

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 290**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**C12P 13/04** (2006.01)

**C12P 13/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05757370 .1**

96 Fecha de presentación: **05.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1776451**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE L-AMINOÁCIDOS MEDIANDO UTILIZACIÓN DE CEPAS DE LA FAMILIA DE LAS ENTEROBACTERIÁCEAS.**

30 Prioridad:  
**03.08.2004 DE 102004037572**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.01.2012**

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

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

74 Agente: **Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 372 290 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 L-aminoácidos mediante utilización de cepas de la familia de las enterobacteriáceas

5 Este invento se refiere a un procedimiento para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-treonina, mediante utilización de microorganismos recombinantes de la familia de las enterobacteriáceas, en las que el gen lamB o las secuencias de nucleótidos, que codifican su producto génico maltoporina, es/son reforzado/as, en particular sobreexpresado/as, y a estos microorganismos.

10 **Estado de la técnica**

Los L-aminoácidos, en particular la L-treonina, encuentran aplicación en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y muy especialmente en la nutrición de animales.

15 Es conocido que ciertos L-aminoácidos se producen mediante fermentación de cepas de las enterobacteriáceas, en particular de Escherichia coli (E. coli) y Serratia marcescens. A causa de la gran importancia, se está trabajando constantemente en el mejoramiento de los procedimientos de producción. Ciertos mejoramientos de los procedimientos pueden concernir a medidas técnicas de fermentación, tales como p.ej. una agitación y un abastecimiento con oxígeno, o a la composición de los medios nutritivos, tal como p.ej. la concentración de azúcares durante la fermentación, o al tratamiento para dar la forma del producto, mediante p.ej. una cromatografía con intercambio de iones, o a las propiedades intrínsecas de rendimiento del microorganismo propiamente dicho.

20 Para el mejoramiento de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos se utilizan unos métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. De esta manera se obtienen unas cepas, que son resistentes frente a antimetabolitos tales como p.ej. el compuesto análogo a treonina ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivaleriánico (AHV) o que son auxótrofos para unos metabolitos importantes en regulación y producen L-aminoácidos tales como p.ej. L-treonina.

30 Desde hace algunos años se emplean asimismo unos métodos de la técnica de ADN recombinante para el mejoramiento de las cepas de la familia de las enterobacteriáceas, que producen L-aminoácidos, mediante el recurso de que se amplifican unos genes individuales para la biosíntesis de aminoácidos, y se investiga la repercusión sobre la producción. Unas informaciones recopilativas sobre la biología celular y molecular de Escherichia coli y Salmonella se pueden encontrar en la cita de Neidhardt (coordinador de edición): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology (Escherichia coli y Salmonella, biología celular y molecular), 2ª edición, ASM Press, Washington, D.C., EE.UU, (1996).

35 **Misión del invento**

40 Los autores del invento se han planteado la misión de poner a disposición nuevas medidas técnicas para la producción por fermentación mejorada de L-aminoácidos, en particular de L-treonina.

**Descripción del invento**

45 Son objeto del invento unos microorganismos recombinantes de la familia de las enterobacteriáceas, que contienen un gen lamB reforzado o sobreexpresado, que codifica un polipéptido con la actividad de la maltoporina LamB, y que producen de un modo mejorado L-aminoácidos, en particular L-treonina.

50 Como punto de partida para la comparación sirven en cada caso los microorganismos no recombinantes, que no contienen ningún gen lamB reforzado.

A estos microorganismos pertenecen en particular unos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, en los que se refuerza un polinucleótido, que codifica un polipéptido, que es idéntico por lo menos en un 90 %, en particular por lo menos en un 95 %, de manera preferida en un 99 %, a una secuencia de aminoácidos, que se escoge entre el conjunto que se compone de las SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 y SEQ ID No. 8, poseyendo el polipéptido la actividad de la maltoporina LamB.

55 Se prefieren unas secuencias de aminoácidos, que son idénticas a las de las SEQ ID No.4, SEQ ID No. 6 o SEQ ID No. 8.

60 Los mencionados microorganismos contienen unos polinucleótidos reforzados o sobreexpresados, que se escogen entre el conjunto que se compone de:

- a) un polinucleótido con las secuencias de nucleótidos SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7;

b) un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos, que corresponde a las SEQ ID No.3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7 dentro del marco de la degeneración del código genético;

5 c) una secuencia de un polinucleótido con una secuencia, que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia complementaria a las SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7;

d) un polinucleótido con una secuencia SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7, que contiene unos mutantes con sentido, neutros en función,

10

codificando los polinucleótidos el producto génico maltoporina (véase más abajo).

Asimismo, es un objeto del invento un procedimiento para la producción por fermentación de L-aminoácidos, en particular de L-treonina, mediando utilización de microorganismos recombinantes de la familia de las enterobacteriáceas, que en particular ya producen L-aminoácidos, y en los que se refuerza o respectivamente se refuerzan por lo menos el gen lamB o unas secuencias de nucleótidos que codifican su producto génico, la maltoporina LamB.

15

De manera preferida, se emplean los microorganismos descritos.

20

Cuando en lo sucesivo se mencionan L-aminoácidos o aminoácidos, se han de entender por estos conceptos uno o varios aminoácidos inclusive sus sales, que se escogen entre el conjunto que se compone de L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-arginina y L-homoserina. Se prefiere especialmente la L-treonina.

25

El concepto de "refuerzo" describe en este contexto el aumento de la actividad o concentración intracelular en un microorganismo de una o varias enzima(s) o proteína(s), que es(son) codificada(s) por el correspondiente ADN, mediante el recurso de que, por ejemplo, se aumenta el número de copias del gen o respectivamente de los genes en por lo menos una (1) copia, se une un promotor fuerte funcionalmente con el gen o se utiliza un gen o alelo, que codifica una correspondiente enzima o respectivamente proteína con una alta actividad, y eventualmente se combinan estas medidas técnicas.

30

Mediante las medidas técnicas del refuerzo, en particular la sobreexpresión, se aumenta la actividad o concentración de la correspondiente proteína por regla general en por lo menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, como máximo en hasta un 1.000 % o 2.000 %, referida a la de la enzima de tipo silvestre o respectivamente a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo no recombinante. Por el concepto de "microorganismo no recombinante" o de la cepa parental (en inglés "parent strain") se entiende el microorganismo, en el que se llevan a cabo las medidas técnicas del invento.

35

Es objeto del invento un procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediante fermentación de microorganismos recombinantes de la familia de las enterobacteriáceas, que está caracterizado porque

40

a) los microorganismos que producen el L-aminoácido deseado, en los que se refuerza, en particular se sobreexpresa, el gen lamB o la secuencia de nucleótidos, que codifica el producto génico de éste, se cultivan en un medio en unas condiciones, en las que el L-aminoácido deseado se enriquece en el medio o en las células y,

45

b) se aísla el L-aminoácido deseado, permaneciendo en el producto aislado o siendo eliminados de una manera total eventualmente ciertos componentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa, en su totalidad o en porciones ( $\geq 0$  hasta 100 %).

50

Los microorganismos en particular recombinantes, con un gen lamB reforzado o sobreexpresado, que son asimismo un objeto del presente invento, pueden producir L-aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, eventualmente almidones, eventualmente celulosas, o a partir de glicerol y etanol. En este caso, se trata de representantes de la familia de las enterobacteriáceas, que se escogen entre el conjunto que se compone de los géneros Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia. Los géneros Escherichia y Serratia son preferidos. En el caso del género Escherichia se ha de mencionar en particular la especie Escherichia coli y en el caso del género Serratia se ha de mencionar en particular la especie Serratia marcescens.

55

60

Unos microorganismos recombinantes se producen por lo general mediante transformación, transducción, conjugación o una combinación de estos métodos, con un vector, que contiene el deseado gen, un alelo de este gen o partes de éste, o un promotor que refuerza la expresión del gen.

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

- 5 - *Escherichia coli* H4581 (documento de patente europea EP 0 301 572)
- *Escherichia coli* KY10935 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61(11): 1877-1882 (1997))
- *Escherichia coli* VNIIgenetika MG442 (documento de patente de los EE.UU. US-A-4.278.765)
- 10 - *Escherichia coli* VNIIgenetika M1 (documento US-A-4.321.325)
- *Escherichia coli* VNIIgenetika 472T23 (documento US-A-5.631.157)
- *Escherichia coli* BKIIM B-3996 (documento US-A-5.175.107)
- 15 - *Escherichia coli* kat 13 (documento de solicitud de patente internacional WO 98/04715)
- *Escherichia coli* KCCM-10132 (documento WO 00/09660)

20 Unas cepas adecuadas, que producen L-treonina, del género *Serratia*, en particular de la especie *Serratia marcescens*, son por ejemplo,

- *Serratia marcescens* HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))
- 25 - *Serratia marcescens* TLR156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
- *Serratia-marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992))

30 Las cepas que producen L-treonina, procedentes de la familia de las enterobacteriáceas, poseen de manera preferida, entre otras, una o varias de las características genéticas o respectivamente fenotípicas, que se escogen entre el conjunto que se compone de: la resistencia frente al ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivaleriano, la resistencia frente a tialisina, la resistencia frente a etionina, la resistencia frente a  $\alpha$ -metilserina, la resistencia frente al ácido diaminosuccínico, la resistencia frente al ácido  $\gamma$ -aminobutírico, la resistencia frente a borrelidina, la resistencia frente al ácido ciclopentano-carboxílico, la resistencia frente a rifampicina, la resistencia frente a compuestos análogos a valina tales como, por ejemplo, hidroxamato de valina, la resistencia frente a compuestos análogos a

35 purina tales como, por ejemplo, 6-dimetilamino-purina, la necesidad de L-metionina, la necesidad eventualmente parcial y compensable de L-isoleucina, la necesidad del ácido meso-diaminopimélico, la auxotrofia en lo que respecta a dipéptidos que contienen treonina, la resistencia frente a L-treonina, la resistencia frente a un material refinado de treonina, la resistencia frente a L-homoserina, la resistencia frente a L-lisina, la resistencia frente a L-metionina, la resistencia frente al ácido L-glutámico, la resistencia frente al L-aspartato, la resistencia frente a L-leucina, la resistencia frente a L-fenilalanina, la resistencia frente a L-serina, la resistencia frente a L-cisteína, la resistencia frente a L-valina, la sensibilidad frente al fluoropiruvato, una treonina deshidrogenasa defectuosa, eventualmente la capacidad para el aprovechamiento de sacarosa, el refuerzo del operón de treonina, el refuerzo de la homoserina deshidrogenasa L-aspartato cinasa I, de manera preferida de la forma resistente frente a la retroalimentación (feed back), el refuerzo de la homoserina cinasa, el refuerzo de la treonina sintasa, el refuerzo de la aspartato cinasa, eventualmente de la forma resistente frente a la retroalimentación, el refuerzo de la aspartato-semialdehído deshidrogenasa, el refuerzo de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, eventualmente de la forma resistente frente a la retroalimentación, el refuerzo de la fosfoenolpiruvato sintasa, el refuerzo de la transhidrogenasa, el refuerzo del producto génico RhtB, el refuerzo del producto génico RhtC, el refuerzo del producto génico Yfik, el refuerzo de la piruvato carboxilasa, y el debilitamiento de la formación de ácido acético.

55 Se ha encontrado que ciertos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, después de un refuerzo, en particular después de una sobreexpresión del gen lamB, producen L-aminoácidos, en particular L-treonina, de un modo mejorado.

Las secuencias de nucleótidos de los genes o de los marcos abiertos de lectura (ORF) de *Escherichia coli* pertenecen al estado de la técnica y pueden ser tomadas de la secuencia genómica de *Escherichia coli* publicada por Blattner y colaboradores (Science 277: 1453-1462 (1997)). Es conocido que por medio de unas enzimas propias del anfitrión (la metionina aminopeptidasa), se puede disociar el aminoácido N-terminal metionina.

60 A partir de las *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimurium*, que pertenecen asimismo a la familia de las enterobacteriáceas, se conocen las secuencias de nucleótidos para el gen lamB.

El gen lamB de *Escherichia coli* se describe, entre otras cosas, por medio de los siguientes datos:

- Denominación: El gen lamB procedente de *Escherichia coli* codifica la maltoporina LamB, que es denominada también como proteína de membrana que forma poros (porina), y es específica para maltosa/maltodextrina.
- 5 Función: La maltoporina LamB procedente de *Escherichia coli* es una proteína trimérica, que facilita o respectivamente hace posible la difusión de maltosa y maltodextrinas a través de la membrana externa de bacterias entéricas, y que además actúa como una porina inespecífica para pequeñas moléculas hidrófilas, tales como p.ej. glucosa o trehalosa, y también como un receptor de superficies celulares (en inglés cell-surface receptor) para fagos.
- 10 Referencia: Blattner y colaboradores; *Science* 277 (5.331): 1453-1474 (1977), Clément y colaboradores; *Cell* 27: 507-514 (1981), Schwartz; *Methods of Enzymology* 97: 100-112 (1983), Death y colaboradores; *Journal of Bacteriology* 175: 1475-1483 (1993), Klein y colaboradores; *Journal of Microbiology* 175: 1682-1686 (1993), Szmelcman y colaboradores; *Journal of Bacteriology* 124: 112-118 (1975), Benz y colaboradores *Biochem. Biophys. Acta* 1104: 299-307 (1992)
- 15 N° de acceso: AE000477  
Nombre alternativo del gen: b4036
- 20 Las secuencias de ácidos nucleicos se pueden tomar de los bancos de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.), del banco de datos de secuencias de nucleótidos de los European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania o respectivamente Cambridge, Reino Unido) o del banco de datos de ADN de Japón (DDBJ, Mishima, Japón).
- 25 La secuencia de nucleótidos del gen lamB de *Escherichia coli* se encuentra en la SEQ ID No. 3 y las secuencias conocidas para el gen lamB de *Shigella flexneri* (AE015426) y de *Salmonella typhimurium* (AE008897) se representan bajo la SEQ ID No. 5 o respectivamente la SEQ ID No. 7. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por estos marcos de lectura se han representado como SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 o respectivamente SEQ ID No. 8.
- 30 Los genes descritos en las citas bibliográficas indicadas pueden ser utilizados conforme al invento. Además, se pueden utilizar unos alelos de los genes, que resultan a partir de la degenerabilidad del código genético o por mutaciones con sentido, neutras en función (en inglés "sense mutations"). Se prefiere la utilización de genes endógenos.
- 35 Por el concepto de "genes endógenos" o de "secuencias endógenas de nucleótidos" se entienden los genes o alelos o respectivamente las secuencias de nucleótidos, que están presentes en la población de una especie.
- 40 Entre los alelos adecuados del gen lamB, que contienen unas mutaciones con sentido, neutras en función, se cuentan, entre otros, los que conducen por lo menos a un (1) intercambio conservativo de aminoácidos en la proteína codificada por ellos.
- 45 En el caso de los aminoácidos aromáticos se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian unos/as por otros/as fenilalanina, triptófano y tirosina. En el caso de los aminoácidos hidrófobos se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian unas por otras leucina, isoleucina y valina. En el caso de los aminoácidos polares se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian una por otra glutamina y asparagina. En el caso de los aminoácidos de carácter básico se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian unas por otras arginina, lisina e histidina. En el caso de los aminoácidos de carácter ácido se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian uno por otro el ácido aspártico y el ácido glutámico. En el caso de los aminoácidos que contienen grupos hidroxilo se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian una por otra serina y treonina.
- 50 De igual manera, se pueden utilizar también aquellas secuencias de nucleótidos, que codifican variantes de las mencionadas proteínas, que contienen adicionalmente junto al extremo terminal de N o C una prolongación o un acortamiento en por lo menos un (1) aminoácido. Esta prolongación o este acortamiento no es de más que 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 o 2 aminoácidos o radicales de aminoácidos
- 55 Entre los alelos adecuados se cuentan también aquellos que codifican unas proteínas en las que se ha insertado (inserción) o suprimido (delección) por lo menos un (1) aminoácido. El número máximo de tales modificaciones denominadas como "indels" puede ser de 2, 3, 5, 10, 20, pero en ningún caso de más que que 30 aminoácidos.
- 60 Entre los alelos adecuados se cuentan además los que son obtenibles mediante hibridación, en particular en condiciones rigurosas, mediando utilización de las SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7 o de partes de éstas, en particular de las regiones codificadoras o respectivamente de las secuencias complementarias a éstas.

Un experto en la especialidad puede encontrar instrucciones para la identificación de secuencias de ADN mediante hibridación, entre otros lugares, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization (Guía para los usuarios del sistema DIG para la hibridación en filtro)" de la entidad Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en la cita de Liebl y colaboradores (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas, es decir, que se forman solamente unos híbridos, en los que la sonda y la secuencia diana, es decir los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticas/os en por lo menos un 70 %. Es conocido que la rigurosidad de la hibridación, inclusive las etapas de lavado, es(son) influida(s) o respectivamente determinada(s) por variación de la composición de los tampones, de la temperatura y de la concentración de sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo por lo general con una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybridisation Guide, Hybrid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996).

Para la reacción de hibridación se puede emplear, por ejemplo, un tampón correspondiente al tampón 5 x SSC a una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. En este caso, también se pueden hibridar unas sondas con unos polinucleótidos, que tienen una identidad de menos que un 70 % con la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y son eliminados mediante un lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante una disminución de la concentración de sales a 2 x SSC y eventualmente a continuación 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C, aproximadamente 52°C - 68°C, aproximadamente 54°C - 68°C, aproximadamente 56°C - 68°C, aproximadamente 58°C - 68°C, aproximadamente 60°C - 68°C, aproximadamente 62°C - 68°C, aproximadamente 64°C - 68°C, o aproximadamente 66°C - 68°C. Eventualmente, es posible disminuir la concentración de sales hasta una concentración correspondiente a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Mediante un aumento escalonado de la temperatura de hibridación en escalones de aproximadamente 1 - 2°C desde 50°C hasta 68°C se pueden aislar unos fragmentos de polinucleótidos, que poseen una identidad de por ejemplo por lo menos un 70 % o de por lo menos un 80 %, por lo menos un 90 %, por lo menos un 91 %, por lo menos un 92 %, por lo menos un 93 %, por lo menos un 94 %, por lo menos un 95 %, por lo menos un 96 %, por lo menos un 97 %, por lo menos un 98 % o por lo menos un 99 % con respecto a la secuencia de la sonda empleada. Unas instrucciones adicionales para la hibridación son obtenibles en el comercio en forma de los denominados estuches (p.ej. el DIG Easy Hyb de la entidad Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1603558). Las secuencias de nucleótidos, obtenidas de esta manera, codifican unos polipéptidos, que poseen una identidad de por lo menos un 90 % con las secuencias de aminoácidos representadas en las SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 o SEQ ID No. 8.

Para la consecución de un refuerzo se pueden aumentar, por ejemplo, la expresión de los genes o alelos o las propiedades catalíticas de la proteína. Eventualmente, se pueden combinar las dos medidas técnicas.

Para la consecución de una sobreexpresión, por ejemplo se puede aumentar el número de copias de los correspondientes genes, o se puede mutar la región de promotor y de regulación o el sitio de fijación a ribosomas, que se encuentra secuencia arriba del gen estructural. De igual manera, actúan unos casetes de expresión o unos promotores, que son incorporados secuencia arriba del gen estructural. Por medio de la incorporación de unos promotores inducibles es adicionalmente posible aumentar la expresión en el transcurso de la producción por fermentación de L-treonina. Mediante unas medidas técnicas destinadas a la prolongación de la duración de vida útil del ARN-m (mensajero) se mejora asimismo la expresión. Además, mediante una evitación de la degradación de la proteína enzimática se refuerza asimismo la actividad enzimática. Los genes o las construcciones artificiales de genes pueden presentarse o bien en plásmidos con diferentes números de copias, o se pueden integrar en un cromosoma y amplificar. Alternativamente, se puede conseguir además una sobreexpresión de los correspondientes genes mediante una modificación de la composición de los medios y mediante la realización de la cultivación.

Unos métodos para la sobreexpresión se han descrito suficientemente dentro del estado de la técnica - por ejemplo en la cita de Makrides y colaboradores (Microbiological Reviews 60 (3), 512-538 (1996)) -. Mediante utilización de vectores se aumenta el número de copias en por lo menos una (1) copia. Como vectores se pueden utilizar unos plásmidos tales como los que por ejemplo se han descrito en el documento US 5.538.873. Como vectores se pueden utilizar asimismo unos fagos, por ejemplo, el fago Mu, tal como se describe en el documento EP 0.332.448, o el fago lambda ( $\lambda$ ). Un aumento del número de copias se puede conseguir también incorporando una copia adicional en otro sitio del cromosoma - por ejemplo, en el sitio att del fago  $\lambda$  (Yu y Court, Gene 223, 77-81 (1998)) -. En el documento US 5.939.307 se describe que, mediante incorporación de casetes de expresión o de promotores tales como, por ejemplo, el promotor tac, el promotor trp, el promotor lpp o el promotor P<sub>L</sub> y el promotor P<sub>R</sub> del fago  $\lambda$ , se pudo conseguir un aumento de la expresión, por ejemplo corriente arriba del operón cromosómico de la treonina. De igual manera, se pueden utilizar los promotores del fago T7, los promotores gear box (caja de engranajes) o el promotor nar. Tales casetes de expresión o promotores se pueden utilizar también, tal como se describe en el documento EP 0 593 792, para sobreexpresar genes unidos a plásmidos. Mediante utilización del alelo lacI<sup>0</sup> se puede controlar, por su parte, la expresión de genes unidos a plásmidos (Glascock y Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)).

Un experto en la especialidad puede encontrar instrucciones acerca de esto, entre otras, en las citas de Chang y Cohen (*Journal of Bacteriology* 134: 1141-1156 (1978)), de Hartley y Gregori (*Gene* 13: 347-353 (1981)), de Amann y Brosius (*Gene* 40: 183-190 (1985)), de de Broer y colaboradores (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 21-25 (1983)), de LaVallie y colaboradores (*BIO/TECHNOLOGY* 11: 187-193 (1993)), en el documento PCT/US97/13359, en las citas de Llosa y colaboradores (*Plasmid* 26: 222-224 (1991)), de Quandt y Klipp (*Gene* 80: 161-169 (1989)), de Hamilton y colaboradores (*Journal of Bacteriology* 171: 4617-4622 (1989)), de Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58: 191-195 (1998)) y en unos conocidos libros de texto de genética y biología molecular.

Se pueden utilizar unos vectores plasmídicos replicables en enterobacteriáceas tales como unos vectores de clonación que se derivan p.ej. de pACYC184 (Bartolomé y colaboradores; *Gene* 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann y colaboradores; *Gene* 69: 301-315 (1988)) o unos derivados de pSC101 (Vocke y Bastia; *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80(21): 6557-6561 (1983)). En un procedimiento conforme al invento, se puede emplear una cepa transformada con un vector plasmídico, llevando el vector plasmídico por lo menos un gen lamB o un alelo, o unas secuencias de nucleótidos que codifican el producto génico de éste.

Por el concepto de "transformación" se entiende la asimilación de un ácido nucleico aislado por un anfitrión (microorganismo).

Asimismo es posible transferir a diferentes cepas unas mutaciones, que conciernen a la expresión de los respectivos genes, mediante intercambio de secuencias (Hamilton y colaboradores; *Journal of Bacteriology* 171: 4617-4622 (1989)), conjugación o transducción.

Se encuentran unas explicaciones más detalladas acerca de los conceptos de la genética y la biología molecular en unos conocidos libros de texto de genética y biología molecular tales como por ejemplo el libro de texto de Birge (*Bacterial and Bacteriophage Genetics*, 4ª edición, editorial Springer, Nueva York (EE.UU.), 2000) o en el libro de texto de Berg, Tymoczko y Stryer (*Biochemistry*, 5ª edición, Freeman and Company, Nueva York (EE.UU.), 2002) o en el manual de Sambrook y colaboradores (*Molekular Cloning, A Laboratory Manual*, (un conjunto de 3 volúmenes), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE.UU.), 2001).

Además, para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-treonina, con cepas de la familia de las enterobacteriáceas puede ser ventajoso, adicionalmente al refuerzo del gen lamB, reforzar una o varias enzimas de la conocida ruta de biosíntesis de la treonina o unas enzimas del metabolismo anaplerótico o unas enzimas para la producción de un nicotinamida adenina dinucleótido fosfato o enzimas de la glicolisis o enzimas PTS o enzimas del metabolismo del azufre. La utilización de genes endógenos se prefiere por lo general.

Así, por ejemplo, se pueden reforzar, en particular sobreexpresar, simultáneamente uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de

- por lo menos un gen del operón thrABC, que codifica la aspartato cinasa, la homoserina deshidrogenasa, la homoserina cinasa y la treonina sintasa (documento US-A-4.278.765),
- el gen pyc, que codifica la piruvato carboxilasa, de *Corynebacterium glutamicum* (documento WO 99/18228),
- el gen pps, que codifica la fosfoenolpiruvato sintasa (*Molecular and General Genetics* 231(2): 332-336 (1992)),
- el gen ppc, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa (documento WO 02/064808),
- los genes pntA y pntB, que codifican las subunidades de la piridina transhidrogenasa (*European Journal of Biochemistry* 158: 647-653 (1986)),
- el gen rhtB, que codifica la proteína que media en la resistencia frente a homoserina (documento de solicitud de patente europea EP-A-0 994 190),
- el gen rhtC, que codifica la proteína que media en la resistencia frente a treonina (documento EP-A-1 013 765),
- el gen thrE, que codifica la proteína de vehículo y exportación de treonina, de *Corynebacterium glutamicum* (documento WO 01/92545),

## ES 2 372 290 T3

- el gen *gdhA*, que codifica la glutamato deshidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- 5 • el gen *pgm*, que codifica la fosfoglucomutasa (documento WO 03/004598),
- el gen *fba*, que codifica la fructosa bifosfato aldolasa (documento WO 03/004664),
- el gen *ptsH* del operón *ptsHIcrr*, que codifica la fosfohistidina proteína hexosa fosfotransferasa del sistema PTS de la fosfotransferasa (documento WO 03/004674),
- 10 • el gen *ptsI* del operón *ptsHIcrr*, que codifica la enzima I del sistema PTS de la fosfotransferasa (documento WO 03/004674),
- el gen *crr* del operón *ptsHIcrr*, que codifica el componente IIA, específico para glucosa, del sistema PTS de la fosfotransferasa (documento WO 03/004674),
- 15 • el gen *ptsG*, que codifica el componente IIBC, específico para glucosa (documento WO 03/004670),
- el gen *lrp*, que codifica el regulador del regulón de leucina (documento WO 03/004665),
- 20 • el gen *fadR*, que codifica el regulador del regulón de fad (documento WO 03/038106),
- el gen *iclR*, que codifica el regulador del metabolismo intermediario central (documento WO 03/038106),
- 25 • el gen *ahpC* del operón *ahpCF*, que codifica la subunidad pequeña de la alquil hidroperóxido reductasa (documento WO 03/004663),
- el gen *ahpF* del operón *ahpCF*, que codifica la subunidad grande de la alquil hidroperóxido reductasa (documento WO 03/004663),
- 30 • el gen *cysK*, que codifica la cisteína sintasa A (documento WO 03/006666),
- el gen *cysB*, que codifica el regulador del regulón de cys (WO 03/006666),
- 35 • el gen *cysJ* del operón *cysJIH*, que codifica la flavoproteína de la NADPH sulfito reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen *cysI* del operón *cysJIH*, que codifica la hemoproteína de la NADPH sulfito reductasa (documento WO 03/006666),
- 40 • el gen *cysH* del operón *cysJIH*, que codifica la adenililsulfato reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen *rseA* del operón *rseABC*, que codifica una proteína de membrana con actividad anti- $\sigma$ E (documento WO 03/008612),
- 45 • el gen *rseC* del operón *rseABC*, que codifica un regulador global del factor  $\sigma$ E (documento WO 03/008612),
- el gen *sucA* del operón *sucABCD*, que codifica la subunidad de descarboxilasa de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa, (documento WO 03/008614),
- 50 • el gen *sucB* del operón *sucABCD*, que codifica la subunidad de dihidrolipoíl transsuccinasa E2 de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa (documento WO 03/008614),
- 55 • el gen *sucC* del operón *sucABCD*, que codifica la subunidad  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- el gen *sucD* del operón *sucABCD*, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- 60 • el gen *aceE*, que codifica el componente E1 del complejo de la piruvato deshidrogenasa (documento WO 03/076635),



- el gen aceF, que codifica el componente E2 del complejo de la piruvato deshidrogenasa (documento WO 03/076635),
- 5 • el gen rseB, que codifica el regulador de la actividad del factor SigmaE (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997),
- el gen malT, que codifica el regulador de transcripción positiva del regulón de maltosa (Gene 42: 201-208 (1986), documento de patente alemana DE102004003411.7),
- 10 • el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) yaaU de Escherichia coli (número de acceso AE000114 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU), documento DE10361268.8),
- 15 • el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) yodA de Escherichia coli (número de acceso AE000288 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU), documento DE10361192.4),
- el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) yibD de Escherichia coli (número de acceso AE000439 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU), documento DE102004005836.9).
- 20

Además, para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-treonina, puede ser ventajoso, adicionalmente al refuerzo del gen lamB, debilitar, en particular desconectar o disminuir, la expresión, de uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de

- 25 • el gen tdh, que codifica la treonina deshidrogenasa (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- el gen mdh, que codifica la malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- 30 • el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) yjfA de Escherichia coli (número de acceso AAC77180 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento WO 02/29080),
- 35 • el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) ytfP de Escherichia coli (número de acceso AAC77179 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento WO 02/29080),
- el gen pckA, que codifica la enzima fosfoenolpiruvato carboxi cinasa (documento WO 02/29080),
- 40 • el gen poxB, que codifica la piruvato oxidasa (documento WO 02/36797),
- el gen dgsA, que codifica el regulador de DgsA del sistema de la fosfotransferasa (documento WO 02/081721), que también es conocido bajo la denominación de gen mlc,
- 45 • el gen fruR, que codifica el represor de la fructosa (documento WO 02/081698), que también es conocido bajo la denominación de gen cra,
- el gen rpoS, que codifica el factor Sigma<sup>38</sup> (documento WO 01/05939), que también es conocido bajo la denominación de gen katF y
- 50 • el gen aspA, que codifica la aspartato amonio liasa (documento 03/008603).

55 El concepto de "debilitamiento" describe en este contexto la disminución o la desconexión de la actividad intracelular o de la concentración en un microorganismo de una o varias enzimas o respectivamente proteínas, que son codificadas por el correspondiente ADN, mediante el recurso de que se utiliza, por ejemplo, un promotor más débil que en la cepa de partida o un gen o respectivamente un alelo, que codifica una correspondiente enzima o respectivamente proteína con una baja actividad o respectivamente que desactiva a la correspondiente enzima o respectivamente proteína o al gen, y que combina eventualmente estas medidas técnicas.

60 Mediante las medidas técnicas del debilitamiento, se disminuye la actividad o la concentración de la correspondiente proteína por lo general a un 0 hasta 75 %, un 0 hasta 50 %, un 0 hasta 25 %, un 0 hasta 10 % o un 0 hasta 5 % de la actividad o la concentración de la proteína de tipo silvestre, o respectivamente de la actividad o la concentración de la proteína en el microorganismo de partida no recombinante. Como microorganismo de partida o cepa parental

(en inglés "parent strain") se entiende el microorganismo, en el que se llevan a cabo las medidas técnicas conformes al invento.

5 Para conseguir un debilitamiento se puede(n) disminuir o respectivamente desconectar, por ejemplo, la expresión de los genes o del marco abierto de lectura o las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas. Eventualmente se pueden combinar las dos medidas técnicas.

10 La disminución de la expresión génica se puede efectuar mediante una conducción adecuada del cultivo, mediante una modificación genética (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica o también mediante la técnica del ARN antisentido. Unas estructuras de señal de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de fijación a ribosomas, el codón de inicio y terminadores. Un experto en la especialidad puede encontrar datos a este respecto, entre otros lugares, en las citas de Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), de Carrier y Keasling (Biotechnology Progress 15: 58-64 (1999)), de Franch y Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3: 159-164 (2000)) y en unos conocidos libros de texto de genética y biología molecular tales como por ejemplo el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik" (Genética molecular), 6ª edición, editorial Georg Thieme, Stuttgart, Alemania, 1995) o el de Winnacker ("Gene und Klone" (Genes y clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990).

20 Unas mutaciones, que conducen a una modificación o respectivamente a una disminución de las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas, son conocidas a partir del estado de la técnica. Como ejemplos se han de mencionar los trabajos de Qiu y Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611 - 8617 (1997)), de Yano y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5511-5515 (1998)), y de Wentz y Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266: 20833-20839 (1991)).

25 Unas exposiciones recopilativas se pueden tomar de unos conocidos libros de texto de genética y biología molecular tales como p.ej. el de Hagemann ("Allgemeine Genetik" (Genética general), editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1986).

30 Como mutaciones entran en consideración transiciones, transversiones, inserciones y supresiones de por lo menos un (1) par de bases o respectivamente un nucleótido. En dependencia del efecto del intercambio de aminoácidos, provocado por la mutación, sobre la actividad enzimática, se habla de mutaciones con sentido erróneo (en inglés "missense mutations) o de mutaciones sin sentido ("nonsense mutations"). La mutación con sentido erróneo conduce a un intercambio de un aminoácido dado en una proteína por otro, tratándose en particular de un intercambio no conservativo de aminoácidos. De esta manera se perjudica la capacidad de funcionar o respectivamente la actividad de la proteína y se reduce a un valor de 0 a 75 %, 0 a 50 %, 0 a 25 %, 0 a 10 % o 0 a 5 %. La mutación sin sentido conduce a un codón de detención en la región codificadora del gen y por consiguiente a una interrupción prematura de la traducción. Las inserciones o supresiones de por lo menos un par de bases en un gen conducen a mutaciones de desplazamiento del marco de lectura (en inglés "frame shift mutations"), que dan lugar a que se incorporen unos aminoácidos incorrectos o a que la traducción sea interrumpida prematuramente. Si como consecuencia de la mutación resulta un codón de interrupción en la región codificadora, entonces esto conduce asimismo a una interrupción prematura de la traducción. Las supresiones de por lo menos uno (1) o varios codones conducen típicamente asimismo a una pérdida total de la actividad enzimática.

45 Unas instrucciones para la producción de tales mutaciones pertenecen al estado de la técnica y se pueden deducir de unos libros de texto conocidos de genética y biología molecular tales como p.ej. el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik" (Genética molecular), 6ª edición, editorial Georg Thieme, Stuttgart, Alemania, 1995), el de Winnacker ("Gene und Klone" (Genes y clones), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el de Hagemann ("Allgemeine Genetik" (Genética general), Editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1986).

50 Unas mutaciones adecuadas en los genes pueden ser incorporadas mediante un intercambio de genes o respectivamente de alelos en unas cepas adecuadas.

55 Un método usual es el método descrito por Hamilton y colaboradores (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), para realizar el intercambio de genes con ayuda de un derivado de pSC101 pMAK705, que se replica de un modo condicionado. Asimismo, se pueden utilizar otros métodos descritos en el estado de la técnica tales como, por ejemplo, los de Martínez-Morales y colaboradores (Journal of Bacteriology 181: 7143-7148 (1999)) o de Boyd y colaboradores (Journal of Bacteriology 182: 842-847 (2000)).

60 Asimismo es posible transferir a diferentes cepas unas mutaciones en los respectivos genes, o unas mutaciones, que conciernen a la expresión de los respectivos genes o de los marcos abiertos de lectura, mediante conjugación o transducción.

Además, para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-treonina, adicionalmente al refuerzo del gen lamB, puede ser ventajoso desconectar reacciones secundarias indeseadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms" [Crianza de microorganismos que producen aminoácidos] en: Overproduction of Microbial Products [Sobreproducción de productos microbianos], Krumphanzl, Sikyta, Vanek (coordinadores de

edición), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

Los microorganismos producidos conforme al invento se pueden cultivar en el procedimiento batch (= discontinuo) (cultivación por tandas), en el procedimiento fed batch (procedimiento de afluencia) o en el procedimiento fed batch repeated (procedimiento de afluencia repetida) o en un procedimiento continuo (documento US.....). Una recopilación acerca de métodos conocidos de cultivación se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocesos 1, introducción en la técnica de los bioprocesos] (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo que se ha de utilizar, debe de satisfacer de una manera apropiada las exigencias de las respectivas cepas. Unas descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" [Manual de métodos para la bacteriología general] de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU. 1981).

Como fuente de carbono se pueden utilizar azúcares e hidratos de carbono, tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidones y eventualmente celulosas, aceites y grasas, tales como p.ej. aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, tales como p.ej. ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como p.ej. glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como p.ej. ácido acético. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta, agua de maceración de maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una mezcla.

Como fuente de fósforo se pueden utilizar ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio, hidrógeno-fosfato de dipotasio o las correspondientes sales que contienen sodio. El medio de cultivo debe de contener además unas sales de metales, tales como p.ej. sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, se pueden emplear sustancias de crecimiento (hormonas) esenciales, tales como aminoácidos y vitaminas, adicionalmente a las sustancias arriba mencionadas. Al medio de cultivo se le pueden añadir, además de esto, unos compuestos precursores adecuados. Las mencionadas sustancias empleadas (materias primas) se pueden añadir al cultivo en forma de una tanda única o se pueden alimentar de una manera apropiada durante la cultivación.

La fermentación se lleva a cabo por lo general a un valor del pH de 5,5 a 9,0, en particular de 6,0 a 8,0. Para el control del valor del pH del cultivo se emplean de un modo apropiado compuestos de carácter básico, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o respectivamente agua amoniacal, o compuestos de carácter ácido, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para la represión del desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes tales como p.ej. ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para la conservación de la estabilidad de los plásmidos se pueden añadir al medio unas apropiadas sustancias que actúan de un modo selectivo, p.ej. antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o unas mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como p.ej. aire. La temperatura del cultivo está situada normalmente en 25°C hasta 45°C y de manera preferida en 30°C hasta 40°C. El cultivo se prosigue durante tanto tiempo hasta que se haya formado una cantidad máxima de L-aminoácidos o respectivamente de L-treonina. Esta meta se alcanza normalmente en el transcurso de 10 horas hasta 160 horas.

El análisis de los L-aminoácidos se puede efectuar mediante una cromatografía de intercambio de aniones con una subsiguiente derivatización con ninhidrina, tal como se describe en la cita de Spackman y colaboradores (Analytical Chemistry, 30: 1190-1206 (1958)), o se puede efectuar mediante una HPLC (cromatografía de líquido de alto rendimiento) de fase inversa, tal como se describe en la cita de Lindroth y colaboradores (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

El procedimiento conforme al invento sirve para la producción por fermentación de L-aminoácidos, tales como, por ejemplo, L-treonina, L-isoleucina, L-valina, L-metionina, L-homoserina, L-triptófano y L-lisina, en particular de L-treonina.

El presente invento se ilustra más detalladamente en lo sucesivo con ayuda de unos Ejemplos de realización.

Los medios mínimos (M9) y enteros (LB) utilizados para *Escherichia coli* han sido descritos por J.H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics (Un breve curso sobre genética bacteriana) (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento de un ADN plasmídico procedente de *Escherichia coli*, así como todas las técnicas para la restricción, ligación y los tratamientos de Klenow y con una fosfatasa alcalina se llevan a cabo según Sambrook y colaboradores: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). La

transformación de *Escherichia coli*, siempre y cuando que no se describa otra cosa distinta, se lleva a cabo según Chung y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1989) 86: 2.172-2.175).

5 La temperatura de incubación en el caso de la producción de las cepas y de los transformantes es de 37°C.

### **Ejemplo 1**

Construcción del plásmido de expresión pTrc99A1amB

10 El gen lamB procedente de *E. coli* K12 se amplifica mediante aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) así como de oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia de nucleótidos del gen lamB en *E. coli* K12 MG1655 (número de acceso AE000477), Blattner y colaboradores (Science 277: 1453-1474 (1997)) se sintetizan unos cebadores de la PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Las secuencias de los cebadores se modifican de tal manera que resultan unos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Para el cebador P\_lam1neu se escoge la secuencia de reconocimiento para XbaI y para el cebador P\_lam2neu se escoge la secuencia de reconocimiento para HindIII, que están marcadas por subrayado en la secuencia de nucleótidos representada más abajo:

P\_lam1neu:

5' -TCTAGAGCCTGTCACAGGTGATGTGAA- 3' (SEQ ID No. 1)

P\_lam2neu:

5' -AAGCTTACAGCCGTTGTAGGCCTGATA- 3' (SEQ ID No. 2)

20 El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655, empleado para la PCR, se aísla según las indicaciones del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (de QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN con una longitud de 1.498 pb (pares de bases) puede ser amplificado con los cebadores específicos en condiciones clásicas de PCR (Innis y colaboradores (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications (Protocolos de PCR. Guía de métodos y aplicaciones), Academic Press) con la polimerasa de ADN Vent (New England Biolabs GmbH, Fráncfurt, Alemania) (SEQ ID No. 3).

30 El fragmento lamB amplificado se liga con el vector pCR-Blunt II-TOPO (estuche Zero TOPO TA Cloning Kit, de Invitrogen, Groningen, Holanda) correspondientemente a las indicaciones del fabricante, y se transforma en el seno de la cepa de *E. coli* TOP10. La selección de las células que llevan el plásmido, se efectúa sobre un agar LB, que había sido mezclado con 50 µg/ml de kanamicina. Después del aislamiento del ADN plasmídico, el vector se disocia con las enzimas EcoRI y EcoRV y después de haber comprobado la disociación en un gel de agarosa al 0,8 %, se denomina como pCRBluntlamB.

35 La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN amplificado o del producto de la PCR se comprueba según el método de interrupción de la cadena con dideoxi de Sanger y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74: 5463-5467 (1977)) con el aparato de secuenciación "ABI Prism 377" de la entidad PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Alemania). La secuencia del producto de la PCR corresponde a las posiciones 1-1498 de la secuencia representada en la SEQ ID No. 3. La secuencia de aminoácidos de la correspondiente proteína LamB se representa en la SEQ ID No. 4.

45 A continuación, el vector pCRBluntlamB se disocia con las enzimas HindIII y XbaI y el fragmento lamB, que tiene una longitud de aproximadamente 1.500 pb, después de una separación en el gel de agarosa al 0,8 % se aísla a partir del gel (con el estuche QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Alemania) y se liga con el vector pTrc99A (de Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), que había sido digerido con las enzimas HindIII y XbaI. La cepa de *E. coli* DH5α (Grant y colaboradores, Proceedings of the National Academy of Sciences, EE.UU., 87 (1990) 4645-4649) se transforma con la tanda de ligación, y las células que llevan el plásmido, se seleccionan sobre un agar LB, que ha sido mezclado con 50 µg/ml de ampicilina.

50 La clonación exitosa se puede detectar después del aislamiento del ADN plasmídico mediante la disociación testigo con las enzimas EcoRV o respectivamente Sspl.

55 El plásmido se denomina como pTrc99AlamB (Figura 1).

**Ejemplo 2**

Construcción del plásmido de expresión pMW218lamB

5 El vector pCRBIBluntlamB descrito en el Ejemplo 1 se disocia con las enzimas HindIII y XbaI y, después de una separación en el gel de agarosa al 0,8 %, el fragmento lamB se aísla a partir del gel (con el estuche QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN, Hilden, Alemania) y se liga con el vector con bajo número de copias pMW218 (de Nippon Gene, Toyama, Japón), que ha sido digerido con las enzimas HindIII y XbaI. La cepa de E. coli DH5α (Grant y colaboradores; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) se transforma con la  
10 tanda de ligación, y las células, que llevan el plásmido, se seleccionan sobre un agar LB, que se ha mezclado con 50 µg/ml de kanamicina.

La clonación exitosa se puede detectar después del aislamiento del ADN plasmídico mediante la disociación testigo con la enzima ClaI.

15 El plásmido se denomina como pMW218lamB (Figura 2).

**Ejemplo 3**

20 Producción de L-treonina con las cepas MG442/pTrc99AlamB y MG442/pMW218lamB

La cepa de E. coli MG442 que produce L-treonina se ha descrito en el documento de patente de los EE.UU. 4.278.765 y se ha depositado en la Colección Nacional Rusa para Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia) como CMIM B-1628.

25 La cepa MG442 se transforma con los plásmidos de expresión pTrc99AlamB y pMW218lamB descritos en los Ejemplos 1 y 2 y con los vectores pTrc99A y pMW218, y las células, que llevan el plásmido, se seleccionan sobre un agar LB con 50 µg/ml de ampicilina o respectivamente 50 µg/ml de kanamicina. De esta manera resultan las cepas MG442/pTrc99AlamB, MG442/pTrc99A, MG442/pMW218lamB y MG442/pMW218. Unas colonias individuales seleccionadas se reproducen adicionalmente a continuación sobre un medio mínimo con la siguiente composición:  
30 3,5 g/l de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 1,5 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 g/l de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar, 50 mg/l de ampicilina o respectivamente 50 mg/l de kanamicina. La formación de L-treonina se comprueba en cultivos por tandas de 10 ml, que se han obtenido en matraces de Erlenmeier con una capacidad de 100 ml. Para esto, se inoculan 10 ml de un medio de cultivo previo con la siguiente composición: 2 g/l de un extracto de levadura,  
35 10 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 15 g/l de CaCO<sub>3</sub>, 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina o respectivamente 50 mg/l de kanamicina, y se incuban durante 16 horas a 37°C y 180 rpm sobre una incubadora ESR de la entidad Kühner AG (Birsfelden, Suiza). En cada caso 250 µl de este cultivo previo se sobreinoculan en 10 ml de un medio de producción (25 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O,  
40 0,03 g/l de FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0,018 g/l de MnSO<sub>4</sub>\*1H<sub>2</sub>O, 30 g/l de CaCO<sub>3</sub>, 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina o respectivamente 50 mg/l de kanamicina) y se incuban durante 48 horas a 37°C. Después de la incubación se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión del cultivo con un fotómetro LP2W de la entidad Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) en el caso de una longitud de onda de medición de 660 nm.

45 A continuación, la concentración de la L-treonina formada se determina en el material sobrenadante del cultivo filtrado en condiciones estériles con un aparato analizador de aminoácidos de la entidad Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) mediante una cromatografía con intercambio de iones y una reacción posterior en columna con una detección con ninhidrina.

50 En la Tabla 1 se representa el resultado del ensayo.

Tabla 1

Cepa	DO (660 nm)	L-treonina g/l
MG442/pTrc99A	2,0	2,1
MG442/pTrc99AlamB	2,0	2,6
MG442/pMW218	6,2	1,7
MG442/pMW218lamB	5,7	2,5

Breve descripción de las Figuras:

55 Figura 1: Mapa del plásmido pTrc99AlamB, que contiene el gen lamB

Figura 2: Mapa del plásmido pMW218lamB, que contiene el gen lamB

## ES 2 372 290 T3

Los datos de longitudes se han de entender como datos aproximados. Las abreviaturas y las denominaciones utilizadas tienen los siguientes significados:

- 5 • bla: gen, que codifica la resistencia frente a ampicilina
- kan: gen, que codifica la resistencia frente a kanamicina
- lac Iq: gen para la proteína represora del promotor de trc
- 10 • lacZ': fragmento de gen, que codifica el péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa
- trc: región promotora de trc, inducible con IPTG
- 15 • lamB: región codificadora del gen lamB
- 5S: región 5S del ARNr
- rrnBT: región terminadora del ARNr

20 Las abreviaturas para las enzimas de restricción tienen los siguientes significados:

- XbaI: endonucleasa de restricción procedente de *Xanthomonas badrii*
- HindIII: endonucleasa de restricción procedente de *Haemophilus influenzae*
- 25 • ClaI: endonucleasa de restricción procedente de *Caryophanon latum*
- SspI: endonucleasa de restricción procedente de *Sphaerotilus species*
- EcoRV: endonucleasa de restricción procedente de *Escherichia coli*

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

- <110> Degussa AG
- 5 <120> Procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediante utilización de cepas de la familia de las enterobacteriáceas
- <130> 040163 BT
- 10 <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.2
- 15 <210> 1  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> secuencia artificial
- 20 <220>  
<221> cebador  
<222> (1) .. (27)  
<223> P\_lam1neu
- 25 <220>  
<221> sitio de corte por restricción  
<222> (1) .. (6)  
<223> XbaI
- 30 <400> 1  
tctagagcct gtcacaggtg atgtgaa 27
- <210> 2  
<211> 27  
<212> ADN  
35 <213> secuencia artificial
- 40 <220>  
<221> cebador  
<222> (1) .. (27)  
<223> P\_lam2neu
- 45 <220>  
<221> sitio de corte por restricción  
<222> (1) .. (6)  
<223> HindIII
- <400> 2  
aagcttacag ccggtgtagg cctgata 27
- 50 <210> 3  
<211> 1498  
<212> ADN  
<213> Escherichia coli
- 55 <220>  
<221> producto de PCR  
<222> (1) .. (1498)  
<223> producto de PCR lamB
- 60 <220>  
<221> fijación del cebador  
<222> (1) .. (27)  
<223> cebador P\_lam1neu

ES 2 372 290 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (57) .. (1397)  
 <223> zona codificadora de lamB

5

<220>  
 <221> fijación del cebador  
 <222> (1472) .. (1498)  
 <223> cebador P\_lam2neu

10

```

<400> 3
tctagagcct gtcacaggtg atgtgaaaaa agaaaagcaa tgactcagga gataga atg      59
                                           Met
                                           1

atg att act ctg cgc aaa ctt cct ctg gcg gtt gcc gtc gca gcg ggc      107
Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala Gly
                    5                          10                          15

gta atg tct gct cag gca atg gct gtt gat ttc cac ggc tat gca cgt      155
Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp Phe His Gly Tyr Ala Arg
                    20                          25                          30

tcc ggt att ggt tgg aca ggt agc ggc ggt gaa caa cag tgt ttc cag      203
Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Ser Gly Gly Glu Gln Gln Cys Phe Gln
                    35                          40                          45

act acc ggt gct caa agt aaa tac cgt ctt ggc aac gaa tgt gaa act      251
Thr Thr Gly Ala Gln Ser Lys Tyr Arg Leu Gly Asn Glu Cys Glu Thr
                    50                          55                          60                          65

tat gct gaa tta aaa ttg ggt cag gaa gtg tgg aaa gag ggc gat aag      299
Tyr Ala Glu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Val Trp Lys Glu Gly Asp Lys
                    70                          75                          80

agc ttc tat ttc gac act aac gtg gcc tat tcc gtc gca caa cag aat      347
Ser Phe Tyr Phe Asp Thr Asn Val Ala Tyr Ser Val Ala Gln Gln Asn
                    85                          90                          95

gac tgg gaa gct acc gat ccg gcc ttc cgt gaa gca aac gtg cag ggt      395
Asp Trp Glu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Arg Glu Ala Asn Val Gln Gly
                    100                         105                         110

aaa aac ctg atc gaa tgg ctg cca ggc tcc acc atc tgg gca ggt aag      443
Lys Asn Leu Ile Glu Trp Leu Pro Gly Ser Thr Ile Trp Ala Gly Lys
                    115                         120                         125

cgc ttc tac caa cgt cat gac gtt cat atg atc gac ttc tac tac tgg      491
Arg Phe Tyr Gln Arg His Asp Val His Met Ile Asp Phe Tyr Tyr Trp
                    130                         135                         140                         145

gat att tct ggt cct ggt gcc ggt ctg gaa aac atc gat gtt ggc ttc      539
Asp Ile Ser Gly Pro Gly Ala Gly Leu Glu Asn Ile Asp Val Gly Phe
                    150                         155                         160

ggt aaa ctc tct ctg gca gca acc cgc tcc tct gaa gct ggt ggt tct      587
Gly Lys Leu Ser Leu Ala Ala Thr Arg Ser Ser Glu Ala Gly Gly Ser
                    165                         170                         175
    
```



ES 2 372 290 T3

tcc tct ttc gcc agc aac aat att tat gac tat acc aac gaa acc gcg Ser Ser Phe Ala Ser Asn Asn Ile Tyr Asp Tyr Thr Asn Glu Thr Ala 180 185 190	635
aac gac gtt ttc gat gtg cgt tta gcg cag atg gaa atc aac ccg ggc Asn Asp Val Phe Asp Val Arg Leu Ala Gln Met Glu Ile Asn Pro Gly 195 200 205	683
ggc aca tta gaa ctg ggt gtc gac tac ggt cgt gcc aac ttg cgt gat Gly Thr Leu Glu Leu Gly Val Asp Tyr Gly Arg Ala Asn Leu Arg Asp 210 215 220 225	731
aac tat cgt ctg gtt gat ggc gca tcg aaa gac ggc tgg tta ttc act Asn Tyr Arg Leu Val Asp Gly Ala Ser Lys Asp Gly Trp Leu Phe Thr 230 235 240	779
gct gaa cat act cag agt gtc ctg aag ggc ttt aac aag ttt gtt gtt Ala Glu His Thr Gln Ser Val Leu Lys Gly Phe Asn Lys Phe Val Val 245 250 255	827
cag tac gct act gac tcg atg acc tcg cag ggt aaa ggg ctg tcg cag Gln Tyr Ala Thr Asp Ser Met Thr Ser Gln Gly Lys Gly Leu Ser Gln 260 265 270	875
ggt tct ggc gtt gca ttt gat aac gaa aaa ttt gcc tac aat atc aac Gly Ser Gly Val Ala Phe Asp Asn Glu Lys Phe Ala Tyr Asn Ile Asn 275 280 285	923
aac aac ggt cac atg ctg cgt atc ctc gac cac ggt gcg atc tcc atg Asn Asn Gly His Met Leu Arg Ile Leu Asp His Gly Ala Ile Ser Met 290 295 300 305	971
ggc gac aac tgg gac atg atg tac gtg ggt atg tac cag gat atc aac Gly Asp Asn Trp Asp Met Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asp Ile Asn 310 315 320	1019
tgg gat aac gac aac ggc acc aag tgg tgg acc gtc ggt att cgc ccg Trp Asp Asn Asp Asn Gly Thr Lys Trp Trp Thr Val Gly Ile Arg Pro 325 330 335	1067
atg tac aag tgg acg cca atc atg agc acc gtg atg gaa atc ggc tac Met Tyr Lys Trp Thr Pro Ile Met Ser Thr Val Met Glu Ile Gly Tyr 340 345 350	1115
gac aac gtc gaa tcc cag cgc acc ggc gac aag aac aat cag tac aaa Asp Asn Val Glu Ser Gln Arg Thr Gly Asp Lys Asn Asn Gln Tyr Lys 355 360 365	1163
att acc ctc gca caa caa tgg cag gct ggc gac agc atc tgg tca cgc Ile Thr Leu Ala Gln Gln Trp Gln Ala Gly Asp Ser Ile Trp Ser Arg 370 375 380 385	1211
ccg gct att cgt gtc ttc gca acc tac gcc aag tgg gat gag aaa tgg Pro Ala Ile Arg Val Phe Ala Thr Tyr Ala Lys Trp Asp Glu Lys Trp 390 395 400	1259
ggt tac gac tac acc ggt aac gct gat aac aac gcg aac ttc ggc aaa Gly Tyr Asp Tyr Thr Gly Asn Ala Asp Asn Asn Ala Asn Phe Gly Lys 405 410 415	1307
gcc gtt cct gct gat ttc aac ggc ggc agc ttc ggt cgt ggc gac agc Ala Val Pro Ala Asp Phe Asn Gly Gly Ser Phe Gly Arg Gly Asp Ser 420 425 430	1355

ES 2 372 290 T3

gac gag tgg acc ttc ggt gcc cag atg gaa atc tgg tgg taa 1397  
 Asp Glu Trp Thr Phe Gly Ala Gln Met Glu Ile Trp Trp  
 435 440 445

tagcaaaacc tgggccggat aaggcggtta cgccgcattc ggcaaccaac gcctgatgcg 1457

acgcttgcgc gtcttatcag gcctacaacg gctgtaagct t 1498

- <210> 4
- <211> 446
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli

5

<400> 4  
 Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala  
 1 5 10 15

Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp Phe His Gly Tyr Ala  
 20 25 30

Arg Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Ser Gly Gly Glu Gln Gln Cys Phe  
 35 40 45

Gln Thr Thr Gly Ala Gln Ser Lys Tyr Arg Leu Gly Asn Glu Cys Glu  
 50 55 60

Thr Tyr Ala Glu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Val Trp Lys Glu Gly Asp  
 65 70 75 80

Lys Ser Phe Tyr Phe Asp Thr Asn Val Ala Tyr Ser Val Ala Gln Gln  
 85 90 95

Asn Asp Trp Glu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Arg Glu Ala Asn Val Gln  
 100 105 110

Gly Lys Asn Leu Ile Glu Trp Leu Pro Gly Ser Thr Ile Trp Ala Gly  
 115 120 125

Lys Arg Phe Tyr Gln Arg His Asp Val His Met Ile Asp Phe Tyr Tyr  
 130 135 140

Trp Asp Ile Ser Gly Pro Gly Ala Gly Leu Glu Asn Ile Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Phe Gly Lys Leu Ser Leu Ala Ala Thr Arg Ser Ser Glu Ala Gly Gly  
 165 170 175

Ser Ser Ser Phe Ala Ser Asn Asn Ile Tyr Asp Tyr Thr Asn Glu Thr  
 180 185 190

ES 2 372 290 T3

Ala Asn Asp Val Phe Asp Val Arg Leu Ala Gln Met Glu Ile Asn Pro  
 195 200 205

Gly Gly Thr Leu Glu Leu Gly Val Asp Tyr Gly Arg Ala Asn Leu Arg  
 210 215 220

Asp Asn Tyr Arg Leu Val Asp Gly Ala Ser Lys Asp Gly Trp Leu Phe  
 225 230 235 240

Thr Ala Glu His Thr Gln Ser Val Leu Lys Gly Phe Asn Lys Phe Val  
 245 250 255

Val Gln Tyr Ala Thr Asp Ser Met Thr Ser Gln Gly Lys Gly Leu Ser  
 260 265 270

Gln Gly Ser Gly Val Ala Phe Asp Asn Glu Lys Phe Ala Tyr Asn Ile  
 275 280 285

Asn Asn Asn Gly His Met Leu Arg Ile Leu Asp His Gly Ala Ile Ser  
 290 295 300

Met Gly Asp Asn Trp Asp Met Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asp Ile  
 305 310 315 320

Asn Trp Asp Asn Asp Asn Gly Thr Lys Trp Trp Thr Val Gly Ile Arg  
 325 330 335

Pro Met Tyr Lys Trp Thr Pro Ile Met Ser Thr Val Met Glu Ile Gly  
 340 345 350

Tyr Asp Asn Val Glu Ser Gln Arg Thr Gly Asp Lys Asn Asn Gln Tyr  
 355 360 365

Lys Ile Thr Leu Ala Gln Gln Trp Gln Ala Gly Asp Ser Ile Trp Ser  
 370 375 380

Arg Pro Ala Ile Arg Val Phe Ala Thr Tyr Ala Lys Trp Asp Glu Lys  
 385 390 395 400

Trp Gly Tyr Asp Tyr Thr Gly Asn Ala Asp Asn Asn Ala Asn Phe Gly  
 405 410 415

Lys Ala Val Pro Ala Asp Phe Asn Gly Gly Ser Phe Gly Arg Gly Asp  
 420 425 430

Ser Asp Glu Trp Thr Phe Gly Ala Gln Met Glu Ile Trp Trp  
 435 440 445

ES 2 372 290 T3

<210> 5  
 <211> 1341  
 <212> ADN  
 <213> Shigella flexneri

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1341)  
 <223> zona codificadora de lamB

10

<400> 5  
 atg atg att act ctg cgc aaa ctt cct ctg gcg gtt gcc gtc gca gcg 48  
 Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala  
 1 5 10 15  
 ggc gta atg tct gct cag gca atg gct gtt gat ttc cac ggc tat gca 96  
 Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp Phe His Gly Tyr Ala  
 20 25 30  
 cgt tcc ggt att ggc tgg aca ggt agc ggc ggt gaa caa cag tgt ttc 144  
 Arg Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Ser Gly Gly Glu Gln Gln Cys Phe  
 35 40 45  
 cag act acc ggt gct caa agt aaa tac cgt ctt ggc aac gaa tgt gaa 192  
 Gln Thr Thr Gly Ala Gln Ser Lys Tyr Arg Leu Gly Asn Glu Cys Glu  
 50 55 60  
 act tat gct gaa tta aaa ttg ggt cag gaa gtg tgg aaa gag ggc gat 240  
 Thr Tyr Ala Glu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Val Trp Lys Glu Gly Asp  
 65 70 75 80  
 aag agc ttc tat ttc gac act aac gtg gcc tat tcc gtc gcg caa cag 288  
 Lys Ser Phe Tyr Phe Asp Thr Asn Val Ala Tyr Ser Val Ala Gln Gln  
 85 90 95  
 aat gac tgg gaa gct acc gat ccg gcc ttc cgt gaa gca aac gtg cag 336  
 Asn Asp Trp Glu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Arg Glu Ala Asn Val Gln  
 100 105 110  
 gga aaa aac ctg atc gaa tgg ctg cca ggt tcc acc atc tgg gca ggt 384  
 Gly Lys Asn Leu Ile Glu Trp Leu Pro Gly Ser Thr Ile Trp Ala Gly  
 115 120 125  
 aag cgc ttc tac caa cgt cat gac gtt cat atg atc gac ttc tac tac 432  
 Lys Arg Phe Tyr Gln Arg His Asp Val His Met Ile Asp Phe Tyr Tyr  
 130 135 140  
 tgg gat att tct ggt cct ggt gcc ggt ctg gaa aac atc gat gtt ggc 480  
 Trp Asp Ile Ser Gly Pro Gly Ala Gly Leu Glu Asn Ile Asp Val Gly  
 145 150 155 160  
 ttc ggt aaa ctg tct ctg gca gca acc cgc tcc tct gaa gct ggt ggt 528  
 Phe Gly Lys Leu Ser Leu Ala Ala Thr Arg Ser Ser Glu Ala Gly Gly  
 165 170 175  
 tct tcc tct ttt gcc agc aac aat att tat gac tat acc aac gaa acc 576  
 Ser Ser Ser Phe Ala Ser Asn Asn Ile Tyr Asp Tyr Thr Asn Glu Thr  
 180 185 190  
 gcg aac gac gtt ttc gat gtg cgt tta gcg cag atg gaa atc aac ccg 624  
 Ala Asn Asp Val Phe Asp Val Arg Leu Ala Gln Met Glu Ile Asn Pro  
 195 200 205

ES 2 372 290 T3

ggc ggc aca tta gaa ctg ggt gtc gac tac ggt cgt gcc aac ctg cgt Gly Gly Thr Leu Glu Leu Gly Val Asp Tyr Gly Arg Ala Asn Leu Arg 210 215 220	672
gat aac tat cgt ctg gtt gat ggc gca tcg aaa gac ggc tgg tta ttc Asp Asn Tyr Arg Leu Val Asp Gly Ala Ser Lys Asp Gly Trp Leu Phe 225 230 235 240	720
act gct gaa cat act cag agt gtc ctg aag ggc ttt aac aag ttt gtt Thr Ala Glu His Thr Gln Ser Val Leu Lys Gly Phe Asn Lys Phe Val 245 250 255	768
ggt cag tac gct act gac tcg atg acc tcg cag ggt aaa ggt ctg tcg Val Gln Tyr Ala Thr Asp Ser Met Thr Ser Gln Gly Lys Gly Leu Ser 260 265 270	816
cag ggt tct ggc gtc gcg ttt gat aac gaa aaa ttt gcc tac aat atc Gln Gly Ser Gly Val Ala Phe Asp Asn Glu Lys Phe Ala Tyr Asn Ile 275 280 285	864
aac aac aac ggt cac atg ctg cgt atc ctc gac cac ggt gcg atc tcc Asn Asn Asn Gly His Met Leu Arg Ile Leu Asp His Gly Ala Ile Ser 290 295 300	912
atg ggc gac aac tgg gac atg atg tac gtg ggt atg tac cag gat atc Met Gly Asp Asn Trp Asp Met Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asp Ile 305 310 315 320	960
aac tgg gat aac gac aac ggc acc aag tgg tgg acc gtt ggt att cgc Asn Trp Asp Asn Asp Asn Gly Thr Lys Trp Trp Thr Val Gly Ile Arg 325 330 335	1008
ccg atg tac aag tgg acg cca atc atg agc acc gtg atg gaa atc ggc Pro Met Tyr Lys Trp Thr Pro Ile Met Ser Thr Val Met Glu Ile Gly 340 345 350	1056
tac gac aac gtc gaa tcc cag cgc acc ggc gac aag aac aat cag tac Tyr Asp Asn Val Glu Ser Gln Arg Thr Gly Asp Lys Asn Asn Gln Tyr 355 360 365	1104
aaa att acc ctc gca caa caa tgg cag gct ggc gac agc atc tgg tca Lys Ile Thr Leu Ala Gln Gln Trp Gln Ala Gly Asp Ser Ile Trp Ser 370 375 380	1152
cgc ccg gct att cgt gtc ttc gca acc tac gcc aag tgg gat gag aaa Arg Pro Ala Ile Arg Val Phe Ala Thr Tyr Ala Lys Trp Asp Glu Lys 385 390 395 400	1200
tgg ggt tac gac tac aac ggc gat agc aag gtt aac ccg aac tac ggc Trp Gly Tyr Asp Tyr Asn Gly Asp Ser Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gly 405 410 415	1248
aaa gcc gtt cct gct gat ttc aac ggc ggc agc ttc ggt cgt ggc gac Lys Ala Val Pro Ala Asp Phe Asn Gly Gly Ser Phe Gly Arg Gly Asp 420 425 430	1296
agc gac gag tgg acc ttc ggt gcc cag atg gaa atc tgg tgg taa Ser Asp Glu Trp Thr Phe Gly Ala Gln Met Glu Ile Trp Trp 435 440 445	1341

ES 2 372 290 T3

<210> 6  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> Shigella flexneri

5

<400> 6

Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala  
 1 5 10 15

Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp Phe His Gly Tyr Ala  
 20 25 30

Arg Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Ser Gly Gly Glu Gln Gln Cys Phe  
 35 40 45

Gln Thr Thr Gly Ala Gln Ser Lys Tyr Arg Leu Gly Asn Glu Cys Glu  
 50 55 60

Thr Tyr Ala Glu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Val Trp Lys Glu Gly Asp  
 65 70 75 80

Lys Ser Phe Tyr Phe Asp Thr Asn Val Ala Tyr Ser Val Ala Gln Gln  
 85 90 95

Asn Asp Trp Glu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Arg Glu Ala Asn Val Gln  
 100 105 110

Gly Lys Asn Leu Ile Glu Trp Leu Pro Gly Ser Thr Ile Trp Ala Gly  
 115 120 125

Lys Arg Phe Tyr Gln Arg His Asp Val His Met Ile Asp Phe Tyr Tyr  
 130 135 140

Trp Asp Ile Ser Gly Pro Gly Ala Gly Leu Glu Asn Ile Asp Val Gly  
 145 150 155 160

Phe Gly Lys Leu Ser Leu Ala Ala Thr Arg Ser Ser Glu Ala Gly Gly  
 165 170 175

Ser Ser Ser Phe Ala Ser Asn Asn Ile Tyr Asp Tyr Thr Asn Glu Thr  
 180 185 190

Ala Asn Asp Val Phe Asp Val Arg Leu Ala Gln Met Glu Ile Asn Pro  
 195 200 205

Gly Gly Thr Leu Glu Leu Gly Val Asp Tyr Gly Arg Ala Asn Leu Arg  
 210 215 220

ES 2 372 290 T3

Asp Asn Tyr Arg Leu Val Asp Gly Ala Ser Lys Asp Gly Trp Leu Phe  
225 230 235 240

Thr Ala Glu His Thr Gln Ser Val Leu Lys Gly Phe Asn Lys Phe Val  
245 250 255

Val Gln Tyr Ala Thr Asp Ser Met Thr Ser Gln Gly Lys Gly Leu Ser  
260 265 270

Gln Gly Ser Gly Val Ala Phe Asp Asn Glu Lys Phe Ala Tyr Asn Ile  
275 280 285

Asn Asn Asn Gly His Met Leu Arg Ile Leu Asp His Gly Ala Ile Ser  
290 295 300

Met Gly Asp Asn Trp Asp Met Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asp Ile  
305 310 315 320

Asn Trp Asp Asn Asp Asn Gly Thr Lys Trp Trp Thr Val Gly Ile Arg  
325 330 335

Pro Met Tyr Lys Trp Thr Pro Ile Met Ser Thr Val Met Glu Ile Gly  
340 345 350

Tyr Asp Asn Val Glu Ser Gln Arg Thr Gly Asp Lys Asn Asn Gln Tyr  
355 360 365

Lys Ile Thr Leu Ala Gln Gln Trp Gln Ala Gly Asp Ser Ile Trp Ser  
370 375 380 -

Arg Pro Ala Ile Arg Val Phe Ala Thr Tyr Ala Lys Trp Asp Glu Lys  
385 390 395 400

Trp Gly Tyr Asp Tyr Asn Gly Asp Ser Lys Val Asn Pro Asn Tyr Gly  
405 410 415

Lys Ala Val Pro Ala Asp Phe Asn Gly Gly Ser Phe Gly Arg Gly Asp  
420 425 430

Ser Asp Glu Trp Thr Phe Gly Ala Gln Met Glu Ile Trp Trp  
435 440 445

<210> 7

<211> 1359

<212> ADN

5 <213> Salmonella typhimurium

ES 2 372 290 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (1359)  
 <223> zona codificadora de lamB

5

<400> 7

atg atg att act ctg cgc aaa ctc cca ctg gcg gtt gct gtc gca gcg	48
Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala	
1 5 10 15	
ggc gta atg tcc gct cag gca atg gct gtc gat ttc cac ggt tac gcc	96
Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp Phe His Gly Tyr Ala	
20 25 30	
cgt tcc ggt att ggc tgg acg gga agc ggc ggc gaa caa cag tgt ttc	144
Arg Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Ser Gly Gly Glu Gln Gln Cys Phe	
35 40 45	
cag gca acg ggt gcc caa agt aaa tac cgt ctc ggt aac gaa tgt gaa	192
Gln Ala Thr Gly Ala Gln Ser Lys Tyr Arg Leu Gly Asn Glu Cys Glu	
50 55 60	
acc tat gcg gaa ctg aaa ctg ggc cag gaa gtg tgg aaa gag ggc gat	240
Thr Tyr Ala Glu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Val Trp Lys Glu Gly Asp	
65 70 75 80	
aag agc ttc tat ttc gac acc aac gtc gcc tat tcg gtt aac cag cag	288
Lys Ser Phe Tyr Phe Asp Thr Asn Val Ala Tyr Ser Val Asn Gln Gln	
85 90 95	
aac gac tgg gaa tcg acc gat ccc gcc ttc cgc gaa gcg aac gtg cag	336
Asn Asp Trp Glu Ser Thr Asp Pro Ala Phe Arg Glu Ala Asn Val Gln	
100 105 110	
ggt aaa aac ctg att gaa tgg ctg ccg ggc tct acc atc tgg gcc ggt	384
Gly Lys Asn Leu Ile Glu Trp Leu Pro Gly Ser Thr Ile Trp Ala Gly	
115 120 125	
aag cgc ttc tat cag cgt cat gac gta cac atg atc gac ttc tac tac	432
Lys Arg Phe Tyr Gln Arg His Asp Val His Met Ile Asp Phe Tyr Tyr	
130 135 140	
tgg gat att tca ggt cct ggc gca ggt atc gaa aat atc gat ctg ggc	480
Trp Asp Ile Ser Gly Pro Gly Ala Gly Ile Glu Asn Ile Asp Leu Gly	
145 150 155 160	
ttc ggt aag ctt tca ctg gcg gcg acc cgg tct act gaa gcg ggc ggc	528
Phe Gly Lys Leu Ser Leu Ala Ala Thr Arg Ser Thr Glu Ala Gly Gly	
165 170 175	
tct tac acc ttc agc agc cag aat att tat gat gaa gtg aaa gat acc	576
Ser Tyr Thr Phe Ser Ser Gln Asn Ile Tyr Asp Glu Val Lys Asp Thr	
180 185 190	
gct aac gac gtc ttt gac gta cgt ctg gct ggt ctg caa acg aac ccg	624
Ala Asn Asp Val Phe Asp Val Arg Leu Ala Gly Leu Gln Thr Asn Pro	
195 200 205	
gac ggc gta ctg gag cta ggc gtt gat tac ggt cgc gcc aat acg acc	672
Asp Gly Val Leu Glu Leu Gly Val Asp Tyr Gly Arg Ala Asn Thr Thr	
210 215 220	
gat ggt tat aag ctg gct gat ggg gca tcg aaa gac ggc tgg atg ttc	720
Asp Gly Tyr Lys Leu Ala Asp Gly Ala Ser Lys Asp Gly Trp Met Phe	
225 230 235 240	



ES 2 372 290 T3

acc gcc gaa cac acg caa agc atg ttg aaa ggc tat aac aag ttt gtc 768  
 Thr Ala Glu His Thr Gln Ser Met Leu Lys Gly Tyr Asn Lys Phe Val  
 245 250 255

gtg caa tat gcc acc gat gcc atg acc acg cag ggt aaa ggc cag gcg 816  
 Val Gln Tyr Ala Thr Asp Ala Met Thr Thr Gln Gly Lys Gly Gln Ala  
 260 265 270

cgc ggt tcc gac ggt tct tca tct ttc act gaa gaa ttg tct gat gga 864  
 Arg Gly Ser Asp Gly Ser Ser Ser Phe Thr Glu Glu Leu Ser Asp Gly  
 275 280 285

acc aaa att aat tac gcc aat aag gtc atc aat aat aat ggc aat atg 912  
 Thr Lys Ile Asn Tyr Ala Asn Lys Val Ile Asn Asn Asn Gly Asn Met  
 290 295 300

tgg cgt att ttg gat cat ggc gcc atc tcg ctt ggt gat aaa tgg gat 960  
 Trp Arg Ile Leu Asp His Gly Ala Ile Ser Leu Gly Asp Lys Trp Asp  
 305 310 315 320

ttg atg tac gtc ggt atg tac cag aat atc gat tgg gat aat aac ctg 1008  
 Leu Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asn Ile Asp Trp Asp Asn Asn Leu  
 325 330 335

ggt act gag tgg tgg acc gtg ggt gta cgt cca atg tac aag tgg acg 1056  
 Gly Thr Glu Trp Trp Thr Val Gly Val Arg Pro Met Tyr Lys Trp Thr  
 340 345 350

cca atc atg agc acc ctg ctg gaa gtc ggc tac gac aac gtg aaa tct 1104  
 Pro Ile Met Ser Thr Leu Leu Glu Val Gly Tyr Asp Asn Val Lys Ser  
 355 360 365

cag cag acc ggc gat cgt aac aat caa tat aaa atc acc ctg gcg caa 1152  
 Gln Gln Thr Gly Asp Arg Asn Asn Gln Tyr Lys Ile Thr Leu Ala Gln  
 370 375 380

cag tgg cag gcg ggc gac agc atc tgg tcg cgt ccg gct atc cgt att 1200  
 Gln Trp Gln Ala Gly Asp Ser Ile Trp Ser Arg Pro Ala Ile Arg Ile  
 385 390 395 400

ttc gcc acc tac gcg aaa tgg gat gag aaa tgg ggc tat atc aaa gac 1248  
 Phe Ala Thr Tyr Ala Lys Trp Asp Glu Lys Trp Gly Tyr Ile Lys Asp  
 405 410 415

ggc gat aac att tcc cgt tat gcc gca gcg act aac tcc ggc att tcc 1296  
 Gly Asp Asn Ile Ser Arg Tyr Ala Ala Ala Thr Asn Ser Gly Ile Ser  
 420 425 430

acc aac agc cgt ggc gat agc gat gag tgg acc ttc ggc gcc cag atg 1344  
 Thr Asn Ser Arg Gly Asp Ser Asp Glu Trp Thr Phe Gly Ala Gln Met  
 435 440 445

gaa atc tgg tgg taa 1359  
 Glu Ile Trp Trp  
 450

<210> 8  
 <211> 452  
 <212> PRT

5

<213> Salmonella typhimurium

ES 2 372 290 T3

<400> 8

Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala  
 1 5 10 15

Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala Val Asp Phe His Gly Tyr Ala  
 20 25 30

Arg Ser Gly Ile Gly Trp Thr Gly Ser Gly Gly Glu Gln Gln Cys Phe  
 35 40 45

Gln Ala Thr Gly Ala Gln Ser Lys Tyr Arg Leu Gly Asn Glu Cys Glu  
 50 55 60

Thr Tyr Ala Glu Leu Lys Leu Gly Gln Glu Val Trp Lys Glu Gly Asp  
 65 70 75 80

Lys Ser Phe Tyr Phe Asp Thr Asn Val Ala Tyr Ser Val Asn Gln Gln  
 85 90 95

Asn Asp Trp Glu Ser Thr Asp Pro Ala Phe Arg Glu Ala Asn Val Gln  
 100 105 110

Gly Lys Asn Leu Ile Glu Trp Leu Pro Gly Ser Thr Ile Trp Ala Gly  
 115 120 125

Lys Arg Phe Tyr Gln Arg His Asp Val His Met Ile Asp Phe Tyr Tyr  
 130 135 140

Trp Asp Ile Ser Gly Pro Gly Ala Gly Ile Glu Asn Ile Asp Leu Gly  
 145 150 155 160

Phe Gly Lys Leu Ser Leu Ala Ala Thr Arg Ser Thr Glu Ala Gly Gly  
 165 170 175

Ser Tyr Thr Phe Ser Ser Gln Asn Ile Tyr Asp Glu Val Lys Asp Thr  
 180 185 190

Ala Asn Asp Val Phe Asp Val Arg Leu Ala Gly Leu Gln Thr Asn Pro  
 195 200 205

Asp Gly Val Leu Glu Leu Gly Val Asp Tyr Gly Arg Ala Asn Thr Thr  
 210 215 220

Asp Gly Tyr Lys Leu Ala Asp Gly Ala Ser Lys Asp Gly Trp Met Phe  
 225 230 235 240

Thr Ala Glu His Thr Gln Ser Met Leu Lys Gly Tyr Asn Lys Phe Val  
 245 250 255

ES 2 372 290 T3

Val Gln Tyr Ala Thr Asp Ala Met Thr Thr Gln Gly Lys Gly Gln Ala  
 260 265 270

Arg Gly Ser Asp Gly Ser Ser Ser Phe Thr Glu Glu Leu Ser Asp Gly  
 275 280 285

Thr Lys Ile Asn Tyr Ala Asn Lys Val Ile Asn Asn Asn Gly Asn Met  
 290 295 300

Trp Arg Ile Leu Asp His Gly Ala Ile Ser Leu Gly Asp Lys Trp Asp  
 305 310 315 320

Leu Met Tyr Val Gly Met Tyr Gln Asn Ile Asp Trp Asp Asn Asn Leu  
 325 330 335

Gly Thr Glu Trp Trp Thr Val Gly Val Arg Pro Met Tyr Lys Trp Thr  
 340 345 350

Pro Ile Met Ser Thr Leu Leu Glu Val Gly Tyr Asp Asn Val Lys Ser  
 355 360 365

Gln Gln Thr Gly Asp Arg Asn Asn Gln Tyr Lys Ile Thr Leu Ala Gln  
 370 375 380

Gln Trp Gln Ala Gly Asp Ser Ile Trp Ser Arg Pro Ala Ile Arg Ile  
 385 390 395 400

Phe Ala Thr Tyr Ala Lys Trp Asp Glu Lys Trp Gly Tyr Ile Lys Asp  
 405 410 415

Gly Asp Asn Ile Ser Arg Tyr Ala Ala Ala Thr Asn Ser Gly Ile Ser  
 420 425 430

Thr Asn Ser Arg Gly Asp Ser Asp Glu Trp Thr Phe Gly Ala Gln Met  
 435 440 445

Glu Ile Trp Trp  
 450

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Microorganismos recombinantes de la familia de las enterobacteriáceas, que contienen un gen lamB sobreexpresado, que codifica un polipéptido con la actividad de la maltoporina LamB, y que producen L-aminoácidos, y que se enriquecen en un medio, obteniéndose la sobreexpresión mediante la transformación de una cepa, que produce L-aminoácidos, con un plásmido, que lleva el gen lamB.
- 10 2. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 1, que contienen adicionalmente por lo menos un gen del operón thrABC, que codifica la aspartato cinasa, la homoserina deshidrogenasa, la homoserina cinasa y la treonina sintasa, y que producen L-treonina.
- 15 3. Microorganismo de la familia de las enterobacteriáceas de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en las que se sobreexpresa un polinucleótido, que codifica un polipéptido, que es idéntico en por lo menos un 90 %, en particular en por lo menos un 95 %, de manera preferida en un 99 % a una secuencia de aminoácidos, que se escoge entre el conjunto que se compone de las SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 y SEQ ID No. 8, poseyendo el polipéptido la actividad de la maltoporina lamB.
- 20 4. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 3, que contienen un polinucleótido sobreexpresado, que corresponde al gen lamB, que se escoge entre el conjunto que se compone de:
- 25 a) un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7;
- b) un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos, que corresponde a las de las SEQ ID No.3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7 dentro del marco de la degeneración del código genético;
- 30 c) una secuencia de polinucleótidos con una secuencia, que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia complementaria con respecto a las SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7 ;
- d) un polinucleótido con una secuencia SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7, que contiene unos mutantes con sentido, neutros en función.
- 35 5. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 3, poseyendo el polipéptido una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en por lo menos un 95 % a una de las secuencias, que se escogen entre el conjunto que se compone de las SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 y SEQ ID No. 8.
- 40 6. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 3, teniendo el polipéptido una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la de las SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 o SEQ ID No. 8.
7. Microorganismos de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6, en los que el número de copias del gen lamB o de las secuencias de polinucleótidos con esta función se presenta aumentado en por lo menos 1.
- 45 8. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 7, realizándose que el aumento del número de copias del gen lamB en por lo menos 1 se establece mediante integración del gen o de las secuencias de polinucleótidos con esta función en el cromosoma de los microorganismos.
9. Microorganismos de acuerdo con la reivindicación 7, realizándose que el aumento del número de copias del gen lamB en por lo menos 1 se consigue mediante un vector que se replica fuera del cromosoma.
- 50 10. Microorganismos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 hasta 9, en los que mediante el refuerzo del gen lamB, la concentración o la actividad del producto génico LamB (una proteína) se aumenta en por lo menos un 10 %, referido a la actividad o a la concentración del producto génico en la cepa de partida no recombinante.
- 55 11. Microorganismos de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 10, estando caracterizados los microorganismos porque se escogen entre los géneros Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia.
- 60 12. Procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediante fermentación de microorganismos recombinantes de la familia de las enterobacteriáceas, caracterizado porque
- a) los microorganismos, que producen el L-aminoácido deseado de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 11 se cultivan en un medio en unas condiciones, en las que el deseado L-aminoácido se enriquece en el medio, y

- b) se aísla el deseado L-aminoácido, realizándose que ciertos componentes del caldo de fermentación y/o la biomasa permanecen en su totalidad o en ciertas proporciones ( $\geq 0$  hasta 100 %) en el producto aislado o son eliminados totalmente.
- 5 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque para la producción de L-treonina se fermentan unos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, en los que se sobreexpresa(n) adicionalmente de manera simultánea uno o varios de los genes, que se escoge(n) entre el conjunto que se compone de
- 10 a) por lo menos un gen del operón thrABC, que codifica la aspartato cinasa, la homoserina deshidrogenasa, la homoserina cinasa y la treonina sintasa,
- b) el gen pyc, que codifica la piruvato carboxilasa, de *Corynebacterium glutamicum*,
- 15 c) el gen pps, que codifica la fosfoenolpiruvato sintasa,
- d) el gen ppc, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa,
- e) los genes pntA y pntB, que codifican las subunidades de la piridina transhidrogenasa,
- 20 f) el gen rhtB, que codifica la proteína que media para la resistencia frente a homoserina,
- g) el gen rhtC, que codifica la proteína que media en la resistencia frente a treonina,
- 25 h) el gen thrE, que codifica la proteína de vehículo y exportación de treonina procedente de *Corynebacterium glutamicum*,
- i) el gen gdhA, que codifica la glutamato deshidrogenasa,
- 30 k) el gen pgm, que codifica la fosfoglucomutasa,
- l) el gen fba, que codifica la fructosa bifosfato aldolasa,
- m) el gen ptsH, que codifica la fosfohistidina proteína hexosa fosfotransferasa,
- 35 n) el gen ptsI, que codifica la enzima I del sistema de la fosfotransferasa,
- o) el gen crr, que codifica el componente IIA, que es específico para la glucosa,
- 40 p) el gen ptsG, que codifica el componente IIBC, que es específico para la glucosa,
- q) el gen lrp, que codifica el regulador del regulón de leucina,
- r) el gen fadR, que codifica el regulador del regulón de fad,
- 45 s) el gen iclR, que codifica el regulador del metabolismo intermediario central,
- t) el gen ahpC, que codifica la subunidad pequeña de la alquil hidroperóxido reductasa,
- 50 u) el gen ahpF, que codifica la subunidad grande de la alquil hidroperóxido reductasa,
- v) el gen cysK, que codifica la cisteína sintasa A,
- w) el gen cysB, que codifica el regulador del regulón de cys,
- 55 x) el gen cysJ, que codifica la flavoproteína de la NADPH sulfito reductasa,
- y) el gen cysI, que codifica la hemoproteína de la NADPH sulfito reductasa,
- 60 z) el gen cysH, que codifica la adenililsulfato reductasa,
- z1) el gen rseA, que codifica una proteína de membrana con actividad anti-sigmaE,
- z2) el gen rseC, que codifica un regulador global del factor sigmaE,

- z3) el gen *sucA*, que codifica la subunidad de descarboxilasa de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 5 z4) el gen *sucB*, que codifica la subunidad de dihidrolipoil transsuccinasa E2 de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- z5) el gen *sucC*, que codifica la subunidad  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa,
- 10 z6) el gen *sucD*, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la succinil-CoA sintetasa,
- z7) el gen *aceE*, que codifica el componente E1 del complejo de la piruvato deshidrogenasa,
- z8) el gen *aceF*, que codifica el componente E2 del complejo de la piruvato deshidrogenasa,
- 15 z9) el gen *rseB*, que codifica el regulador de la actividad del factor sigmaE,
- z10) el gen *malT*, que codifica el regulador positivo de la transcripción del regulón de maltosa,
- z11) el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) *yaaU* de *Escherichia coli*,
- 20 z12) el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) *yodA* de *Escherichia coli* y
- z13) el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) *yibD* de *Escherichia coli*.
- 25 14. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado porque para la producción de L-treonina se fermentan unos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, en los que se desconecta(n) adicionalmente de manera simultánea uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de:
- 30 a) el gen *tdh*, que codifica la treonina deshidrogenasa
- b) el gen *mdh*, que codifica la malato deshidrogenasa,
- c) el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) *yjFA* de *Escherichia coli*
- 35 d) el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) *ytfP* de *Escherichia coli*,
- e) el gen *pckA*, que codifica la enzima fosfoenolpiruvato descarboxilasa,
- 40 f) el gen *poxB*, que codifica la piruvato oxidasa,
- g) el gen *dgsA*, que codifica el regulador DgsA del sistema de la fosfotransferasa,
- h) el gen *fruR*, que codifica el represor de la fructosa,
- 45 i) el gen *rpoS*, que codifica el factor sigma<sup>38</sup> y
- j) el gen *aspA*, que codifica la aspartato amonio liasa.
- 50 15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque se producen los L-aminoácidos que se escogen entre el conjunto que se compone de L-asparagina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-arginina y L-homoserina.
- 55 16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque se producen unos L-aminoácidos, que se escogen entre el conjunto que se compone de L-isoleucina, L-valina, L-metionina, L-homoserina, L-triptófano, L-treonina y L-lisina.

Figura 1: Mapa del plásmido pTrc99AlamB

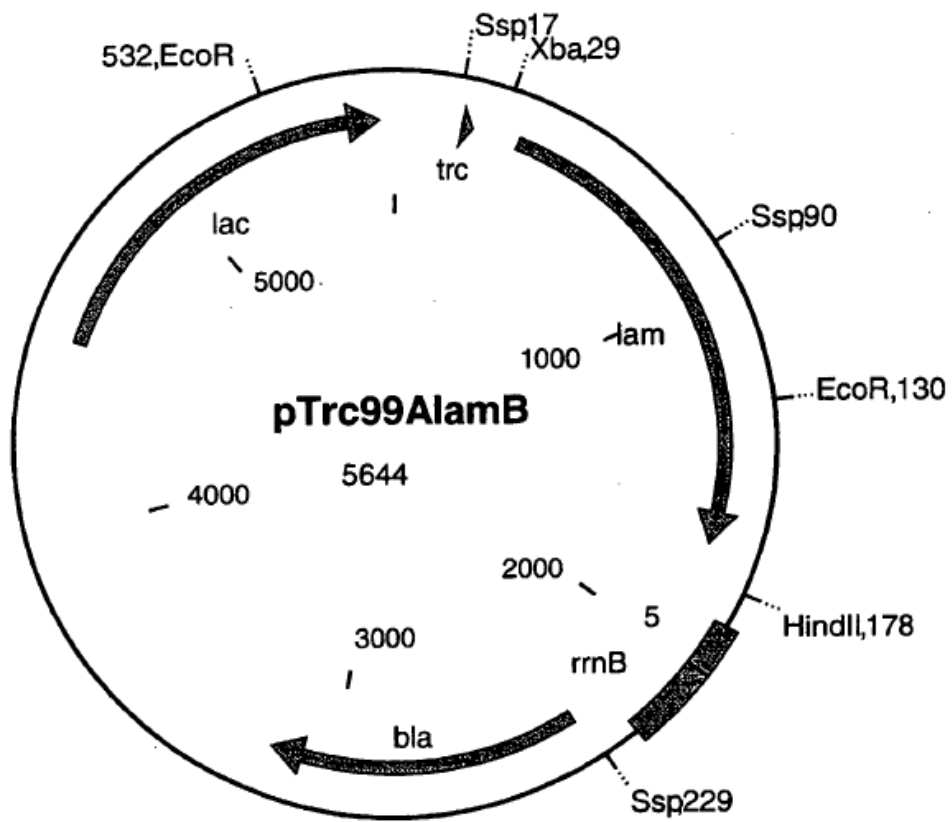


Figura 2: Mapa del plásmido pMW218lamB

