromosoma, y los dos genes de fusión del gen *ndh* cromosómico y el gen *ndh* de tipo delección se insertan en el cromosoma de manera que las demás partes del ADN recombinante (segmento de vector, región de control de la replicación sensible a la temperatura y marcador de resistencia a fármaco) deban encontrarse presentes entre los dos genes de fusión. Por lo tanto, el transformante expresa NDH-II debido a que el gen *ndh* normal es dominante en este estado.

A continuación, con el fin de dejar únicamente el gen *ndh* de tipo delección en el ADN cromosómico, una copia del gen *ndh* conjuntamente con el segmento de vector (incluyendo la región de control de la replicación sensible a la temperatura y el marcador de resistencia a fármaco) procedente del ADN cromosómico se eliminan mediante recombinación de los dos genes *ndh*. En este caso, se deja el gen *ndh* normal en el ADN cromosómico y se extrae el gen *ndh* de tipo delección del ADN cromosómico, o a la inversa, el gen *ndh* normal se extrae del ADN cromosómico. En ambos casos el ADN extraído puede conservarse en la célula en forma de plásmido al cultivar la célula a una temperatura a la que pueda funcionar la región de control de replicación sensible a la temperatura. Posteriormente la célula se cultiva a una temperatura a la que no pueda funcionar la región de control de replicación sensible a la temperatura, para perder el plásmido de ADN, obteniéndose el mutante por delección del gen *ndh*.

Entre los ejemplos del vector que presenta un origen de replicación sensible a la temperatura para *E. coli* se incluyen, por ejemplo, el plásmido pMAN997, descrito en la publicación de patente internacional WO 99/03988 y similares, y entre los ejemplos de vector que presenta un origen de replicación sensible a la temperatura para bacterias corineformes se incluyen, por ejemplo, el plásmido pHSC4, dado a conocer en la publicación de patente japonesa no examinada nº 5-7491 y similares. Sin embargo, los plásmidos no se encuentran limitados a los mencionados anteriormente, y también pueden utilizarse otros vectores.

Los ejemplos específicos del tipo de microorganismo obtenido de la manera indicada anteriormente incluyen los microorganismos de los que la oxidasa de tipo SoxM o NDH-1, o ambas, se encuentran aumentadas, los microorganismos de los que la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bd o NDH-II, o las actividades de ambas son reducidas o eliminadas, y el microorganismo del que la oxidasa de tipo SoxM o NDH-1, o ambas son aumentadas y la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bd o NDH-II, o las actividades de ambas son reducidas o eliminadas. Más específicamente puede mencionarse, por ejemplo, *E. coli* en el que la actividad de la oxidasa de tipo SoxM se encuentra aumentada y es deficiente en NDH-II. Entre los ejemplos de oxidasa de tipo SoxM se incluyen la citocromo oxidasa de tipo bo.

El microorganismo utilizado para la presente invención es la *E. coli*.

Específicamente, pueden mencionarse *E. coli* AJ11442 (NRRL B-12185, FERM BP-1543) (ver la patente US nº 4.346.170) y *E. coli* W3110 (*tyrA*) (esta cepa se obtiene eliminando el plásmido pHATerm de *E. coli* W3110 (*tyrA*)/pHATerm (FERM BP-3653), ver la publicación de patente internacional WO 95/16042).

En el microorganismo utilizado para la presente invención, puede aumentarse la actividad de un enzima implicado en la biosíntesis de la sustancia diana, es decir, la L-lisina. Además, puede reducirse o eliminarse la actividad de un enzima desventajosa para la producción de la sustancia diana, es decir, la L-lisina.

Puede producirse la sustancia diana, es decir, la L-lisina, mediante el cultivo de un microorganismo tal como el indicado anteriormente, en un medio para producir y acumular la sustancia diana en el medio, y recoger la sustancia diana.

5 El medio utilizado para la producción de sustancia diana puede ser un medio bien conocido utilizado convencionalmente, seleccionado de entre el microorganismo que debe utilizarse. Es decir, el medio puede ser un medio habitual que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, iones inorgánicos, así como otros componentes orgánicos, en caso necesario. No resulta necesario ningún medio especial para la práctica de la presente invención.

10 Como fuente de carbono, resulta posible utilizar azúcares tales como glucosa, lactosa, galactosa, fructosa o hidrolizado de almidón; alcoholes, tales como glicerol o sorbitol; ácidos orgánicos, tales como ácido fumárico, ácido cítrico o ácido succínico y similares.

15 Como fuente de nitrógeno, resulta posible utilizar sales amónicas inorgánicas, tales como sulfato amónico, cloruro amónico o fosfato amónico; nitrógeno orgánico, tal como hidrolizado de soja; gas amonio; amonio acuoso y similares.

20 Resulta deseable permitir que contenga sustancias necesarias, tales como vitamina B1, L-homoserina y L-tirosina o extracto de levadura en cantidades apropiadas como nutrientes traza orgánicos. Además de lo mencionado anteriormente, se añaden en cantidades bajas fosfato de potasio, sulfato de magnesio, ión hierro, ión manganeso y similares, en caso necesario.

25 El cultivo puede llevarse a cabo bajo condiciones bien conocidas utilizadas convencionalmente, seleccionadas según el microorganismo que deba utilizarse. Por ejemplo, el cultivo preferentemente se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas durante 16 a 120 horas. La temperatura de cultivo preferentemente se controla entre 25°C y 45°C, y el pH preferentemente se controla a valores de entre 5 y 8 durante el cultivo. Para el ajuste del pH pueden utilizarse sustancias inorgánicas u orgánicas, ácidas o alcalinas, así como gas amonio o similares.

30 Para la recolección del producto metabólico, es decir, la L-lisina, del medio después del cultivo, no resulta necesario ningún procedimiento especial para la presente invención. Es decir, la presente invención puede ponerse en práctica mediante la utilización de una combinación de técnicas de intercambio iónico, de precipitación y otras técnicas bien conocidas convencionalmente.

### 35 **Mejor modo de poner en práctica la invención**

A continuación se explica la presente invención más específicamente, haciendo referencia a los ejemplos siguientes.

#### 40 **Ejemplo 1: Clonación del gen de la citocromo oxidasa de tipo bo**

La secuencia del operón *cyo* (*cyoABCDE*) codificante de la citocromo oxidasa de tipo bo de *E. coli* ha sido informada anteriormente (Chepuri *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 265:11185-11192, 1990) y por lo tanto el operón se clonó basándose en la secuencia.

45 Específicamente, se obtuvo el gen diana del operón *cyo* a partir de la biblioteca fágica de Kohara (Kohara *et al.*, Cell 50:495-508, 1987) que contiene el operón *cyo*. Se obtuvo ADN fágico a partir del clon fágico 147[2H5] de Kohara que contiene el operón, mediante la utilización del kit Wizard lambda prep (Promega). El fago DNA 147[2H5] obtenido se digirió con PshBI, y se crearon extremos romos en el fragmento de 5,5 kb obtenido que contenía el operón *cyo*, y se insertó en el sitio SmaI de pMW119 (Nippon Gene) para clonar el operón *cyo* que contenía una región promotora. En el plásmido obtenido, se insertó el operón *cyo* en la dirección reversa con respecto al promotor del operón lactosa en pMW119. Este plásmido se denominó pMW(CYO)B.

50 Se introdujo el plásmido pMW(CYO)B en la cepa W3110 de *E. coli* (obtenida del National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka, Japón), obteniendo W3110/pMW(CYO)B. Se midió la actividad de ubiquinol oxidasa presente en extractos celulares de las cepas W3110 y W3110/pMW(CYO)B como actividad de oxidasa terminal mediante la utilización de un procedimiento conocido (Kita *et al.*, The Journal of Biological Chemistry 259:3368-3374, 1984). Se muestran los resultados en la Tabla 1.

60 Tabla 1: actividad de ubiquinol oxidasa

Cepa	Actividad de ubiquinol oxidasa (mmoles/min/mg de proteína)
W3110/pMW119	0,28
W3110/pMW(CYO)B	0,56

Se descubrió que la actividad de oxidasa terminal se encontraba aumentada en la cepa en la que se había introducido pMW(CYO)B, tal como se muestra en la Tabla 1. Este aumento de la actividad de la oxidasa terminal se

considera que está causado por el aumento de la actividad de citocromo oxidasa de tipo bo mediante el aumento del operón *cyo*.

## Ejemplo 2: Adquisición de la cepa deficiente en NDH-II

### (No está comprendido en el alcance de la presente invención)

Con el fin de producir una cepa deficiente en NDH-II, se preparó una secuencia internamente cortada de NDH-II (gen NDH-II de tipo alterado). La secuencia parcial de NDH-II se clonó basándose en la secuencia conocida del gen *ndh* codificante de NDH-II de *E. coli* (Young *et al.*, European Journal of Biochemistry 116:165-170, 1981).

Específicamente, el gen NDH-II de tipo alterado se produjo de la manera siguiente (fig. 1). En primer lugar, se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,4 kb que contenía la secuencia parcial de NDH-II a partir de ADN cromosómico de *E. coli* mediante PCR utilizando *ndh-1* (SEC ID nº 1) y *ndh-2* (SEC ID nº 2) como cebadores. Este fragmento se clonó en el vector pGEM-T (Promega) para obtener pGEM-*ndh*. Se digirió pGEM-*ndh* con los enzimas de restricción EcoRI y *StuI*, y se recogió el fragmento de ADN de 0,5 kb obtenido y se ligó a pTWV229 (Takara Shuzo) digerido con EcoRI y *StuI*, obteniendo pTWV-*ndh*.

A continuación, se digirió pGEM-*ndh* con el enzima de restricción *StuI* y el fragmento de ADN obtenido de 0,9 kb se recogió y se insertó en el sitio *HincII* de pTWV-*ndh*. De esta manera, se obtuvo pTWV $\Delta$ *ndh* que contenía una parte de los sitios de multiclonación de pTWV229 en la secuencia parcial de *ndh*. El plásmido pTWV $\Delta$ *ndh* contenía la secuencia *ndh* insertada con una secuencia de 17 pb derivada de pTWV229 en el sitio *StuI* en la secuencia de *ndh*. Posteriormente, se insertó un fragmento de 1,5 kb obtenido mediante digestión de pTWV $\Delta$ *ndh* con HindIII y EcoRI entre los sitios HindIII y EcoRI del plásmido sensible a la temperatura pMAN997 (ver la publicación de patente internacional WO 99/03988), obteniendo pTS- $\Delta$ *ndh*. Se llevó a cabo la recombinación homóloga entre el plásmido pTS- $\Delta$ *ndh* y el genoma de la cepa W3110 para *ndh* mediante una técnica habitual de recombinación homóloga utilizando la sensibilidad térmica de pTS- $\Delta$ *ndh* (Matuyama *et al.*, Journal of Bacteriology 162:1196, 1985), obteniendo una cepa W3110(*ndh*) que no expresaba proteína NDH-II normal debido a que la secuencia de 17 pb derivada de pTWV229 se encontraba insertada en la región codificante de *ndh* en el genoma. A partir de W3110(*tyrA*), se introdujo la deficiencia de *tyrA* en la cepa W3110(*ndh*) mediante transducción P1 utilizando resistencia a la tetraciclina como marcador, obteniendo una cepa W3110(*ndh, tyrA*).

El plásmido pMAN997 mencionado anteriormente se obtuvo mediante el intercambio de los fragmentos *Vspl-HindIII* de pMAN031 (J. Bacteriol. 162:1196, 1985) y pUC19 (Takara Shuzo) (fig. 2).

Además, aunque la cepa W3110(*tyrA*) se detalle en la publicación de patente europea no examinada nº 488424/1992, el procedimiento de preparación de la misma se explica brevemente a continuación.

Se obtuvo la cepa W3110 de *E. coli* del National Institute of Genetics (Mishima, Shizuoka). Se sembró esta cepa en una placa LB que contenía estreptomina, y se seleccionó la cepa que formó una colonia, obteniendo una cepa resistente a la estreptomina. Se combinaron la cepa resistente a la estreptomina seleccionada y la cepa *E. coli* K-12 ME8424, y se cultivaron en un medio completo (caldo L: Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 0,5%) a 37°C durante 15 minutos en forma de cultivo estacionario para inducir la conjugación. La cepa *E. coli* K-12 ME8424 presenta las características genéticas siguientes: (*HfrPO45, thi, relA1, tyrA::Tn10, ung-1, nadB*) y puede obtenerse del National Institute of Genetics. Después, se sembró el cultivo en un medio completo (caldo L: Bacto-triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 0,5%, ágar al 1,5%) que contenía estreptomina, tetraciclina y L-tirosina, y se seleccionó la cepa que formó colonias. Esta cepa se diseñó como cepa *E. coli* W3110(*tyrA*).

La publicación de patente europea no examinada nº 488424/1992 da a conocer muchas cepas obtenidas mediante la introducción de un plásmido en la cepa anteriormente indicada. Por ejemplo, se diseñó una cepa obtenida mediante la introducción del plásmido pHATerm como *E. coli* W3110(*tyrA*)/pHATerm, depositada el 16 de noviembre de 1991 en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (1-3 Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón, código postal: 305) (en la actualidad, la corporación administrativa independiente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, depositario de organismos de patente internacional (Chuo Dai-6, 1-1 Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón, código postal: 305-5466) como depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, y recibió el número de acceso FERM BP-3653. La cepa *E. coli* W3110(*tyrA*) puede obtenerse mediante la eliminación del plásmido pHATerm de la cepa anteriormente indicada de una manera convencional.

## Ejemplo 3: Producción de L-lisina

Se introdujo el plásmido pMW(CYO)B obtenido en el Ejemplo 1 en la cepa W3110(*tyrA*) y en la cepa W3110(*ndh, tyrA*) obtenida en el Ejemplo 2, con el fin de obtener W3110(*tyrA*)/pMW(CYO)B y W3110(*ndh, tyrA*)/pMW(CYO)B, respectivamente. De manera similar, se introdujo pMW119 en W3110(*tyrA*), obteniendo la cepa W3110(*tyrA*)/pMW119. Se evaluó la productividad de L-lisina de dichas cepas W3110(*tyrA*)/pMW(CYO)B, W3110(*ndh, tyrA*)/pMW(CYO)B y W3110(*tyrA*)/pMW119 como control, mediante cultivo en matraz. El cultivo se llevó



a cabo mediante la utilización de un medio que presentaba la composición siguiente a 37°C durante 24 a 48 horas bajo agitación. Se muestran los resultados en la Tabla 2.

(Composición del medio)	
Glucosa	40 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
Extracto de levadura (Difco)	2 g/l
L-tirosina	0,1 g/l o 0,05 g/l

- 5 Se ajustó el pH del medio a 7,0 con KOH y se sometió a autoclave a 115°C durante 10 minutos. Sin embargo, se esterilizaron separadamente la glucosa y el MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Además, antes del cultivo se añadieron al medio 30 g/l de CaCO<sub>3</sub> según la Farmacopea Japonesa, que se sometió a esterilización seca a 180°C, y 100 µg/l del antibiótico ampicilina.

10 Tabla 2: cantidades producidas de L-lisina

Cepa	L-lys (g/l)
W3110( <i>tyrA</i> )/pMW119	0,29
W3110( <i>tyrA</i> )/pMW(CYO)B	0,48
W3110( <i>ndh, tyrA</i> )/pMW(CYO)B	0,53

- 15 Se descubrió que la productividad de L-lisina mejoraba en *E. coli* productor de L-lisina aumentando la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo. Se consideró que lo expuesto anteriormente estaba causado por el aumento de la eficiencia de captación energética debido a la potenciación de la ruta de cadena respiratoria de eficiencia energética elevada, y la energía se utilizó para la producción de L-lisina.

- 20 También se descubrió que se mejoraba además la productividad de L-lisina en *E. coli* productor de L-lisina haciendo que fuera deficiente en NDH-II. Lo expuesto anteriormente se consideró que estaba causado por la mejora de la eficiencia de captación energética debido a la deficiencia de la ruta de cadena respiratoria de la eficiencia energética baja, y se utilizó la energía para la producción de L-lisina.

#### Ejemplo 4: Producción de L-treonina

- 25 **(No está comprendido en el alcance de la presente invención)**

- 30 Se introdujo el plásmido pMW(CYO)B obtenido mediante el procedimiento mencionado anteriormente en una bacteria productora de L-treonina, *E. coli* VKPM B-3996 (RIA 1867) (ver la patente US nº 5.175.107, en adelante denominada cepa "B-3996"), obteniendo la cepa B-3996/pMW(CYO)B. La cepa B-3996 alojaba un plásmido pVIC40 (publicación de patente internacional WO 90/04636) obtenida mediante la inserción del operón treonina en un vector plásmido pAYC32 de amplio rango de huésped que contenía un marcador de resistencia a la estreptomicina (ver Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.D., Plasmid 16:161-167, 1986). La cepa B-3996 se encuentra depositada en el USSR Antibiotics Research Institute (VNIIA) bajo el número de registro RIA1867.

- 35 Como control se obtuvo B-3996/pMW119 mediante la introducción de pMW119 en B-3996. Se evaluó la productividad de L-treonina en B-3996/pMW(CYO)B y en B-3996/pMW119 mediante cultivo en matraz. Se llevó a cabo el cultivo mediante la utilización de un medio que presentaba la composición mencionada en la Tabla 3, a una temperatura de 37°C durante 38 horas bajo agitación a 114-116 rpm. Los componentes A, B y C mencionados en la Tabla 3 se prepararon y esterilizaron separadamente y después se enfriaron y se mezclaron en una proporción de 16/20 de componente A, 4/20 de componente B y 30 g/l de componente C. Se muestran los resultados en la Tabla 4.
- 40

Tabla 3: medio de producción de treonina

A	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	16 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,01 g/l
	Extracto de levadura (Difco)	2 g/l
	L-isoleucina	50 mg/l
	Ácido nicotínico	10 mg/l
	Se ajustó a pH 7,0 con KOH y se autoclavó a 115°C durante 10 minutos (16/20 del volumen)	
B	20% de glucosa autoclavado a 115°C durante 10 minutos (4/20 del volumen)	
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g/l
C	CaCO <sub>3</sub> según la Farmacopea Japonesa, sometido a esterilización seca a 180°C (30 g/l).	
	Antibiótico (100 µg/l de estreptomina y 5 µg/l de canamicina)	

Tabla 4: cantidades producidas de L-treonina

Cepa	L-Thr (g/l)
B-3996/pMW119	13,1
B-3996/pMW(CYO)B	14,3

Se descubrió que la productividad de L-treonina de *E. coli* productor de L-treonina podía mejorarse aumentando la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo.

#### 10 Ejemplo 5: Producción de L-fenilalanina

(No está comprendido en el alcance de la presente invención)

Se recogió un plásmido pACMAB de la cepa *E. coli* W3110(*tyrA*)/pACMAB, pBR-aroG4 según un procedimiento habitual de purificación para el plásmido. El plásmido era un plásmido obtenido mediante la inserción de un fragmento de ADN que contiene un gen para la corismato mutasa de tipo desensibilizado/prefenato deshidratasa (CM-PDH) en el sistema de biosíntesis de L-fenilalanina correcto entre los sitios de corte BamHI y HindIII del vector plásmido pACYC184 (Ap<sup>r</sup>) (ver la publicación de patente internacional WO 97/08333). La cepa W3110(*tyrA*)/pACMAB, pBR-aroG4 (denominada AJ12604) se depositó el 28 de enero de 1991 en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (1-3 Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón, código postal: 305) y recibió el número de acceso FERM P-11975. A continuación, se transfirió a un depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest el 26 de septiembre de 1996, y recibió el número de acceso FERM BP-3579.

Se crearon extremos romos en el plásmido pACMAB mediante digestión con Sall. En éste se insertó un fragmento de ADN de extremos romos que contenía el operón *cyo* de 5,5 kb, que se obtuvo a partir del fago DNA 147[2H5] anteriormente indicado de Kohara mediante digestión con PshBI. Se introdujo el plásmido pACMAB-*cyo* obtenido en W3110(*tyrA*/pBR-aroG4). La cepa transformante obtenido se cultivo en un medio para la producción de L-fenilalanina (que contenía 20 g de glucosa, 29,4 g de hidrogenofosfato disódico, 6 g de dihidrogenofosfato potásico, 1 g de cloruro sódico, 2 g de cloruro amónico, 10 g de citrato sódico, 0,4 g de glutamato sódico, 3 g de sulfato de magnesio heptahidrato, 0,23 g de cloruro de calcio, 2 mg de hidrocloreuro de tiamina y 100 mg de L-tirosina en 1 litro de agua, pH 7,0) a 37°C durante 40 horas. Se cuantificó la L-fenilalanina contenida en el medio mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Se muestran los resultados en la Tabla 5.

Tabla 5: cantidades producidas de L-fenilalanina

Cepa	L-Phe (g/l)
W3110( <i>tyrA</i> )/pACMAB, pBR-aroG4	3,9
W3110( <i>tyrA</i> )/pACMAB- <i>cyo</i> , pBR-aroG4	4,2

Se descubrió que la productividad de L-fenilalanina de *E. coli* productor de L-fenilalanina se mejoraba aumentando la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo.

**Listado de secuencias**

<110> Ajinomoto Co., Inc.

5 <120> Procedimiento para producir L-lisina que utiliza microorganismos

<130> EPA-64695

<150> JP 2000-204252

10 <151> 2000-07-05

<160> 2

<170> PatentIn ver. 2.0

15 <210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar el gen NDH-II (ndh-1)

<400> 1

25 cgatggaagc ttccgcgatt atggg 25

<210> 2

<211> 27

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador para amplificar el gen NDH-II (ndh-2)

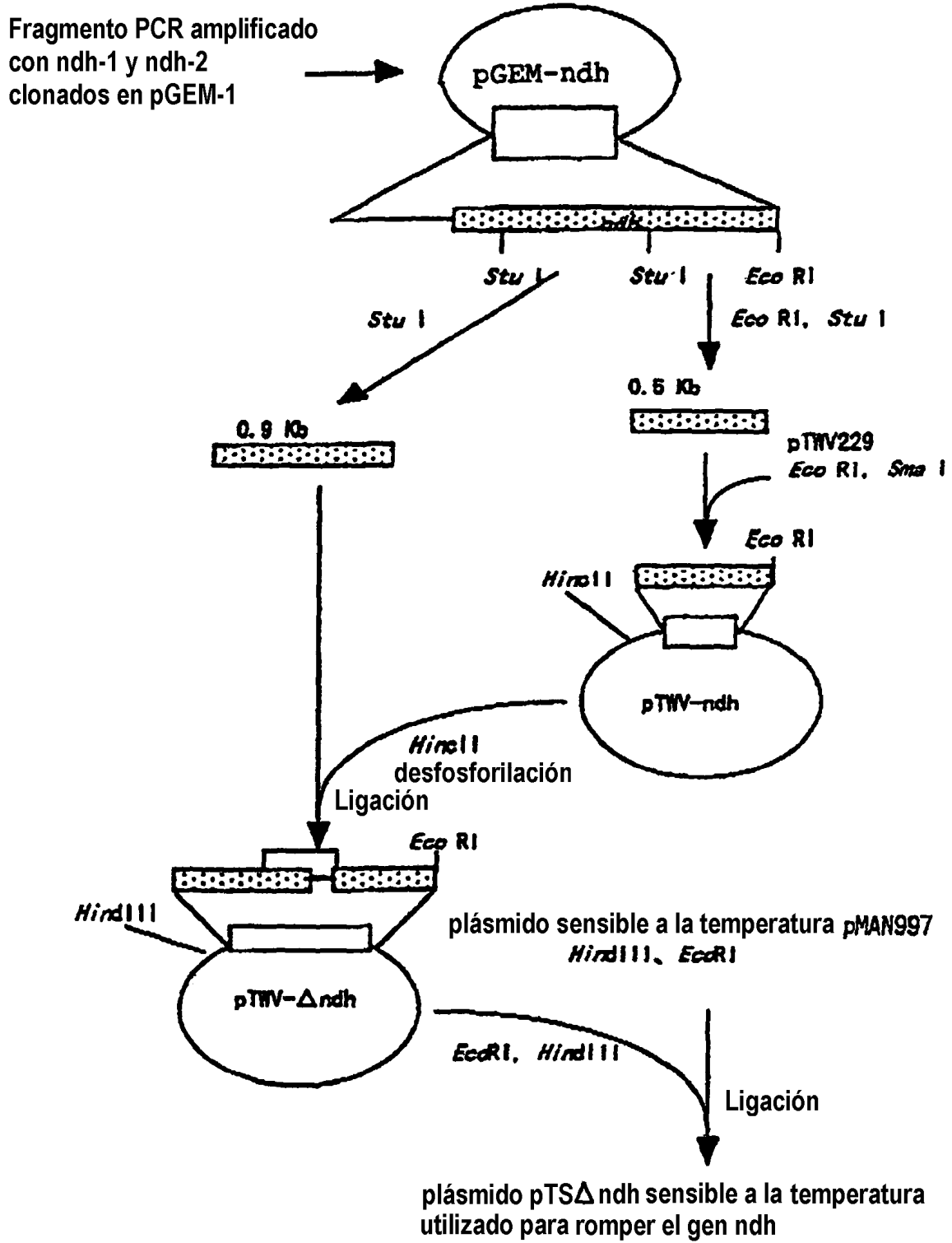
35 <400> 2

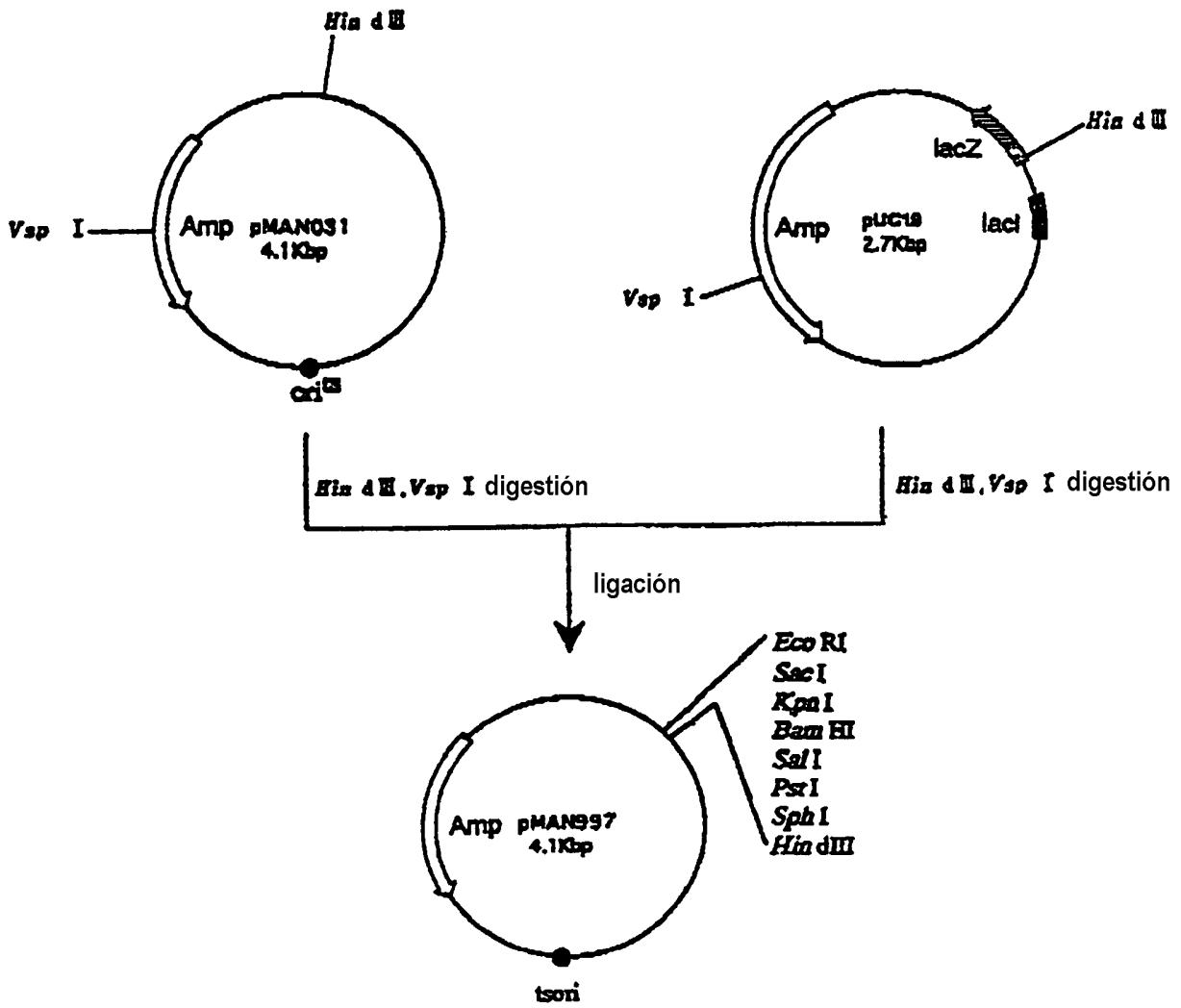
aagcgcgaa ttgctcttc aatcatc 27

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento para producir L-lisina que utiliza una *Escherichia coli* que comprende las etapas que consisten en cultivar la *Escherichia coli* en un medio para producir y acumular la L-lisina en el medio y recoger la L-lisina, en el que la *Escherichia coli* es una cepa mutante o una cepa recombinante genética en la que la actividad de la citocromo oxidasa de tipo bo es aumentada en comparación con la cepa sin modificar mediante el incremento del número de copias de un gen que codifica la citocromo oxidasa de tipo bo, la modificación de una secuencia reguladora de la expresión del gen, o su combinación.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia reguladora de la expresión es un promotor.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha citocromo oxidasa de tipo bo se encuentra codificada por el operón cyo.

Fig. 1





*Fig. 2*