

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 985**

51 Int. Cl.:
C12P 13/04 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03743351 .3**
96 Fecha de presentación: **28.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1481075**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54 Título: **Bacterias productoras de L-treonina y un procedimiento para preparar L-treonina**

30 Prioridad:
07.03.2002 DE 10210170
25.09.2002 DE 10244581

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2012

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

72 Inventor/es:
RIEPING, Mechthild y
SIEBELT, Nicole

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 378 985 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

Bacterias productoras de L-treonina y un procedimiento para preparar L-treonina

5 Campo de la invención

La invención se refiere a bacterias de la especie *Escherichia coli*, productoras de L-treonina, que contienen un codón de terminación del tipo ámbar en la secuencia de nucleótidos de la región codificadora del gen *rpoS* y el correspondiente supresor para el codón de terminación, el supresor ámbar SupE. Esta invención se refiere también a un procedimiento para preparar L-treonina utilizando estas bacterias.

Técnica anterior

15 L-aminoácidos, en particular L-treonina, se utilizan en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y, de manera muy particular, en piensos para animales.

Es conocido que los L-aminoácidos se preparan mediante fermentación de cepas de *Enterobacteriaceae*, en particular *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*. Se han buscado siempre mejoras en los métodos de preparación debido a la gran importancia de este procedimiento. Las mejoras en el procedimiento pueden referirse a las medidas tecnológicas de la fermentación tales como, p. ej., agitación y suministro de oxígeno, o la composición de los medios nutricios tales como, p. ej., la concentración de azúcar durante la fermentación, o el tratamiento para obtener la forma de producto, p. ej., mediante cromatografía de intercambio de iones, o las características de comportamiento intrínseco del propio microorganismo.

25 Para mejorar las características de comportamiento de estos microorganismos, se utilizan los métodos de mutagénesis, selección y selección de mutantes. De este modo, se obtienen cepas que son resistentes a antimetabolitos tales como p. ej., el análogo de treonina, ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV), o son auxotróficas para importantes metabolitos reguladores y producen L-aminoácidos tales como p. ej., L-treonina.

30 Los métodos de la ingeniería de ADN recombinante también se han utilizado durante un cierto número de años para la mejora de la cepa de cepas productoras de L-aminoácidos de la familia *Enterobacteriaceae*, al multiplicar genes individuales para la biosíntesis de aminoácidos y someter a ensayo el efecto sobre la producción.

35 El gen *rpoS*, que también se conoce bajo el nombre de gen *katF*, codifica una proteína que se denomina el factor σ^{38} o factor σ^S , la proteína σ^{38} o la subunidad σ^{38} o incluso la proteína RpoS. En la bibliografía se encuentran también los siguientes nombres para el gen *rpoS*, aunque menos habitualmente: *abrD*, *dpeB*, *appR*, *sigS*, *otsX* y *snrA*. El factor σ^S , en calidad de una subunidad de ARN-polimerasa, controla la expresión de una amplia diversidad de diferentes grupos de genes (Loewen et al.; *Canadian Journal of Microbiology* 44 (8): 707-717 (1998)), en donde los mecanismos de regulación son a menudo poco claros.

40 Datos sobre la secuencia de nucleótidos del gen *rpoS* o *katF* se pueden encontrar en Mulvey y Loewen (*Nucleic Acids Research* 17 (23): 9979-9991 (1989)) y en Blattner et al. (*Science* 277: 1453-1462 (1997)). Datos correspondientes también se pueden encontrar en el Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina (Bethesda, MD, EE.UU.) bajo los números de acceso X16400 y AE000358. El inicio de la traducción o el codón de iniciación para el gen *rpoS* se determinó por Loewen et al. (*Journal of Bacteriology* 175 (7): 2150-2153 (1993)).

45 Además, se conoce un cierto número de alelos *rpoS* en cepas de *Escherichia coli*, por ejemplo en cepas del tipo W3110 (Ivanova et al.; *Nucleic Acids Research* 20 (20): 5479-5480 (1992)) y Jishage e Ishihama; *Journal of Bacteriology* 179 (3): 959-963 (1997)).

En el documento WO 01/05939 se demuestra que, después de una desconexión completa del factor σ^{38} al incorporar una delección en el gen *rpoS* de un productor de ácido L-glutámico, se mejora la producción de ácido glutámico.

55 Nagano et al. (*Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 64 (9): 2012-2017 (2000)) informan sobre una cepa W3110 de *Escherichia coli* y los mutantes W196 productores de L-lisina, conteniendo ambos un alelo *rpoS* que contiene un codón de terminación ámbar (TAG) en el punto correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína σ^{38} . La cepa W196 contiene también una mutación en el gen *serU* que codifica ARNt de L-serina que se denomina *supD*.

60

Descripción de la invención

Siempre que se mencionen aminoácidos o L-aminoácidos en lo que sigue, estos pretenden cubrir todos los aminoácidos proteínogénicos, con la excepción de L-lisina. Esto significa, en particular, L-treonina, L-isoleucina, L-homoserina, L-metionina, ácido L-glutámico, L-valina y L-triptófano, en donde se prefiere L-treonina.

“Aminoácidos proteínogénicos” se entiende que son aquellos aminoácidos que son constituyentes de proteínas. Estos incluyen los aminoácidos L-glicina, L-alanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-serina, L-treonina, L-cisteína, L-metionina, L-prolina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano, L-asparagina, L-glutamina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-arginina, L-lisina, L-histidina y L-selenocisteína.

La invención proporciona bacterias de la especie *Escherichia coli*, productoras de L-treonina, que son resistentes al ácido α -amino- β -hidroxivalérico (= AHV) y que 1) contienen un codón de terminación del tipo ámbar en la secuencia de nucleótidos de la región codificadora del gen *rpoS*, y 2) contienen el correspondiente supresor para el codón de terminación, supresor ámbar *supE*, en donde el codón de terminación del tipo ámbar se encuentra dentro de la región codificadora del gen *rpoS* correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS de acuerdo con SEQ ID NO. 2.

Las bacterias proporcionadas por la presente invención, pueden producir L-treonina a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, opcionalmente almidón, opcionalmente celulosa o a partir de glicerol y etanol. Son representantes de la familia Enterobacteriaceae, elegidos de la especie *Escherichia coli*.

Las bacterias productoras de L-treonina proporcionadas por la presente invención pueden, entre otros, producir opcionalmente L-lisina como un producto secundario, además del L-aminoácido deseado. Bacterias de acuerdo con la invención producen a lo sumo 0 a 40% o 0 a 20%, preferiblemente a lo sumo 0 a 10%, de manera particularmente preferida a lo sumo 0 a 5% de L-lisina en comparación con la cantidad de L-aminoácido deseada. Estos datos de porcentaje corresponden al porcentaje en peso.

Cepas productoras de L-treonina de la familia Enterobacteriaceae poseen, preferiblemente, entre otros, uno o más de los rasgos genéticos o fenotípicos seleccionados del grupo: resistencia a ácido α -amino- β -hidroxivalérico, resistencia a tialisina, resistencia a etionina, resistencia a α -metilserina, resistencia a ácido diaminosuccínico, resistencia a ácido α -aminobutírico, resistencia a borrelidina, resistencia a rifampicina, resistencia a análogos de valina tales como, por ejemplo, hidroxamato de valina, resistencia a análogos de purina tales como, por ejemplo, 6-dimetilaminopurina, una necesidad de L-metionina, una necesidad, opcionalmente parcial y compensable, de L-isoleucina, una necesidad de ácido meso-diaminopimélico, una auxotrofia con respecto a dipéptidos con contenido en treonina, resistencia a L-treonina, resistencia a L-homoserina, resistencia a L-lisina, resistencia a L-metionina, resistencia a ácido L-glutámico, resistencia a L-aspartato, resistencia a L-leucina, resistencia a L-fenilalanina, resistencia a L-serina, resistencia a L-cisteína, resistencia a L-valina, sensibilidad a fluoropiruvato, treonina deshidrogenasa defectuosa, opcionalmente una capacidad para hacer uso de sacarosa, potenciación del operón treonina, potenciación de homoserina deshidrogenasa I-aspartato quinasa I, preferiblemente la forma resistente a la retroalimentación, potenciación de homoserina quinasa, potenciación de treonina sintasa, potenciación de aspartato quinasa, opcionalmente la forma resistente a la retroalimentación, potenciación de aspartato semialdehído deshidrogenasa, potenciación de fosfoenolpiruvato carboxilasa, opcionalmente la forma resistente a la retroalimentación, potenciación de fosfoenolpiruvato sintasa, potenciación de transhidrogenasa, potenciación del producto génico RhtB, potenciación del producto génico RhtC, potenciación del producto génico YfiK, potenciación de un piruvato carboxilasa, y atenuación de la formación de ácido acético.

Se entiende que un codón de terminación del tipo ámbar es un codón de terminación con la secuencia de bases TAG en la cadena codificadora en una molécula de ADN correspondiente a UAG en el ARNm leído por esta molécula de ADN.

Un codón de terminación del tipo ocre de acuerdo con la descripción se entiende que es un codón de terminación con la secuencia de bases TAA en la cadena codificadora en una molécula de ADN correspondiente a UAA en el ARNm leído por esta molécula de ADN.

Un codón de terminación del tipo opal de acuerdo con la descripción se entiende que es un codón de terminación con la secuencia de bases TGA en la cadena codificadora en una molécula de ADN correspondiente a UGA en el ARNm leído por esta molécula de ADN.

Los codones de terminación mencionados se denominan también mutaciones sin sentido (Edward A. Birge: *Bacterial and Bacteriophage Genetics* (tercera edición), editorial Springer, Berlín, Alemania, 1994).

La secuencia de nucleótidos para el gen rpoS se puede obtener de la técnica anterior. La secuencia de nucleótidos para el gen rpoS correspondiente al nº de acceso AE000358 se proporciona como SEQ ID NO. 1. La secuencia de aminoácidos del producto génico o proteína RpoS relevante se da en SEQ ID NO. 2.

- 5 La secuencia de nucleótidos para un alelo rpoS que contiene un codón de terminación del tipo ámbar en el punto en la secuencia de nucleótidos correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos del producto génico o proteína RpoS, correspondiente a SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 2, respectivamente, se da en SEQ ID NO. 3.

- 10 La concentración de factor σ^{38} se puede determinar por el método de "transferencia Western" cuantitativo según se describe en Jishage e Ishima (Journal of Bacteriology 177 (23): 6832-6835 (1995)), Jishage et al. (Journal of Bacteriology 178 (18): 5447-5451 (1996)) y Jishage e Ishima (Journal of Bacteriology 179 (3): 959-963 (1997)).

- 15 La supresión se entiende generalmente que es el efecto mediante el cual los efectos de mutación en un "primer" gen se compensan o quedan suprimidos por una mutación en un "segundo" gen. El segundo gen mutado o la segunda mutación se denomina generalmente un supresor o gen supresor.

- 20 Un caso especial de supresores se refiere a alelos de genes de ARNt que codifican moléculas de ARNt anormales que pueden reconocer codones de terminación, de modo que tiene lugar la incorporación de un aminoácido en lugar de la terminación de la cadena durante la traducción. Explicaciones amplias de supresión se pueden encontrar en libros de texto de genética tales como, por ejemplo, el libro de texto de Rolf Knippers "Molekulare Genetik" (6ª edición, editorial Georg Thieme, Stuttgart, Alemania, 1995) o el libro de texto de Ernst-L. Winnacker "Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie" (tercera, reimpresión modificada (VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990) o el libro de texto de F. C. Neidhard (Ed.) "Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology" (2ª edición, ASM Press, Washington, D. C., EE.UU., 1996).

- 25 Los supresores listados en las Tablas 1, 2 y 3 son, entre otros, genes o alelos de ARNt o supresores de ARNt conocidos de la técnica anterior que pueden suprimir codones de terminación del tipo ámbar, ocre u opal y, así, se denominan supresores ámbar, supresores ocre o supresores opal. Los nombres para los genes o alelos particulares y supresores se tomaron de las referencias citadas.

30

Tabla 1

Lista de supresores ámbar

Nombre del gen/alelo supresor	Nombre del ARNt	Aminoácido incorporado	Ref.
supD (= Su1)	ARNt 2 de serina	Ser	1
supE (= Su2, supY)	ARNt 2 de glutamina	Gln	1
supF	ARNt 1 de tirosina	Tyr	1
supP (= Su6)	ARNt 5 de leucina	Leu	1
supU (= su7)	ARNt de triptófano	Trp	1
supZ	ARNt 2 de tirosina	Tyr	1
ARN-t ^{ASP} CUA	ARNt de Asp (CUA)	Lys, Ala, Gln, Arg	2
ARNtPheCUA	ARNt de fenilalanina	Phe	3
ARNtCysCUA	ARNt de cisteína	Cys	3
suIII+ ámbar	ARNt 1 de tirosina	Tyr	4
Su ⁺ 271	ARNt de Gln/Trp	Gln	5
ARG	ARNt de arginina	Arg, Lys	6
ARGII	ARNt de arginina	Arg, Gln	6
LysA20	ARNt de lisina	Lys	6
trpT175	ARNt de triptófano	Gln	7
Su79 (= trpT179)	ARNt de triptófano	Trp	8
ARNtCysCUA	ARNt de cisteína	Cys	9
ARN-t ^{ASP} CUA	ARNt de asparagina	Gln	10
Ala2	ARNt de alanina	Ala	11
Cys	ARNt de cisteína	Lys	11
ProH	ARNt de prolina	Pro	11
HisA	ARNt de histidina	His	11
Gly2	ARNt de glicina	Gly, Gln	11
Gly1	ARNt de glicina	Gly	11

ES 2 378 985 T3

Ile1	ARNt de isoleucina	Gln, Lys	11
Met(f)	ARNt de metionina	Lys	11
Ile2	ARNt de isoleucina	Lys	11
AspM	ARNt de asparagina	Lys	11
Arg	ARNt de arginina	Lys, Arg	11
Thr2	ARNt de treonina	Lys, Thr	11
Val	ARNt de valina	Lys, Val	11
GluA	ARNt de ácido glutámico	Glu, Gln, Tyr, Arg	11
ECF	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF9	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF5-2	ARNt de fenilalanina	Phe, Thr, Tyr	12
ECF10	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF602	ARNt de fenilalanina	Phe, Lys, Thr, Val	12
ECF606	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF11	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF12	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF6	ARNt de fenilalanina	Phe, Thr	12
ECF401	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF402	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF403	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECF403G45	ARNt de fenilalanina	Lys	12
ECF5	ARNt de fenilalanina	Phe	12
ECFG73	ARNt de fenilalanina	Phe, Gln	12

Referencias (Ref.) para la Tabla 1:

- 5 1) Neidhard (comp.) "Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology" (2ª edición, ASM Press, Washington, D. C., EE.UU., 1996)
- 2) Martin et al, RNA 2 (9): 919-927, 1996
- 10 3) Normanly et al, Proceedings of the National Academy of Science USA, 83 (17): 6548-6552, 1986
- 4) Número de Acceso K01197
- 5) Yarus et al, Proceedings of the National Academy of Science USA, 77 (9): 5092-5096, 1990
- 15 6) McClain et al, Proceedings of the National Academy of Science USA, 87 (23): 9260-9264, 1990
- 7) Raftery et al, Journal of Bacteriology 158 (3): 849-859, 1984
- 20 8) Raftery et al, Journal of Molecular Biology 190 (3): 513-517, 1986
- 9) Komatsoulis y Abelson, Biochemistry 32 (29): 7435-7444, 1993
- 10) Martin et al, Nucleic Acids Research 23 (5): 779-784, 1995
- 25 11) Normanly et al, Journal of Molecular Biology 213 (4): 719-726, 1990
- 12) McClain y Foss, Journal of Molecular Biology, 202 (4): 697-709, 1988

Tabla 2

Lista de supresores ocre de acuerdo con la descripción

Nombre del gen/alelo supresor	Nombre del ARNt	Aminoácido incorporado	Ref.
supB	ARNt 1 de glutamina	Gln	1
supC	ARNt 1 de tirosina	Tyr	1
supD	ARNt 3 de serina	Ser	1
supG (= supL, supN)	ARNt de lisina	Lys	1
supM (= supB15)	ARNt 2 de tirosina	Tyr	1
supU (= su8)	ARNt de triptófano	Trp	1
supV	ARNt de triptófano	Trp	1
ARNt ^{Glu} -Su _{oc} 205	ARNt de ácido glutámico	Glu	2
sulll+ ocre	ARNt 1 de tirosina	Tyr	3
trpT177	ARNt de triptófano	Gln	4
Su79 (= trpT179)	ARNt de triptófano	Trp	5

5

Referencias (Ref.) para la Tabla 2:

- 1) Neidhard (comp.) "Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology" (2ª edición, ASM Press, Washington, D. C., EE.UU., 1996)
- 2) Raftery y Yarus, EMBO Journal 6 (5): 1499-1506, 1987
- 3) Número de Acceso K01197
- 4) Raftery et al, Journal of Bacteriology 158 (3): 849-859, 1984
- 5) Raftery et al, Journal of Molecular Biology 190 (3): 513-517, 1986

10

15

20

Tabla 3

Lista de supresores opal de acuerdo con la descripción

Nombre del gen/alelo supresor	Nombre del ARNt	Aminoácido incorporado	Ref.
supT	ARNt 1 de glicina	Gly	1
sumA	ARNt 2 de glicina	Gly	1
ims, mutA	ARNt 3 de glicina	Gly	1
supU (= su9)	ARNt de triptófano	Trp	1
selC	ARNt de serina	Selenocisteína	2
GLNA3U70	ARNt de glutamina	Gln	3
trpT176	ARNt de triptófano	Trp	4
ARG	ARNt de arginina	Arg	5
ARGII	ARNt de arginina	Arg	5
LysA20	ARNt de lisina	Arg	5

Referencias (Ref.) para la Tabla 3:

- 1) Neidhard (Ed.) "Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology" (2ª edición, ASM Press, Washington, D. C., EE.UU., 1996)
- 2) Schön et al, Nucleic Acids Research 17 (18): 7159-7165, 1989
- 3) Weygand-Durasevic et al, Journal of Molecular Biology 240 (2): 111-118, 1994
- 4) Raftery et al, Journal of Bacteriology 158 (3): 849-859, 1984
- 5) McClain et al, Proceedings of the National Academy of Science USA, 87 (23): 9260-9264, 1990.

25

30

35

En un primer aspecto de la invención, se encontró que bacterias de la especie *Escherichia coli*, productoras de L-treonina, que son resistentes a AHV y que contienen un codón de terminación del tipo ámbar están adicionalmente mejoradas en su potencia para producir aminoácidos cuando en ellas se incorpora un ARNt supresor procedente del supresor ámbar, en donde el codón de terminación del tipo ámbar se encuentra dentro de la región codificadora del gen *rpoS* correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS de acuerdo con SEQ ID No. 2.

Como resultado de las medidas de acuerdo con la invención, la actividad o concentración de la proteína RpoS o factor σ^{38} se reduce en general a > 0 hasta 75%, por ejemplo 1 a 75%, a > 0 hasta 50%, por ejemplo 0,5 a 50%, a > 0 hasta 25%, por ejemplo 0,25 a 25%, a > 0 hasta 10%, por ejemplo 0,1 a 10%, o a > 0 hasta 5%, por ejemplo 0,05 a 5% de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo inicial. La presencia del o de los supresores mencionados previene la actividad de las proteínas RpoS o factor σ^{38} que caen hasta 0.

Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento para disminuir la actividad intracelular o concentración de las proteínas RpoS o factor σ^{38} en bacterias de la especie *Escherichia coli*, productoras de L-treonina, que son resistentes a AHV, y en donde en estas bacterias 1) un codón de terminación del tipo ámbar se incorpora en la región codificadora del gen *rpoS*, y 2) en estas bacterias se incorporan el o los genes o el o los alelos de ARNt supresores correspondientes que codifican el ARNt supresor ámbar, supE, en donde el codón de terminación del tipo ámbar se encuentra dentro de la región codificadora del gen *rpoS* correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS, de acuerdo con SEQ ID No. 2

La invención proporciona también un procedimiento para preparar bacterias de la especie *Escherichia coli*, productoras de L-treonina, que son resistentes a AHV, y en donde en estas bacterias 1) un codón de terminación del tipo ámbar se incorpora en la región codificadora del gen *rpoS*, y 2) en estas bacterias se incorpora un ARNt supresor ámbar, supE, en donde el codón de terminación del tipo ámbar se encuentra dentro de la región codificadora del gen *rpoS* correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS, de acuerdo con SEQ ID No. 2

Finalmente, la invención proporciona bacterias de la especie *Escherichia coli*, productoras de L-treonina, que son resistentes a AHV y que contienen un codón de terminación del tipo ámbar en la región codificadora del gen *rpoS* y contienen el correspondiente ARNt supresor, supE, en donde el codón de terminación del tipo ámbar se encuentra dentro de la región codificadora del gen *rpoS* correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS, de acuerdo con SEQ ID No. 2

Con respecto a la región codificadora del gen *rpoS*, los siguientes segmentos han demostrado ser particularmente ventajosos para la incorporación de un codón de terminación elegido del grupo ámbar, ocre y opal, preferiblemente ámbar:

- segmento de la región codificadora entre las posiciones 2 y 95, por ejemplo la posición 33, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS, dado en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2,
- segmento de la región codificadora entre las posiciones 99 y 168, por ejemplo la posición 148, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS, dado en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2,
- segmento de la región codificadora entre las posiciones 190 y 245, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS, dado en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2,
- segmento de la región codificadora entre las posiciones 266 y 281, por ejemplo la posición 270, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS, dado en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2, y
- segmento de la región codificadora entre las posiciones 287 y 314, por ejemplo la posición 304, correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS, dado en SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 2.

De acuerdo con la descripción, en el caso de que la región codificadora del gen *rpoS* tenga un codón de terminación del tipo ámbar, se utiliza preferiblemente un supresor ámbar elegido del grupo en la Tabla 1.

De acuerdo con la descripción, en el caso de que la región codificadora del gen *rpoS* tenga un codón de terminación

del tipo ocre, se utiliza preferiblemente un supresor ocre elegido del grupo en la Tabla 2.

De acuerdo con la descripción, en el caso de que la región codificadora del gen *rpoS* tenga un codón de terminación del tipo opal, se utiliza preferiblemente un supresor opal elegido del grupo en la Tabla 3.

5
10
15
20
25
30

Dependiendo del supresor utilizado, las bacterias forman un producto génico RpoS o factor σ^{38} que contiene, en la posición 33 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO. 2, en lugar de L-glutamina, un aminoácido elegido del grupo L-serina, L-tirosina, L-leucina, L-triptófano, L-lisina, L-alanina, L-arginina, L-fenilalanina, L-cisteína, L-prolina, L-histidina, L-treonina y L-valina. Así, por ejemplo, cuando se utiliza el supresor supD, se incorpora L-serina en lugar de L-glutamina. Cuando se utilizan supresores que incorporan el aminoácido L-glutamina en la posición 33 del producto génico RpoS o factor σ^{38} tal como, por ejemplo, supE, no se altera la secuencia de aminoácidos.

Son muy particularmente preferidas bacterias de la especie *Escherichia coli*, productoras de L-treonina, que contienen el alelo *rpoS* dado en SEQ ID NO. 3 y el supresor supE dado en SEQ ID NO. 4.

La invención proporciona también, correspondiente al primer aspecto de la invención, un procedimiento para preparar aminoácidos o aditivos para piensos con contenido en aminoácidos, en el que se realizan las siguientes etapas:

- 20
25
30
- a) fermentación de bacterias de la especie *Escherichia coli*, que son resistentes al ácido β -hidroxivalérico y que contienen 1) dentro de la región codificadora del gen *rpoS* correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS de acuerdo con SEQ ID No. 2 un codón de terminación del tipo ámbar y 2) el correspondiente supresor ámbar, supE,
 - b) enriquecimiento de la L-treonina en el medio o en las células de los microorganismos, y
 - c) aislamiento de la L-treonina, en donde opcionalmente constituyentes procedentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa en su totalidad, o una proporción de los mismos (≥ 0 a 100) permanecen en el producto.

Los aditivos para piensos de acuerdo con la invención se pueden procesar ulteriormente en la forma líquida y también en la forma sólida.

35

Mutaciones por medio de las cuales se introduce un codón de terminación en el marco de lectura del gen *rpoS* se pueden producir directamente en el hospedante relevante por métodos de mutagénesis clásicos utilizando sustancias mutagénicas tales como, por ejemplo, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, o luz ultravioleta.

40
45

Además, para la mutagénesis se pueden utilizar métodos *in vitro* que utilizan ADN de *rpoS* aislado tal como, por ejemplo, tratamiento con hidroxilamina (J. H. Miller: *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992). Finalmente, se pueden utilizar procedimientos para la mutagénesis orientada al lugar utilizando oligonucleótidos mutagénicos (T. A. Brown: *Gentechnologie für Einsteiger*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tal como se describe en el libro de Newton y Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994). Las mutaciones producidas se pueden determinar y someter a ensayo mediante secuenciación del ADN, por ejemplo utilizando el método de Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Science USA 74 (12): 5463-5467 (1977)).

50

Mutaciones adecuadas se pueden incorporar en las cepas deseadas con ayuda de procedimientos de recombinación por medio de reemplazo de genes o alelos. Un método comúnmente utilizado es el método del reemplazo de genes con ayuda de un derivado de pSC101, pMAK705, de replicación condicional, según se describe por Hamilton et al. (*Journal of Bacteriology* 171 (9): 4617-4622 (1989)). También se pueden utilizar otros métodos descritos en la técnica anterior tales como, por ejemplo, el método de Martínez-Morales et al. (*Journal of Bacteriology* 181 (22): 7143-7148 (1999)) o el método de Boyd et al. (*Journal of Bacteriology* 182 (3): 842-847 (2000)).

55

También es posible transferir mutaciones mediante conjugación o transducción a las cepas deseadas.

Finalmente, es posible utilizar alelos del gen *rpoS* conocidos de la técnica anterior, que contienen un codón de terminación en el marco de lectura e introducir éstos en las cepas deseadas utilizando los métodos arriba descritos.

60

Las cepas obtenidas de la manera descrita anteriormente son preferiblemente mutantes, transformantes, recombinantes, transductantes o transconjugantes.

Con el fin de producir mutaciones supresoras en genes de ARNt, se pueden utilizar básicamente los mismos métodos que los descritos para el gen rpoS. También se pueden utilizar métodos que utilicen la manipulación por ingeniería de oligonucleótidos tales como los que fueron utilizados, por ejemplo, por Khorana (Science 203 (4381): 614-625 (1979)). Además, en particular, se pueden utilizar los genes supresores de ARNt utilizados en la técnica anterior.

Métodos para la búsqueda, caracterización y determinación de la eficacia de supresores de ARNt se describen en la técnica anterior, por ejemplo en Miller y Albertini (Journal of Molecular Biology 164 (1): 59-71 (1983)), en McClain y Foss (Journal of Molecular Biology 202 (4): 697-709 (1988)), en Normanly et al. (Journal of Molecular Biology 213 (4): 719-726 (1990)), en Kleina et al. (Journal of Molecular Biology 213: 705-717 (1990)), en Lesley et al. (Promega Notes Magazine 46, pág. 02. (1994)) y en Martin et al. (Nucleic Acids Research 23 (5): 779-784 (1995)).

Además de ello, para la producción de L-treonina con bacterias de la especie Escherichia coli, puede ser ventajoso, además de incorporar un codón de terminación en la región codificadora del gen rpoS y un correspondiente supresor para un codón de terminación para potenciar una o más enzimas de la conocida vía de la biosíntesis de treonina, o enzima o enzimas para el metabolismo anaplerótico o enzimas para la producción de nitocotinamida-adenina-dinucleótido fosfato reducido o enzimas para la glucólisis o enzimas PTS o enzimas para el metabolismo del azufre.

La expresión "potenciación" a este respecto describe un aumento en la actividad intracelular o concentración de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo que son codificadas por el correspondiente ADN, por ejemplo aumentando el número de copias del gen o genes, utilizando un promotor fuerte o un gen que codifica una correspondiente enzima o proteína con una mayor actividad y, opcionalmente, combinando estas medidas.

El uso de genes endogénicos es generalmente preferido. "Genes endogénicos" o "secuencias de nucleótidos endogénicos" se entienden que son los genes o las secuencias de nucleótidos que están presentes en la población de una especie.

Utilizando las medidas de potenciamiento, en particular la sobre-expresión, la actividad o concentración de la correspondiente proteína se incrementa generalmente en al menos un 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, hasta a lo sumo 1000% o 2000%, con respecto a la proteína de tipo salvaje o a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo inicial.

Así, por ejemplo, se pueden potenciar, en particular sobre-expresar, uno o más genes elegidos del siguiente grupo:

- el operón thrABC que codifica aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa (documento US-A-4.278.765),
- el gen pyc que codifica piruvato carboxilasa (documento DE-A-19 831 609),
- el gen pps que codifica fosfoenolpiruvato sintasa (Molecular and General Genetics 231 (2): 332-336 (1992)),
- el gen ppc que codifica fosfoenolpiruvato carboxilasa (Gene 31: 279-283 (1984)),
- los genes pntA y pntB que codifican transhidrogenasa (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- el gen rhtB que imparte resistencia a homoserina (documento EP-A-0 994 190),
- el gen mqo que codifica malato:quinona oxidorreductasa (documento DE 100 348 33.5),
- el gen rhtC que imparte resistencia a treonina (documento EP-A-1 013 765),
- el gen thrE procedente de Corynebacterium glutamicum que codifica la proteína de exportación de treonina (documento DE 100 264 94.8),
- el gen gdhA que codifica glutamato deshidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- el gen hns que codifica la proteína HLP-II de unión a ADN (Molecular and General Genetics 212: 199-202 (1988)),

ES 2 378 985 T3

- el gen *pgm* que codifica fosfoglucomutasa (Journal of Bacteriology 176: 5847- 5851 (1994)),
- el gen *fba* que codifica fructosa bifosfato aldolasa (Biochemical Journal 257: 529-534 (1989)),
- 5 • el gen *ptsI* procedente del operón *ptsHlcr* que codifica la enzima I en el sistema de fosfotransferasa (PTS) (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- 10 • el gen *ptsH* procedente del operón *ptsHlcr* que codifica la proteína de fosfohistidina, hexosa fosfotransferasa en el sistema de fosfotransferasa (PTS) (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- 15 • el gen *crr* procedente del operón *ptsHlcr* que codifica el componente IIA específico para glucosa en el sistema de fosfotransferasa (PTS) (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- 20 • el gen *ptsG* que codifica el componente IIBC específico para glucosa en el sistema de fosfotransferasa (PTS) (Journal of Biological Chemistry 261: 16398-16403 (1986)),
- el gen *lrp* que codifica el regulador para el regulón de leucina (Journal of Biological Chemistry 266: 10768-10774, (1991)),
- 25 • el gen *csrA* que codifica el regulador global (Journal of Bacteriology 175: 4744-4755 (1993)),
- el gen *fadR* que codifica el regulador para el regulón *fad* (Nucleic Acids Research 16: 7995-8009 (1988)),
- 30 • el gen *iclR* que codifica el regulador para el metabolismo intermedio central (Journal of Bacteriology 172: 2642-2649 (1990)),
- el gen *mopB* que codifica la chaperona de 10 kd (Journal of Biological Chemistry 261: 12414-12419 (1986)), que también se conoce por el nombre *groES*,
- 35 • el gen *ahpC* procedente del operón *ahpCF* que codifica la subunidad pequeña en la alquil hidroperóxido reductasa (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 7617-7621 (1995)),
- el gen *ahpF* procedente del operón *ahpCF* que codifica la subunidad grande en la alquil hidroperóxido reductasa (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 7617-7621 (1995)),
- 40 • el gen *cysK* que codifica cisteína sintasa A (Journal of Bacteriology 170: 3150- 3157 (1988)),
- el gen *cysB* que codifica el regulador para el regulón *cys* (Journal of Biological Chemistry 262: 5999-6005 (1987)),
- 45 • el gen *cysJ* procedente del operón *cysJIH* que codifica la flavoproteína en NADPH sulfito reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)),
- el gen *cysH* procedente del operón *cysJIH* que codifica adenilsulfato reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)), y
- 50 • el gen *cysI* procedente del operón *cysJIH* que codifica la hemoproteína en NADPH sulfito reductasa (Journal of Biological Chemistry 264: 15796-15808 (1989), Journal of Biological Chemistry 264: 15726-15737 (1989)).

Además de ello, puede ser ventajoso para la producción de L-treonina con bacterias de la especie *Escherichia coli*, además de incorporar un codón de terminación en la región codificadora del gen *rpoS* y el correspondiente supresor para el codón de terminación, atenuar, en particular desconectar o reducir la expresión de uno o más genes elegidos del siguiente grupo:

- 60 • el gen *tdh* que codifica treonina deshidrogenasa (Ravnikar y Somerville; Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),

- el gen mdh que codifica malato deshidrogenasa (E. C. 1. 1. 1. 37) (Vogel et al.; Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987));
 - 5 • el producto génico del marco de lectura abierto (orf – siglas en inglés) yjfA (Número de Acceso AAC77180 en el Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.)),
 - el producto génico del marco de lectura abierto (orf) ytfP (Número de Acceso AAC77179 en el Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.)),
 - 10 • el gen pckA que codifica la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Medina et al.; Journal of Bacteriology 172: 7151-7156 (1990)),
 - el gen poxB que codifica piruvato oxidasa (Grabau y Cronan; Nucleic Acids Research 14 (13): 5449-5460 (1986)),
 - 15 • el gen aceA que codifica la enzima isocitrato liasa (Matsuoko y McFadden; Journal of Bacteriology 170: 4528-4536 (1988)),
 - el gen dgsA que codifica el regulador DgsA en el sistema de fosfotransferasa (Hosono et al.; Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 59: 256-261 (1995)), que también se conoce por el nombre de gen mlc, y
 - 20 • el gen fruR que codifica el represor de fructosa (Jahreis et al.; Molecular and General Genetics 226: 332-336 (1991)), que también se conoce por el nombre de gen cra.
- 25 La expresión “atenuación” a este respecto describe la disminución o la desconexión de la actividad intracelular o concentración de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo que son codificadas por el correspondiente ADN, por ejemplo utilizando un promotor débil o un gen o alelo que codifica una enzima correspondiente con una baja actividad o que inactiva la correspondiente enzima, proteína o gen y, opcionalmente, combinar estas medidas.
- 30 Utilizando las medidas de atenuación, incluyendo la disminución de la expresión, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce generalmente a 0 hasta 75%, 0 hasta 50%, 0 hasta 25%, 0 hasta 10% o 0 hasta 5% de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo inicial.
- 35 También se ha demostrado que en el caso de los genes tdh, mdh, pckA, poxB, aceA, dgsA y fruR arriba mencionados y de los marcos de lectura abiertos (ORF) yjfA e ytfP y también para los genes ugpB (gen que codifica la proteína del enlace periplástico en el sistema de transporte sn-glicerina-3-fosfato), aspA (gen aspartato-amonioliasa (= gen aspartasa), aceB (gen que codifica la enzima malato sintasa A) y aceK (gen que codifica la enzima isocitrato deshidrogenasa quinasa/fosfatasa), la atenuación se puede conseguir 1) incorporando un codón de
- 40 terminación, elegido del grupo ámbar, ocre y opal, en la región codificadora de estos genes, y 2) utilizando simultáneamente un supresor para el correspondiente codón de terminación, elegido del grupo supresor ámbar, supresor ocre y supresor opal. El uso del codón de terminación del tipo ámbar y el supresor ámbar supE ha demostrado ser particularmente ventajoso. La metodología descrita se puede trasladar a cualesquiera genes para los que se pretenda producir una atenuación o desconexión.
- 45 Microorganismos de acuerdo con la invención se pueden cultivar en un proceso discontinuo, en un proceso discontinuo de alimentación o en un proceso discontinuo de alimentación repetida. Una revisión de métodos de cultivo conocidos se da en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).
- 50 El medio de cultivo a utilizar ha de satisfacer de manera apropiada las demandas de las cepas particulares. Descripciones de medios de cultivo para diferentes microorganismos se proporcionan en el libro “Manual of Methods for General Bacteriology” por The American Society for Bacteriology (Washington D. C., EE.UU., 1981).
- 55 Fuentes de carbono que se pueden utilizar son azúcares e hidratos de carbono tales como, p. ej., glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidón y, opcionalmente, celulosa, aceites y grasas tales como, p. ej., aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite 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 tal como, p. ej., ácido
- 60 acético. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como mezclas.

5 Fuentes de nitrógeno que se pueden utilizar son compuestos con contenido en nitrógeno orgánico tales como peptonas, extracto de levaduras, extracto de carne, extracto de malta, líquido de maceración de maíz, harina de habas 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 mezclas.

10 Fuentes de fósforo que se pueden utilizar son ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato potásico o hidrógeno-fosfato dipotásico, o las correspondientes sales con contenido en sodio. El medio de cultivo debe contener también sales de metales tales como, p. ej., sulfato de magnesio o sulfato de hierro, los cuales se requieren para el crecimiento. Además de las sustancias arriba mencionadas se han de utilizar finalmente sustancias para el crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Precursores adecuados también se pueden añadir al medio de cultivo. Los materiales de alimentación mencionados se pueden añadir al cultivo en forma de una porción excepcional o se pueden alimentar de una manera adecuada durante el cultivo.

15 Con el fin de controlar el pH del cultivo, se utilizan de manera apropiada compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o agua amoniacal, o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para controlar el desarrollo de la espuma, se utilizan agentes antiespumantes tales como, p. ej., ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para mantener la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir al medio sustancias de acción selectiva adecuadas tales como, p. ej., antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas con contenido en oxígeno tales como, p. ej., aire. La temperatura del cultivo es normalmente de 25°C a 45°C y, preferiblemente, es de 30°C a 40°C. El cultivo se continúa hasta que se haya formado un máximo de L-aminoácidos. Este objetivo se consigue normalmente en el espacio de 10 horas a 160 horas.

25 El análisis de aminoácidos se puede realizar utilizando cromatografía de intercambio de aniones, seguido de derivación de ninhidrina, según se describe en Spackman et al. (*Analytical Chemistry* 30: 1190-1206 (1958)), o se puede realizar utilizando HPLC de fase inversa, según se describe en Lindroth et al. (*Analytical Chemistry* (1979) 51: 1167-1174).

30 El siguiente microorganismo se depositó como un cultivo puro el 9 de septiembre del 2002 en la Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania) de acuerdo con el Tratado de Budapest:

- Cepa DM1690 de *Escherichia coli* como DSM 15189

35 La cepa DSM 15189 contiene un codón de terminación del tipo ámbar en el punto correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS y un supresor ámbar, y produce treonina.

El procedimiento de acuerdo con la invención se utiliza para la preparación fermentativa de L-treonina.

40 La presente invención se explica con mayor detalle en lo que sigue, haciendo uso de ejemplos de trabajo.

45 Los medios mínimo (M9) y universal (LB) para *E. coli* se describen por J. H. Miller (*A Short Course in Bacterial Genetics* (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento de ADN del plásmido procedente de *E. coli* y todas las técnicas relacionadas con la restricción y tratamiento de Klenow y fosfatasa alcalina se realizan según se describe por Sambrook et al. (*Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). La transformación de *E. coli*, a menos que se describa de modo diferente, se realiza según se describe en Chung et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2172-2175 (1989)). Las transducciones P1 se realizan tal como se describe por Lengeler et al. (*Journal of Bacteriology* 124: 26-38 (1975)).

50 Ejemplo 1

Transducción del locus del gen *scr* en la cepa MG1655 de *E. coli* K12

55 El regulón *scr* en el plásmido pUR400 que se produce de forma natural (Schmid et al., *Molecular Microbiology* 2: 1-8 (1988)) fomenta la capacidad de utilizar sacarosa como una fuente de carbono. Con ayuda del plásmido pKJL710 (Ulmke et al., *Journal of Bacteriology* 181: 1920-1923 (1999)), que contiene el regulón *scr* entre las dos repeticiones de secuencia inversa del transposón Tn1721 (Ubben y Schmitt, *Gene* 41: 154-152 (1986)), seguido de transformación, transposición, conjugación y traducción, el regulón *scr* se puede transferir al cromosoma de *Escherichia coli* K12. Una cepa denominada LJ210 contiene el regulón *scr* integrado en el cromosoma en la posición 6 de acuerdo con Berlyn-Karte. El bacteriófago P1 se multiplica en esta cepa, y la cepa MG1655 de *E. coli* K12 (Guyer et al., *Cold Spring Harbor Symp., Quant. Biology* 45: 135-140 (1981)) se infesta con el lisado del fago aislado.

Mediante la extensión en placas sobre medio mínimo con contenido en sacarosa (2 g/l) se obtienen transductantes de MG1655 que pueden utilizar sacarosa como una fuente de carbono. A un clon seleccionado se le da el nombre MG1655scr.

5 Ejemplo 2

Mutagénesis in-vivo de la cepa MG1655scr

10 Partiendo de MG1655scr, después de incubación a 37°C en agar mínimo, al que se le han añadido 2 g/l de sacarosa y 4 g/l de DL-β-hidroxinorvalina (Sigma, Deisenhofen, Alemania), se aíslan mutantes espontáneos que son resistentes al análogo de treonina, ácido α-amino-β-hidroxivalérico (AHV). A un mutante seleccionado se le da el nombre MG1655scrAHVR1.

15 Ejemplo 3

Incorporación de una mutación del codón de terminación en el gen rpoS en MG1655scrAHVR1 mediante mutagénesis específica del sitio

20 3.1 Clonación del gen rpoS procedente de MG1655

La cepa MG1655 de Escherichia coli se utiliza como donante de ADN cromosómico. Un fragmento de ADN que contiene la región del gen rpoS a ser mutada en la región central se amplifica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia conocida del gen rpoS (Número de Acceso AE000358, SEQ ID No. 1) para Escherichia coli K12, se eligen los siguientes oligonucleótidos cebadores (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) para la PCR:

rpoS9 (SEQ ID No. 7):
5' CAGTTATAGCGGCAGTACC 3'

30 rpoS4 (SEQ ID No. 8):
5' GGACAGTGTTAACGACCATTCTC 3'

35 El ADN cromosómico de E. coli K12 se aísla de acuerdo con los datos del fabricante utilizando "Qiagen Genomic-tips 100/G" (Qiagen, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN de aproximadamente 2 kpb de longitud se puede aislar utilizando los cebadores específicos bajo condiciones de PCR convencionales (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con vent polimerasa (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Alemania).

40 El fragmento de ADN amplificado se identifica utilizando electroforesis en gel en un gel de agarosa (al 0,8%) y se purifica con el kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). El producto de PRC purificado se liga de acuerdo con los datos del fabricante utilizando el vector pCR-Blunt II-TOPO (kit de clonación por PCR Zero Blunt TOPO, Invitrogen, Groningen, Holanda) y se transforma en la cepa TOP10 de E. coli (Invitrogen, Groningen, Holanda). La selección de las células con contenido en plásmido se realiza en agar LB al que se han añadido 50 mg/l de kanamicina. Después del aislamiento del ADN del plásmido, el vector se somete a ensayo utilizando escisión por restricción y separación en gel de agarosa (al 0,8%). El fragmento de ADN amplificado se somete a ensayo mediante análisis de la secuencia. La secuencia en el producto de PCR concuerda con la secuencia dada en SEQ ID NO. 9. Al plásmido obtenido se le da el nombre de pCRBluntrpoS9-4

50 3.2 Reemplazo de un codón glutamina por un codón de terminación ámbar mediante mutagénesis específica del sitio

La mutagénesis dirigida al sitio se realiza con el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene, La Jolla, EE.UU.). Para la amplificación lineal se eligen los siguientes oligonucleótidos cebadores:

55 rpoSamber1 (SEQ ID No. 10):
5' GGCCTTAGTAGAA (TAG) GAACCCAGTGATAACG 3'

60 rpoSamber2 (SEQ ID No. 11):
5' CGTTATCACTGGGTTTC (CTA) TTCTACTAAGGCC 3'

Estos cebadores se sintetizan por parte de MWG Biotech. El codón de terminación ámbar, que está destinado a

reemplazar a la glutamina en la posición 33 en la secuencia de aminoácidos, se marca con paréntesis en las secuencias de nucleótidos arriba mostradas. El plásmido pCRBlunrpoS9-4 descrito en el Ejemplo 3.1 se utiliza con cada uno de los dos cebadores complementarios a una cadena en el plásmido para la amplificación lineal por medio de la ADN polimerasa PfuTurbo. Durante este alargamiento del cebador se produce un plásmido mutado con cadenas circulares rotas. El producto procedente de la amplificación lineal se trata con DpnI. Esta endonucleasa porta específicamente al ADN molde metilado y semi-metilado. El ADN del vector mutado, roto y recientemente sintetizado se transforma en la cepa XL1 Blue de *E. coli* (Bullock, Fernández y Short, *BioTechniques* 5(4) 376-379 (1987)). Después de la transformación, las células XL1 Blue reparan las roturas en los plásmidos mutados. La selección de los transformantes se realiza en medio LB con 50 mg/l de kanamicina. El plásmido obtenido se somete a ensayo después del aislamiento del ADN por medio de escisión por restricción y separación en gel de agarosa (al 0,8%). La secuencia de ADN del fragmento de ADN mutado se somete a ensayo mediante análisis de la secuencia. La secuencia concuerda con la secuencia dada en SEQ ID NO. 3 en la región del gen *rpoS*. Al plásmido obtenido se le da el nombre pCRBlunrpoSamber.

15 3.3 Construcción del vector de reemplazo pMAK705rpoSamber

El plásmido pCRBlunrpoSamber descrito en el Ejemplo 3.2 se escinde con las enzimas de restricción BamHI y XbaI (Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Alemania). Después de la separación en un gel de agarosa (al 0,8%), el fragmento *rpoS* de una longitud de aproximadamente 2,1 kpb, que contiene la mutación, se aísla con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). El plásmido pMAK705 descrito en Hamilton et al. (*Journal of Bacteriology* 171: 4617-4622 (1989)) se escinde con las enzimas de restricción BamHI y XbaI y se liga con el fragmento de *rpoS* aislado (T4-ADN-ligasa, Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania). Después, la cepa DH5α de *E. coli* (Grant et al.; *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 4645-4649 (1990)) se transforma con la tanda de ligamiento (Hanahan, In. *DNA Cloning. A Practical Approach*. Vol. 1, IRL-Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). La selección de células que contienen el plásmido se realiza extendiendo en placas la tanda de transformación sobre agar LB (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) que está suplementado con 20 mg/l de cloranfenicol.

El ADN del plásmido se aísla de un transformante utilizando el kit QIAquick Spin Miniprep de Qiagen y se somete a ensayo mediante escisión por restricción con las enzimas BamHI, EcoRI, EcoRV, StuI y XbaI, seguido de electroforesis en gel de agarosa. Al plásmido se le da el nombre pMAK705rpoSamber. En la figura 1 se muestra un mapa del plásmido.

35 3.4 Mutagénesis específica del sitio del gen *rpoS* de la cepa MG1655scrAHVR1 de *E. coli*

Para la mutagénesis específica del sitio del gen *rpoS*, la cepa MG1655scrAHVR1 descrita en el Ejemplo 2 se transforma con el plásmido pMAK705rpoSamber. El reemplazo del gen se realiza utilizando el proceso de selección descrito en Hamilton et al. (*Journal of Bacteriology* 171: 4617-4622 (1989)). La prueba de que la mutación del alelo *rpoSamber* ha tenido lugar en el cromosoma se realiza utilizando el LightCycler de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El LightCycler es un instrumento combinado que consiste en un termociclador y un fluorímetro.

En la primera fase, una sección de ADN de aproximadamente 0,3 kpb de longitud que contiene el sitio de mutación, se amplifica por medio de PCR (Innis et al., *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press) utilizando los siguiente oligonucleótidos cebadores:

rpoSLC1(SEQ ID No. 12):
5' CGGAACCAGGCTTTTGCTTG 3'

rpoSLC2(SEQ ID No. 13):
5' GCGCGACGCGCAAATAAAC 3'

En la segunda fase, la presencia de la mutación se demuestra utilizando el análisis de la curva de fusión (Lay et al., *Clinical Chemistry* 43: 2262-2267 (1997)) con dos oligonucleótidos adicionales de diferentes longitudes y marcados con diferentes colorantes fluorescentes (LightCycler (LC) – Red640 y fluoresceína) que se hibridan en la región del sitio de mutación, utilizando el método de “Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia” (FRET – siglas en inglés).

rpoSamberC (SEQ ID No. 14):
5' LC-Red640 – CTTAGTAGAACAGGAACCCAGTG – (P) 3'

rpoSamberA (SEQ ID No. 15):

5' GATGAGAACGGAGTTGAGGTTTTTGACGAAAAGG – Fluoresceína 3'

Los cebadores mostrados para PCR son sintetizados por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania), y los oligonucleótidos para la hibridación se sintetizan por TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania).

5 De este modo, se identifica un clon que contiene una base timidina en lugar de una base citosina en la posición 952 en la secuencia de ADN para el producto de PCR rpoS (SEQ ID No. 9). El triplete de bases timina-adenina-guanina está presente en las posiciones 97 – 99 de la secuencia codificadora para el alelo rpoS (SEQ ID No. 3) y codifica un codón de terminación ámbar que conduce a la terminación de la traducción. A este clon se le da el nombre
10 MG1655scrAHVR1rpoS.

Ejemplo 4

Selección in-vivo de una mutación del supresor ámbar en la cepa MG1655scrAHVR1rpoS

15 4.1 Construcción de un vector con un codón de terminación ámbar en el gen Cat

Para la selección de una mutación del supresor, un codón de terminación ámbar se incorpora en el gen Cat que codifica cloranfenicol acetil transferasa y que imparte resistencia al antibiótico cloranfenicol.

20 Para este fin, el bloque del gen Cat se liga en el vector pTrc99A linearizado con HindIII (ambos de Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania). La cepa Dh5 α de E. coli (Grant et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 87: 4645-4649 (1990)) se transforma con la tanda de ligamiento (Hanahan, In. DNA Cloning. A Practical Approach. Vol. 1, ILR-Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). La selección de células que contienen
25 el plásmido se realiza extendiendo en placas la tanda de transformación sobre agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª Ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) que está suplementado con 50 mg/l de ampicilina. El ADN del plásmido se aísla de un transformante utilizando el kit QIAquick Spin Miniprep de Qiagen y se somete a ensayo mediante escisión por restricción, seguido de electroforesis en gel de agarosa. Al plásmido se le da el nombre pTrc99Acat.

30 Con el fin de incorporar un codón de terminación ámbar en la región codificadora del gen cat, partiendo de la secuencia para el gen cat, cebadores que contienen los sitios de escisión para las enzimas de restricción AccIII y MscI son sintetizados por MWG Biotech, Ebersberg, Alemania. Los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción se marcan mediante subrayado en las secuencias de nucleótidos mostradas más abajo. En el cebador
35 catAccIII, detrás del sitio de escisión AccIII, dos codones ATG que codifican el aminoácido metionina en las posiciones 75 y 77 en la proteína cat se transforman en codones TAG. Los codones ámbar se muestran dentro de paréntesis en las secuencias de nucleótidos dadas más abajo.

40 catAccIII: 5' GCTCATCCGGAATTCCGT (TAG) GCA (TAG) AAAG 3'
(SEQ ID No 16)

catMscI: 5' GTCCATATTGGCCACGTTTAAATC 3'
(SEQ ID No. 17)

45 Para la PCR se utiliza ADN del plásmido procedente del vector pTrc99Acat. Un fragmento de ADN de aproximadamente 300 pb de longitud se puede amplificar con los cebadores específicos bajo condiciones de PCR convencionales (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) utilizando
50 ADN polimerasa de Pfu (Promega Corporation, Madison, EE.UU.). El producto de PCR se escinde con las enzimas de restricción AccIII y MscI. El vector pTrc99Acat también se digiere con las enzimas AccIII y MscI, se separa en gel y se aísla un fragmento de 4,7 kpb de longitud utilizando el kit de extracción en gel QIAquick. Los dos fragmentos se ligan con T4 ADN ligasa (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania). La cepa XL1-Blue MRF' de E. coli (Stratagene,
55 La Jolla, EE.UU.) se transforma con la tanda de ligamiento, y células que contienen el plásmido se seleccionan en agar LB al que se han añadido 50g/ ml de ampicilina. La clonación con éxito se puede demostrar, después del aislamiento del ADN del plásmido, mediante escisión control utilizando las enzimas EcoRI, PvuII, SspI y StyI. Al plásmido se le da el nombre pTrc99Acatamber. En la figura 2 se muestra un mapa del plásmido.

4.2 Selección de clones con un supresor ámbar

La cepa MG1655scrAHVR1rpoS descrita en el ejemplo 3 se transforma con los vectores pTrc99Acat y pTrc99Acatamber. La selección se realiza en agar LB que ha sido suplementado con 20 ó 50µg/ml de cloranfenicol. Clones resistentes a cloranfenicol, que han sido transformados con el vector pTrc99Acatamber se transfieren a agar LB, al que se han añadido 50µg/ml de ampicilina, utilizando un mondadientes. El ADN del plásmido se aísla de cloranfenicol y clones resistentes a ampicilina. El vector pTrc99Acatamber se identifica mediante escisión por restricción.

Un transformante resistente a cloranfenicol MG1655scrAHVR1rpoS/pTrc99Acatamber se cura mediante el plásmido pTrc99Acatamber mediante sobre-inoculación varias veces en medio LB y se le da el nombre DM1690.

4.3 Identificación de la mutación del supresor ámbar en DM1690

4.3.1. Testado de la mutación supD

Una mutación conocida, que conduce a la supresión de codones ámbar, está presente en el gen serU que codifica ARNt-2 de serina. El alelo se denomina supD, el ARNt reconoce codones ámbar e incorpora serina. En la secuencia para el gen supD60 (Número de Acceso M10746), el anticodón citosina adenina adenina en el gen serU de tipo salvaje se modifica mediante reemplazo de bases para dar citosina timina adenina y, así, reconoce codones uracilo adenina guanina.

Una posible mutación en el gen serU cromosómico se puede detectar utilizando el LightCycler de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania). El LightCycler es un instrumento combinado que consiste en un termociclador y un fluorímetro.

En la primera fase, una sección de ADN de aproximadamente 0,3 kpb de longitud que contiene el sitio de mutación se amplifica mediante PCR (Innis et al., PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) utilizando los siguientes oligonucleótidos:

serULC1(SEQ ID No. 18):
5' CTTGTACTTTCCAGGGCCAC 3'

serULC2(SEQ ID No. 19):
5' TTTAGGAAAAGCAAGGCGGG 3'

En la segunda fase, la presencia de la mutación se demuestra utilizando el análisis de la curva de fusión (Lay et al., Clinical Chemistry 43: 2262-2267 (1997)) con dos oligonucleótidos adicionales de diferentes longitudes y marcados con diferentes colorantes fluorescentes (LightCycler (LC) – Red640 y fluoresceína) que se hibridan en la región del sitio de mutación, utilizando el método de “Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia” (FRET).

serUC (SEQ ID No. 20):
5' LC-Red640 – TCCGGTTTTCGAGACCGGTC – (P) 3'

serUA (SEQ ID No. 21):
5' GAGGGGGATTGAACCCCGGTAGAGTTGCCCTA– Fluoresceína 3'

Los cebadores mostrados para PCR son sintetizados por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania), y los oligonucleótidos para la hibridación son sintetizados por TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania).

Se puede demostrar que el gen serU de tipo salvaje está presente en DM1690 y, así, no existe mutación supD alguna.

4.3.2. Análisis de la secuencia del alelo supE en DM1690

Otra mutación conocida, que conduce a la supresión de codones ámbar, está presente en el gen glnV que codifica ARNt-2 de glutamina. El alelo se denomina supE, el ARNt reconoce codones ámbar e incorpora glutamina. En la secuencia para el gen glnV (Número de Acceso AE000170), el anticodón citosina timina guanina en el gen glnV de tipo salvaje está modificado por reemplazo de bases para dar citosina timina adenina, y reconoce codones de uracilo adenina guanina.

Partiendo de la secuencia conocida de la región glnV de Escherichia coli K12 (Número de Acceso AE000170), los siguientes oligonucleótidos cebadores (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) se eligen para la PCR:

glnX1 (SEQ ID No. 22):

5' CTGGCGTGTGAAACGTCAG 3'

glnX2 (SEQ ID No. 23):

5' CACGCTGTTCGCAACCTAACC 3'

El ADN cromosómico procedente de DM1690, utilizado para la PCR, se aísla de acuerdo con los datos del fabricante utilizando "Qiagen Genomic-tips 100/G" (Qiagen, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN de aproximadamente 1 kpb de longitud se puede aislar utilizando los cebadores específicos bajo condiciones de PCR convencionales (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con vent polimerasa (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Alemania). El producto de PCR se purifica con el kit de purificación por PCR QIAquick y se secuencian por los Servicios de Secuenciación de Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). La secuencia obtenida concuerda con la SEQ ID No. 4 en la región del gen glnV.

La cepa DM1690 posee el alelo supE y suprime codones ámbar al incorporar glutamina.

20 Ejemplo 5

Preparación de L-treonina utilizando las cepas MG1655scrAHVR1, MG1655scrAHVR1rpoS y DM1690

Las cepas MG1655scrAHVR1, MG1655scrAHVR1rpoS y DM1690 se multiplicaron en medio mínimo con la siguiente composición: 3,5 g/l de Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de NH₄Cl, 0,1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 2 g/l de sacarosa, 20 g/l de agar. Los cultivos se incuban durante 5 días a 37°C. La formación de L-treonina se vigila en cultivos en tandas de 10 ml que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para este fin, se inoculan 10 ml de medio de precultivo con la siguiente composición: 2 g/l de extracto de levaduras, 10 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de MgSO₄*7H₂O, 15 g/l de CaCO₃, 20 g/l de sacarosa, y la mezcla se incubaba durante 16 horas a 37°C y 180 rpm en una incubadora ESR de Kühner AG (Birsfelden, Suiza). Porciones de 250µl de este precultivo en cada uno de los casos se transfieren a 10 ml de medio de producción (25 g/l de (NH₄)₂SO₄, 2 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 0,03 g/l de FeSO₄*7H₂O, 0,018 g/l de MnSO₄*1H₂O, 30 g/l de CaCO₃, 20 g/l de sacarosa) y se incuban durante 48 horas a 37°C. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo utilizando un fotómetro LP2W de Dr. Lange (Berlín, Alemania) a una longitud de onda de medición de 660 nm.

Después, la concentración de L-treonina formada se determina en el líquido sobrenadante filtrado en condiciones estériles utilizando un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Harmburgo, Alemania) por medio de cromatografía de intercambio de iones y reacción post-columna con detección con ninhidrina.

La Tabla 4 proporciona los resultados del ensayo

Cepa	DO (660 nm)	L-treonina g/l
MG1655scrAHVR1	5,6	2,15
MG1655scrAHVR1rpoS	5,3	2,34
DM1690	5,2	2,46

Breve descripción de las Figuras:

45 Figura 1: pMAK705rpoSamber

Figura 2: pTrc99Acatamber

Los datos relativos a la longitud han de considerarse como datos aproximados. Las abreviaturas y nombres utilizados se definen como sigue:

cat: gen de resistencia a cloranfenicol

rep-ts: región de replicación sensible a la temperatura del plásmido pSC101

55 rpoS: región codificadora del gen rpoS

	Amp:	gen de resistencia a ampicilina
5	lacI:	gen para el gen represor en los promotores trc
	P _{trc} :	región del promotor trc, inducible por IPTG
	5S:	región de ARNr de 5S
10	rrnBT:	región del terminador de ARNr

Las abreviaturas para las enzimas de restricción se definen como sigue:

15	• AcclI:	endonucleasa de restricción de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	• BamHI:	endonucleasa de restricción de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	• EcoRI:	endonucleasa de restricción de <i>Escherichia coli</i>
20	• EcoRV:	endonucleasa de restricción de <i>Escherichia coli</i>
	• MscI:	endonucleasa de restricción de especies de <i>Micrococcus</i>
25	• PvuII:	endonucleasa de restricción de <i>Proteus vulgaris</i>
	• SspI:	endonucleasa de restricción de especies de <i>Sphaerotilus</i>
	• StuI:	endonucleasa de restricción de <i>Streptomyces tubercidius</i>
30	• StyI:	endonucleasa de restricción de <i>Salmonella typhi</i>
	• XbaI:	endonucleasa de restricción de <i>Xanthomonas badrii</i>

ES 2 378 985 T3

Listado de Secuencias:

<110> Degussa AG

<120> Bacterias productoras de aminoácidos y un procedimiento para preparar L-aminoácidos

5 <130> 010319 BT

<160> 23

<170> PatentIn version 3.1

10 <210> 1

<211> 993

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(990)

<223>

<400> 1

atg agt cag aat acg ctg aaa gtt cat gat tta aat gaa gat gcg gaa	48
Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu	
1 5 10 15	
ttt gat gag aac gga gtt gag gtt ttt gac gaa aag gcc tta gta gaa	96
Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu	
. 20 25 30	
cag gaa ccc agt gat aac gat ttg gcc gaa gag gaa ctg tta tcg cag	144
Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln	
. 35 40 45	
gga gcc aca cag cgt gtg ttg gac gcg act cag ctt tac ctt ggt gag	192
Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu	
. 50 55 60	
att ggt tat tca cca ctg tta acg gcc gaa gaa gaa gtt tat ttt gcg	240
Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala	
65 70 75 80	
cgt cgc gca ctg cgt gga gat gtc gcc tct cgc cgc cgg atg atc gag	288
Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu	
. 85 90 95	
agt aac ttg cgt ctg gtg gta aaa att gcc cgc cgt tat ggc aat cgt	336
Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg	
. 100 105 110	
ggt ctg gcg ttg ctg gac ctt atc gaa gag ggc aac ctg ggg ctg atc	384
Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile	
. 115 120 125	
cgc gcg gta gag aag ttt gac ccg gaa cgt ggt ttc cgc ttc tca aca	432
Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr	
. 130 135 140	

15

ES 2 378 985 T3

tac gca acc tgg tgg att cgc cag acg att gaa cgg gcg att atg aac Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn 145 150 155 160	480
caa acc cgt act att cgt ttg ccg att cac atc gta aag gag ctg aac Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn 165 170 175	528
gtt tac ctg cga acc gca cgt gag ttg tcc cat aag ctg gac cat gaa Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu 180 185 190	576
cca agt gcg gaa gag atc gca gag caa ctg gat aag cca gtt gat gac Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp 195 200 205	624
gtc agc cgt atg ctt cgt ctt aac gag cgc att acc tcg gta gac acc Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr 210 215 220	672
ccg ctg ggt ggt gat tcc gaa aaa gcg ttg ctg gac atc ctg gcc gat Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp 225 230 235 240	720
gaa aaa gag aac ggt ccg gaa gat acc acg caa gat gac gat atg aag Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys 245 250 255	768
cag agc atc gtc aaa tgg ctg ttc gag ctg aac gcc aaa cag cgt gaa Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu 260 265 270	816
gtg ctg gca cgt cga ttc ggt ttg ctg ggg tac gaa gcg gca aca ctg Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu 275 280 285	864
gaa gat gta ggt cgt gaa att ggc ctc acc cgt gaa cgt gtt cgc cag Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln 290 295 300	912
att cag gtt gaa ggc ctg cgc cgt ttg cgc gaa atc ctg caa acg cag Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln 305 310 315 320	960
ggg ctg aat atc gaa gcg ctg ttc cgc gag taa Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu 325 330	993
<210> 2 <211> 330 <212> PRT <213> Escherichia coli	
<400> 2 Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu 1 5 10 15 Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu 20 25 30	

ES 2 378 985 T3

Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln
 35 40 45

Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu
 50 55 60

Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala
 65 70 75 80

Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu
 85 90 95

Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg
 100 105 110

Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile
 115 120 125

Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr
 130 135 140

Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn
 145 150 155 160

Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn
 165 170 175

Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu
 180 185 190

Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp
 195 200 205

Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr
 210 215 220

Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp
 225 230 235 240

Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys
 245 250 255

Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu
 260 265 270

Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu
 275 280 285

Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln
 290 295 300

Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln
 305 310 315 320

Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu
 325 330

<210> 3
 <211> 993
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> Alelo
 <222> (1) ... (990)
 <223> Alelo rpoS

5

ES 2 378 985 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (97) ... (99)
 5 <223> codón ámbar

<400> 3
 atgagtcaga atacgctgaa agttcatgat ttaaataag atgcggaatt tgatgagaac 60
 ggagttgagg tttttgacga aaaggcctta gtagaatagg aaccagtgga taacgatttg 120
 gccgaagagg aactgttata gcagggagcc acacagcgtg tgttggacgc gactcagctt 180
 taccttggtg agattgggta ttcaccactg ttaacggccg aagaagaagt ttattttgcg 240
 cgtcgcgcac tgcgtggaga tgtcgcctct cgccgccgga tgatcgagag taacttgcgt 300
 ctgggtgtaaa aaattgcccg ccgttatggc aatcgtggtc tggcgttgct ggaccttata 360
 gaagagggca acctggggct gatccgctcg gtagagaagt ttgacccgga acgtggtttc 420
 cgcttctcaa catacgcaac ctgggtgatt cgccagacga ttgaacgggc gattatgaac 480
 caaacccgta ctattcgttt gccgattcac atcgtaaagg agctgaacgt ttacctgcga 540
 accgcacgtg agttgtccca taagctggac catgaaccaa gtgcggaaga gatcgagag 600
 caactggata agccagttga tgacgtcagc cgtatgcttc gtcttaacga gcgcattacc 660
 tcggtagaca ccccgctggg tgggtgattcc gaaaaagcgt tgctggacat cctggccgat 720
 gaaaaagaga acggtccgga agataccacg caagatgacg atatgaagca gagcatcgtc 780
 aaatggctgt tcgagctgaa cgccaaacag cgtgaagtgc tggcacgtcg attcggtttg 840
 ctggggtacg aagcggcaac actggaagat gtaggtcgtg aaattggcct cacccgtgaa 900
 cgtgttcgcc agattcaggt tgaaggcctg cgccgtttgc gcgaaatcct gcaaacgcag 960
 gggctgaata tcgaagcgt gttccgcgag taa 993

<210> 4
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

10 <220>
 <221> ARNt
 <222> (1) ... (75)
 <223> alelo supE

15 <400> 4
 tggggtatcg ccaagcggta aggcaccgga ttctaattcc ggcattccga ggttcgaatc 60
 ctcgtacccc agcca 75

ES 2 378 985 T3

```

<210> 5
<211> 714
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(711)
<223>

<400> 5
atg atc gag agt aac ttg cgt ctg gtg gta aaa att gcc cgc cgt tat      48
Met Ile Glu Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr
1                               5                               10                               15

ggc aat cgt ggt ctg gcg ttg ctg gac ctt atc gaa gag ggc aac ctg      96
Gly Asn Arg Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu
20                               25                               30

ggg ctg atc cgc gcg gta gag aag ttt gac ccg gaa cgt ggt ttc cgc     144
Gly Leu Ile Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg
35                               40                               45

ttc tca aca tac gca acc tgg tgg att cgc cag acg att gaa cgg gcg     192
Phe Ser Thr Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala
50                               55                               60

att atg aac caa acc cgt act att cgt ttg ccg att cac atc gta aag     240
Ile Met Asn Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys
65                               70                               75                               80

gag ctg aac gtt tac ctg cga acc gca cgt gag ttg tcc cat aag ctg     288
Glu Leu Asn Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu
85                               90                               95

gac cat gaa cca agt gcg gaa gag atc gca gag caa ctg gat aag cca     336
Asp His Glu Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro
100                              105                              110

gtt gat gac gtc agc cgt atg ctt cgt ctt aac gag cgc att acc tcg     384
Val Asp Asp Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser
115                              120                              125

gta gac acc ccg ctg ggt ggt gat tcc gaa aaa gcg ttg ctg gac atc     432
Val Asp Thr Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile
130                              135                              140

ctg gcc gat gaa aaa gag aac ggt ccg gaa gat acc acg caa gat gac     480
Leu Ala Asp Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp
145                              150                              155                              160

gat atg aag cag agc atc gtc aaa tgg ctg ttc gag ctg aac gcc aaa     528
Asp Met Lys Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys
165                              170                              175

cag cgt gaa gtg ctg gca cgt cga ttc ggt ttg ctg ggg tac gaa gcg     576
Gln Arg Glu Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala
180                              185                              190

gca aca ctg gaa gat gta ggt cgt gaa att ggc ctc acc cgt gaa cgt     624
Ala Thr Leu Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg
195                              200                              205

```

ES 2 378 985 T3

gtt cgc cag att cag gtt gaa ggc ctg cgc cgt ttg cgc gaa atc ctg 672
 Val Arg Gln Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu
 210 215 220

caa acg cag ggg ctg aat atc gaa gcg ctg ttc cgc gag taa 714
 Gln Thr Gln Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu
 225 230 235

<210> 6
 <211> 237
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 6
 Met Ile Glu Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr
 1 5 10 15

Gly Asn Arg Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu
 20 25 30

Gly Leu Ile Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg
 35 40 45

Phe Ser Thr Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala
 50 55 60

Ile Met Asn Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys
 65 70 75 80

Glu Leu Asn Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu
 85 90 95

Asp His Glu Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro
 100 105 110

Val Asp Asp Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser
 115 120 125

Val Asp Thr Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile
 130 135 140

Leu Ala Asp Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp
 145 150 155 160

Asp Met Lys Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys
 165 170 175

Gln Arg Glu Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala
 180 185 190

Ala Thr Leu Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg
 195 200 205

Val Arg Gln Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu
 210 215 220

Gln Thr Gln Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu
 225 230 235

5

<210> 7

	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> secuencia sintética	
5	<220>	
	<221> Cebador	
	<222> (1) ... (19)	
	<223> rpoS9	
	<400> 7	
10	cagttatagc ggcagtacc	19
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Cebador	
	<222> (1) ... (23)	
20	<223> rpoS4	
	<400> 8	
	ggacagtgtt aacgaccatt ctc	23

ES 2 378 985 T3

<210> 9
 <211> 2012
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> DNA
 <222> (1)..(2012)
 <223> rpoS9-4

<400> 9
 cagttatagc ggcagtacct ataccgtgaa aaaaggcgcac acacttttct atatcgcttg 60
 gattactggc aacgatttcc gtgaccttgc tcagcgcAAC aatattcagg caccatacgc 120
 gctgaacggt ggtcagacct tgcaggtggg taatgcttcc ggtacgcca tCactggcgg 180
 aatgccatt acccaggccg acgcagcaga gcaaggagt gtgatcaagc ctgcacaaaa 240
 ttccaccgtt gctgttgcgt cgcaaccgac aattacgtat tctgagtctt cgggtgaaca 300
 gagtgctaac aaaatgttgc cgaacaacaa gccaaactgcg accacgggtca cagcgcctgt 360
 aacggtacca acagcaagca caaccgagcc gactgtcagc agtacatcaa ccagtagcgc 420
 tatctccacc tggcgcctgc cgactgaggg caaagtgatc gaaacctttg gcgcttctga 480
 ggggggcaac aaggggattg atatcgcagg cagcaaagga caggcaatta tcgcgaccgc 540
 agatggccgc gttgtttatg ctggtaacgc gctgcgcggc tacggtaatc tgattatcat 600
 caaacataat gatgattacc tgagtgccta cgcccataac gacacaatgc tgggtccggga 660
 acaacaagaa gttaaggcgg ggcaaaaaat agcgaccatg ggtagcaccg gaaccagttc 720
 aacacgcttg cattttgaaa ttcgttacaa ggggaaatcc gtaaaccgcg tcggttattt 780
 gccgcagcga taaatcggcg gaaccaggct tttgcttgaa tgttccgtca agggatcacg 840
 ggtaggagcc accttatgag tcagaatacg ctgaaagttc atgatttaa tgaagatgcg 900
 gaatttgatg agaacggagt tgaggttttt gacgaaaagg ccttagtaga acaggaaccc 960
 agtgataacg atttggccga agaggaactg ttatcgcagg gagccacaca gcgtgtgttg 1020
 gacgcgactc agctttacct tgggtgagatt gggtattcac cactgttaac ggccgaagaa 1080
 gaagtttatt ttgcgcgtcg cgcaactgct ggagatgtcg cctctcgcg ccggatgatc 1140
 gagagtaact tgcgtctggt ggtaaaaatt gccgcgcgtt atggcaatcg tggctctggcg 1200
 ttgctggacc ttatogaaga gggcaacctg gggctgatcc gcgcggtaga gaagtttgac 1260
 ccggaacgtg gtttccgctt ctcaacatac gcaacctggt ggattcgcca gacgattgaa 1320
 cgggcgatta tgaaccaaac ccgtactatt cgtttgccga ttcacatcgt aaaggagctg 1380

ES 2 378 985 T3

aacgtttacc tgcgaaccgc acgtgagttg tcccataagc tggaccatga accaagtgcg 1440
 gaagagatcg cagagcaact ggataagcca gttgatgacg tcagccgtat gttcgtctt 1500
 aacgagcgca ttacctcggg agacaccgag ctgggtgggtg attccgaaaa agcgttgctg 1560
 gacatcctgg ccgatgaaaa agagaacggg ccggaagata ccacgcaaga tgacgatatg 1620
 aagcagagca tcgtcaaatg gctgttcgag ctgaacgcca aacagcgtga agtgctggca 1680
 cgtcgattcg gtttgcctgg gtacgaagcg gcaacactgg aagatgtagg tcgtgaaatt 1740
 ggccctcacc gtgaacgtgt tcgccagatt cagggtgaag gcctgcgccg tttgcgcgaa 1800
 atcctgcaaa cgcaggggct gaatatcgaa gcgctgttcc gcgagtaagt aagcatctgt 1860
 cagaaaggcc agtctcaagc gaggctggcc ttttctgtgc acaataaaag gtccgatgcc 1920
 catcggacct ttttattaag gtcaaattac cgcccatagc caccaggtaa ttaagaatcc 1980
 ggtaaaaccg agaatggteg ttaacactgt cc 2012

5 <210> 10
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> secuencia sintética

10 <220>
 <221> Cebador
 <222> (1) ... (31)
 <223> rpoSamber1
 <400> 10
 ggcccttagta gaataggaac ccagtgataa c 31

15 <210> 11
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> secuencia sintética

20 <220>
 <221> Cebador
 <222> (1) ... (31)
 <223> rpoSamber2
 <400> 11
 gttatcactg ggttcctatt ctactaaggc c 31

25 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> secuencia sintética

30 <220>
 <221> Cebador
 <222> (1) ... (20)
 <223> rpoSLC1
 <400> 12
 cggaaccagg cttttgcttg 20

35 <210> 13
 <211> 20

	<212> DNA	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
5	<221> Cebador	
	<222> (1) ... (20)	
	<223> rpoSLC2	
	<400> 13	
	gcgcgacgcg caaaataaac	20
10	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> secuencia sintética	
15	<220>	
	<221> Cebador	
	<222> (1) ... (23)	
	<223> rpoSamberC	
20	<400> 14	
	cttagtagaa caggaaccca gtg	23
	<210> 15	
	<211> 34	
25	<212> DNA	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Cebador	
30	<222> (1) ... (34)	
	<223> rpoSamberA	
	<400> 15	
	gatgagaacg gagttgaggt ttttgacgaa aagg	34
35	<210> 16	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> secuencia sintética	
40	<220>	
	<221> Cebador	
	<222> (1) ... (31)	
	<223> catAcclII	
	<400> 16	
45	gctcatccgg aattccgta ggcatagaaa g	31
	<210> 17	
	<211> 24	
	<212> DNA	
50	<213> secuencia sintética	
	<220>	
	<221> Cebador	
	<222> (1) ... (24)	
55	<223> catMscI	

	<400> 17		
	gtccatattg gccacgttta aatc		24
5	<210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> secuencia sintética		
10	<220> <221> Cebador <222> (1) ... (20) <223> serULC1		
	<400> 18		
15	cttgtacttt ccagggccac		20
20	<210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> secuencia sintética		
25	<220> <221> Cebador <222> (1) ... (20) <223> serULC2		
	<400> 19		
30	tttaggaaaa gcaaggcggg		20
35	<210> 20 <211> 20 <212> DNA <213> secuencia sintética		
40	<220> <221> Cebador <222> (1) ... (20) <223> serUC		
	<400> 20		
45	tccggttttc gagaccggtc		20
50	<210> 21 <211> 35 <212> DNA <213> secuencia sintética		
55	<220> <221> Cebador <222> (1) ... (35) <223> serUA		
	<400> 21		
60	gagggggatt tgaacccccg gtagagttgc cccta		35
	<210> 22 <211> 20		

ES 2 378 985 T3

<212> DNA
<213> secuencia sintética

<220>
5 <221> Cebador
<222> (1) ... (20)
<223> glnX1

<400> 22
ctggcggtgtt gaaacgtcag 20

10 <210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> secuencia sintética

15 <220>
<221> Cebador
<222> (1) ... (21)
<223> glnX2

20 <400> 23
cacgctgttc gcaacctaac c 21

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Bacterias de la especie *Escherichia coli*, productoras de L-treonina, que son resistentes a ácido α -amino- β -hidroxivalérico, en donde dichas bacterias contienen 1) dentro de la región codificadora del gen *rpoS* un (1) codón de terminación del tipo ámbar y (2) el correspondiente supresor ámbar, *supE*, en donde el codón de terminación del tipo ámbar se encuentra dentro de la región codificadora del gen *rpoS* correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína *RpoS*, de acuerdo con SEQ ID No. 2.
- 10 2.- Bacterias productoras de L-treonina según la reivindicación 1, en donde producen no más de 40% de L-lisina como un producto secundario, comparado con la cantidad de L-treonina deseada.
- 3.- Bacterias productoras de L-treonina según la reivindicación 2, en donde producen no más de 10% de L-lisina como un producto secundario, comparado con la cantidad de L-treonina deseada.
- 15 4.- Bacterias productoras de L-treonina según la reivindicación 2, en donde producen no más de 5% de L-lisina como un producto secundario, comparado con la cantidad de L-treonina deseada.
- 20 5.- Bacterias productoras de L-treonina según las reivindicaciones 1-4, en donde uno o más de los genes elegidos del grupo indicado más abajo se potencian simultáneamente, en particular se sobre-expresan:
- a) el operón *thrABC* que codifica aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa,
- b) el gen *pyc* que codifica piruvato carboxilasa,
- 25 c) el gen *pps* que codifica fosfoenolpiruvato sintasa,
- d) el gen *ppc* que codifica fosfoenolpiruvato carboxilasa,
- e) los genes *pntA* y *pntB* que codifican transhidrogenasa,
- 30 f) el gen *rhtB* que imparte resistencia a homoserina,
- g) el gen *mqo* que codifica malato:quinona oxidoreductasa,
- 35 h) el gen *rhtC* que imparte resistencia a treonina,
- i) el gen *thrE* procedente de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la proteína de exportación de treonina,
- j) el gen *gdhA* que codifica glutamato deshidrogenasa,
- 40 k) el gen *hns* que codifica la proteína HLP-II de unión a ADN,
- l) el gen *pgm* que codifica fosfoglucomutasa,
- 45 m) el gen *fba* que codifica fructosa bifosfato aldolasa,
- n) el gen *ptsI* en el operón *ptsHIcrr* que codifica la enzima I en el sistema de fosfotransferasa (PTS),
- 50 o) el gen *ptsH* en el operón *ptsHIcrr* que codifica la proteína de fosfohistidina, hexosa fosfotransferasa en el sistema de fosfotransferasa (PTS),
- p) el gen *crr* en el operón *ptsHIcrr* que codifica el componente IIA específico para glucosa en el sistema de fosfotransferasa (PTS),
- 55 q) el gen *ptsG* que codifica el componente IIBC específico para glucosa en el sistema de fosfotransferasa (PTS),
- r) el gen *lrp* que codifica el regulador en el regulón de leucina,
- 60 s) el gen *csrA* que codifica el regulador global,

- 5
- t) el gen fadR que codifica el regulador para el regulón fad,
 - u) el gen iclR que codifica el regulador para el metabolismo intermedio central,
 - v) el gen mopB que codifica la chaperona de 10 kd, que también se conoce por el nombre groES,
 - w) el gen ahpC en el operón ahpCF que codifica la subunidad pequeña de alquil hidroperóxido reductasa,
 - 10 x) el gen ahpF en el operón ahpCF que codifica la subunidad grande en la alquil hidroperóxido reductasa,
 - y) el gen cysK que codifica cisteína sintasa A,
 - z) el gen cysB que codifica el regulador para el regulón cys,
 - 15 aa) el gen cysJ en el operón cysJIH que codifica la flavoproteína en NADPH sulfito reductasa,
 - bb) el gen cysH en el operón cysJIH que codifica adenilsulfato reductasa, y
 - 20 cc) el gen cysI en el operón cysJIH que codifica la hemoproteína en NADPH sulfito reductasa,

6.- Bacterias productoras de L-treonina según las reivindicaciones 1-5, en donde están atenuados otros genes.

7.- Un procedimiento para preparar L-treonina o aditivos de piensos con contenido en L-treonina, que contiene las siguientes etapas

- 25
- a) fermentación de bacterias de la especie *Escherichia coli*, que son resistentes al ácido α -amino- β -hidroxivalérico y que contienen 1) dentro de la región codificadora del gen rpoS correspondiente a la posición 33 en la secuencia de aminoácidos de la proteína RpoS de acuerdo con SEQ ID No. 2 un codón de terminación del tipo ámbar y 2) el correspondiente supresor ámbar, supE,
 - 30 b) enriquecimiento de la L-treonina en el medio o en las células de los microorganismos, y
 - c) aislamiento de la L-treonina, en donde opcionalmente constituyentes procedentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa en su totalidad, o una proporción de los mismos (≥ 0 a 100) permanecen en el producto.
 - 35

8.- Un procedimiento según la reivindicación 7, en el que se utiliza la cepa DM1690 de *E. coli*, depositada como DSM 15189.

40 9.- Cepa DM1690 de *Escherichia coli* depositada como DSM 15189 en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania).

FIG. 1

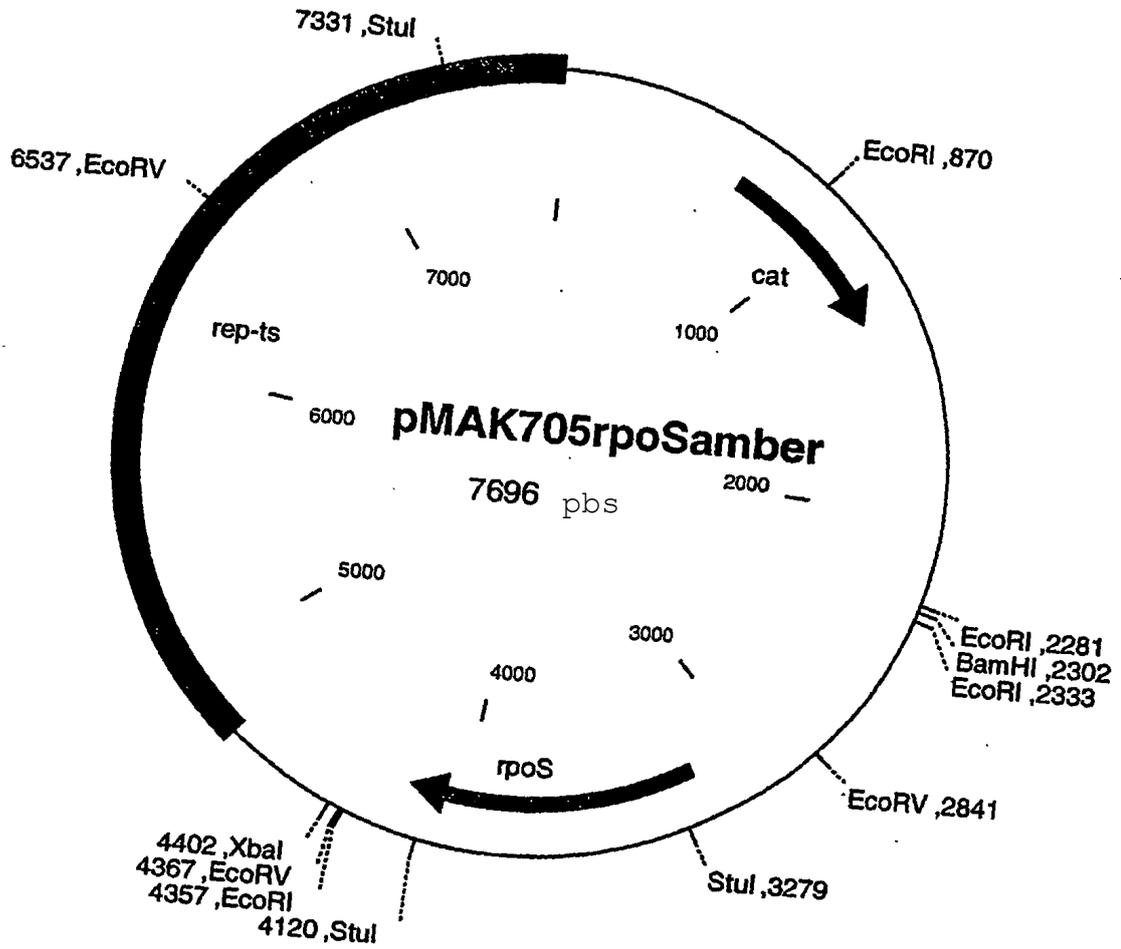


FIG. 2

