

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 385 651**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05701017 .5**

(96) Fecha de presentación: **18.01.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1706493**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

(54) Título: **Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos, que usa cepas de la familia de las Enterobacteriáceas**

(30) Prioridad:

23.01.2004 DE 102004003410

(73) Titular/es:

**Evonik Degussa GmbH
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2012

(72) Inventor/es:

RIEPING, Mechthild

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2012

(74) Agente/Representante:

Lehmann Novo, Isabel

ES 2 385 651 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 preparación de L-aminoácidos, que usa cepas de la familia de las Enterobacteriáceas

Campo del invento

Este invento se refiere a un procedimiento para la preparación de L-treonina y L-lisina, que usa microorganismos recombinantes de la familia de las Enterobacteriáceas, en el que el gen eno es intensificado, en particular sobreexpresado, y a estos microorganismos.

Antecedentes del invento

Los L-aminoácidos, en particular la L-treonina, se usan en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria de los alimentos y muy particularmente en la nutrición de animales.

Es conocido que se preparan L-aminoácidos por fermentación de cepas de Enterobacteriáceas, en particular de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*. A causa de su gran importancia, constantemente se están emprendiendo trabajos para mejorar los procesos de preparación. Los mejoramientos en los procesos se pueden relacionar con medidas técnicas de fermentación, tales como p.ej. agitación y suministro de oxígeno, o con la composición de los medios nutrientes, tales como p.ej. la concentración de azúcares durante la fermentación, o la elaboración a la forma de un producto, p.ej. por cromatografía con intercambio de iones, o a las propiedades intrínsecas de rendimiento de producción del microorganismo propiamente dicho.

Se usan métodos de mutagénesis, selección y selección de mutantes para mejorar las propiedades de rendimiento de producción de estos microorganismos. Se obtienen de esta manera unas cepas que son resistentes a unos antimetabolitos, tales como p.ej. el compuesto análogo a treonina ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV), o son auxótropas para metabolitos que tienen importancia reguladora y que producen L-aminoácidos tales como p.ej. L-treonina.

También se han empleado desde hace algunos años métodos de la tecnología del ADN recombinante para mejorar la(s) cepa(s) de la familia de las Enterobacteriáceas que producen L-aminoácidos, por amplificación de genes individuales de la biosíntesis de aminoácidos y por investigación del efecto sobre la producción. Una información recopiladora de la biología celular y molecular de *Escherichia coli* y *Salmonella* se puede 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), 2^a edición, ASM Press, Washington, D.C., EE.UU. (1996).

El documento de patente EP 1 382 685 A2 (de DEGUSSA AG, 21.01.2004) describe un procedimiento para la producción por fermentación de L-treonina, que emplea microorganismos recombinantes de la familia de las Enterobacteriáceas, en el que la productividad de L-treonina de una cepa de *Escherichia coli* ha sido mejorada por intensificación de la actividad de la proteína RseB.

Objeto del invento

El objeto del invento es proporcionar nuevas medidas técnicas para una mejorada preparación por fermentación de L-treonina y L-lisina.

35 Sumario del invento

Se describen unos microorganismos recombinantes de la familia de las Enterobacteriáceas, que contienen un gen eno intensificado o sobreexpresado, que codifica una enolasa, o alelos del mismo, y que produce L-treonina y L-lisina de una manera mejorada.

El punto de partida para la comparación lo constituyen en cada caso los microorganismos que no son recombinantes para el gen eno y que no contienen ningún gen eno intensificado.

Estos microorganismos incluyen, en particular, unos microorganismos de la familia de las Enterobacteriáceas, en los que es intensificado un polinucleótido que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en el grado de por lo menos 90 %, en particular en el grado de por lo menos 95 %, de manera preferible en el grado de por lo menos 98 % o de por lo menos 99 %, de manera particularmente preferida en el grado de 99,7 % y de manera muy particularmente preferible en el grado de 100 %, a una secuencia de aminoácidos escogida a partir del conjunto que consiste en SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, y SEQ ID No. 8.

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

Los microorganismos mencionados contienen polinucleótidos intensificados o sobreexpresados, escogidos entre el conjunto que consiste en:

- 5 a) un polinucleótido con la secuencia 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 SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7 dentro del contexto de la degeneración del código genético;
- c) una secuencia de polinucleótidos con una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia complementaria con respecto a SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7;
- 10 d) un polinucleótido con una secuencia de SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7 que contiene mutantes con sentido de función neutra,

en donde los polinucleótidos codifican una enolasa.

El invento proporciona un procedimiento para la preparación por fermentación de L-treonina y L-lisina, que usa microorganismos recombinantes de la familia de las Enterobacteriáceas que, en particular, ya producen los L-aminoácidos, y en el que por lo menos se intensifica(n) el gen eno o las secuencias de nucleótidos que codifican el producto génico del mismo.

Descripción detallada del invento

Se emplean preferiblemente los microorganismos descritos.

20 Cuando se mencionan unos L-aminoácidos o aminoácidos, en lo sucesivo esto significa uno o más aminoácidos, incluyendo a sus sales, que se escogen entre el conjunto que consiste en L-treonina y L-lisina. Se prefiere particularmente la L-treonina.

25 El término "intensificación" en este contexto describe el aumento en la actividad o concentración intracelular 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 de los genes por al menos una (1) copia, engarzando un potente promotor funcionalmente con el gen o usando un gen o alelo que codifica una correspondiente enzima o proteína con una alta actividad, y combinando opcionalmente estas medidas técnicas.

Los alelos se entienden en general como que significan formas alternativas de un gen dado. Las formas se distinguen por diferencias en la secuencia de nucleótidos.

30 La proteína codificada por una secuencia de nucleótidos, es decir un ORF (cuadro de lectura abierto), un gen o un alelo, o el ácido ribonucleico codificado, se denomina en general el producto génico.

Por medidas técnicas de intensificación, la actividad o concentración de la correspondiente proteína se aumenta en general por al menos 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 % o 500 %, hasta un máximo de un 1.000 % o 2.000 %, basándose en la de la proteína de tipo silvestre o en la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo o cepa parental que no es recombinante para la correspondiente enzima o proteína.

35 Se entiende que un microorganismo o cepa parental que no es recombinante significa el microorganismo en el que se llevan a cabo las medidas técnicas.

El invento proporciona un procedimiento para la preparación de L-treonina o L-lisina por fermentación de microorganismos recombinantes de la familia de las Enterobacteriáceas, caracterizado porque

- 40 a) los microorganismos de la familia de las Enterobacteriáceas, que producen el deseado L-aminoácido y en los que el gen eno o sus alelos es/son intensificado(s), en particular sobreexpresado(s), se cultivan en un medio en unas condiciones apropiadas para la formación del producto del gen eno,
- b) el deseado L-aminoácido es concentrado en el medio o en las células de los microorganismos, y
- c) el deseado L-aminoácido es aislado, quedando en el producto que ha sido aislado o siendo completamente retirados ciertos constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o en porciones (de ≥ 0 a 100 %).

Los microorganismos recombinantes con un gen eno intensificado pueden producir L-aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, opcionalmente un almidón, opcionalmente una celulosa o a partir de glicerol y etanol. Ellos son representantes de la familia de las Enterobacteriáceas, escogidos entre los géneros Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia. Se prefieren los géneros Escherichia y Serratia. Del género

5 Escherichia en particular se ha de mencionar la especie Escherichia coli y del género Serratia en particular se ha de mencionar la especie Serratia marcescens.

Se producen microorganismos recombinantes en general por transformación, transducción o conjugación, o por una combinación de estos métodos, con un vector que contiene el gen deseado, un alelo de este gen o partes del mismo y/o un promotor que intensifica la expresión del gen. Este promotor puede ser el promotor que se origina intensificando una mutación a partir de la secuencia reguladora endógena situada corriente arriba del gen, o un promotor eficiente que ha sido fusionado con el gen.

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

- Escherichia coli H4581 (documento de patente europea EP 0 301 572)
- 15 - 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)
- 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)
- 20 - Escherichia coli kat 13 (documento de solicitud de patente internacional WO 98/04715)
- Escherichia coli KCCM-10132 (documento WO 00/09660).

Unas apropiadas cepas productoras de 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 de la familia de las Enterobacteriáceas que producen L-treonina, preferiblemente tienen, entre otras, una o más características genéticas o fenotípicas escogidas entre el conjunto que consiste en: resistencia al ácido α -amino- β -hidroxivalérico, resistencia a la tialisina, resistencia a la etionina, resistencia a la α -metilserina, resistencia al ácido diaminosuccínico, resistencia al ácido α -aminobutírico, resistencia a la borrelidina, resistencia al ácido ciclopentano-carboxílico, resistencia a la rifampicina, resistencia a compuestos análogos a la valina, tales como, por ejemplo, hidroxamato de valina, resistencia a compuestos análogos a la purina, tales como, por ejemplo, 6-dimetilaminopurina, una necesidad de L-metionina, opcionalmente una necesidad parcial y compensable de L-isoleucina, una necesidad de ácido meso-diaminopimélico, auxotrofía con respecto a dipéptidos que contienen treonina, resistencia a la L-treonina, resistencia a un material refinado de treonina, resistencia a la L-homoserina, resistencia a la L-lisina, resistencia a la L-metionina, resistencia al L-ácido glutámico, resistencia a un L-aspartato, resistencia a la L-leucina, resistencia a la L-fenilalanina, resistencia a la L-serina, resistencia a la L-cisteína, resistencia a la L-valina, sensibilidad a un fluoropiruvato, treonina deshidrogenasa en defecto, opcionalmente una aptitud para la utilización de sacarosa, intensificación del operón de treonina, intensificación de la homoserina deshidrogenasa I - aspartato cinasa I, preferiblemente de la forma resistente a la retroalimentación, intensificación de la homoserina cinasa, intensificación de la treonina sintasa, intensificación de la aspartato cinasa, opcionalmente a la forma resistente a la retroalimentación, intensificación de la aspartato semialdehído deshidrogenasa, intensificación de la fosfoenol piruvato carboxilasa, opcionalmente de la forma resistente a la retroalimentación, intensificación de la fosfoenol piruvato sintasa, intensificación de una transhidrogenasa, intensificación del producto del gen de RhtB, intensificación del producto del gen de RhtC, intensificación del producto del gen de YfiK, intensificación de una piruvato carboxilasa, y atenuación de la formación de ácido acético.

Se ha encontrado que ciertos microorganismos de la familia de las Enterobacteriáceas producen L-treonina y L-lisina de una manera mejorada después de una intensificación, en particular una sobreexpresión del gen eno o de alelos del mismo.

Las secuencias de nucleótidos de los genes de *Escherichia coli* pertenecen a la técnica anterior (véanse las siguientes referencias de textos) y se pueden encontrar también en la secuencia del genoma de *Escherichia coli* publicada por Blattner y colaboradores (Science 277: 1453-1462 (1997)). Es conocido que unas enzimas endógenas en el anfitrión (metionina aminopeptidasa) pueden disociar al aminoácido terminal de N, metionina.

Las secuencias de nucleótidos para el gen eno son similarmente conocidas a partir de *Shigella flexneri* y de *Salmonella typhimurium*, que también pertenecen a la familia de las Enterobacteriáceas.

10 El gen eno es descrito, entre otros, por los siguientes datos:

Descripción: enolasa, fosfopiruvato hidratasa
 Función: enolización (disociación de agua): de 2-fosglicerato a fosfoenol piruvato en una glicolisis
 EC No.: EC 4.2.1.11
 Referencia: Spring TG. y Wold F.; The Journal of Biological Chemistry 246(22): 6797-6802 (1971)
 15 Klein y colaboradores, DNA Sequence 6(6): 351-355 (1996)
 Gulick y colaboradores; Biochemistry 40(51): 15716 -15724 (2001)
 Kaga y colaboradores; Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66(10): 2216-2220 (2002)
 Nº de Acceso: AE000361

20 El gen eno procedente de *Salmonella typhimurium* es descrito, entre otras citas, en la siguiente referencia: Garrido-Pertierra A.; Revista Española de Fisiología 36(1): 33-39 (1980).

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden ser encontradas en los bancos de datos en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.), en el banco de datos de las secuencias de nucleótidos de los European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania y Cambridge, Reino Unido) o en el banco de datos de ADN del Japón (DDBJ, Mishima, Japón).

Para una mejor claridad, la conocida secuencia de nucleótidos del gen eno procedente de *Escherichia coli* ha de encontrarse en SEQ ID No. 3 y las secuencias conocidas para el gen eno procedente de *Shigella flexneri* (AE015293) y de *Salmonella typhimurium* (AE008835) se han de encontrar bajo las SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por estos cuadros de lectura se muestran como SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 o SEQ ID No. 8.

30 Los genes descritos en las mencionadas referencias de textos se pueden usar de acuerdo con el invento. Se pueden usar además unos alelos de los genes que resultan de la degeneración del código genético o debidos a "mutaciones con sentido" de función neutra. Se prefiere el uso de genes endógenos.

35 Se entiende que los términos "genes endógenos" o "secuencias de nucleótidos endógenas" significan los genes o alelos o las secuencias de nucleótidos que están presentes en la población de una especie.

Unos alelos apropiados del gen eno, que contienen mutaciones con sentido de función neutra, incluyen, entre otros, los que conducen a lo sumo a 50 o a lo sumo a 40 o a lo sumo a 30 o a lo sumo a 20, de manera preferible a lo sumo a 10 o a lo sumo a 5, de manera muy particularmente preferible a lo sumo a 3 o a lo sumo a 2 o al menos a un (1) intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos en la proteína codificada por ellos.

40 En el caso de aminoácidos aromáticos, se hace referencia a intercambios conservativos cuando la fenilalanina, el triptófano y la tirosina se intercambian entre sí. En el caso de aminoácidos hidrófobos, se hace referencia a intercambios conservativos cuando la leucina, la isoleucina y la valina se intercambian entre sí. En el caso de aminoácidos polares, se hace referencia a intercambios conservativos cuando la glutamina y la asparagina se intercambian entre sí. En el caso de aminoácidos de carácter básico, se hace referencia a intercambios conservativos cuando la arginina, la lisina y la histidina se intercambian entre sí. En el caso de aminoácidos de carácter ácido, se hace referencia a intercambios conservativos cuando el ácido aspártico y el ácido glutámico se intercambian entre sí. En el caso de aminoácidos que contienen grupos hidroxilo, se hace referencia a intercambios conservativos cuando la serina y la treonina se intercambian entre sí. Todos los otros intercambios de aminoácidos son denominados intercambios de aminoácidos no conservativos.

50 De la misma manera, se pueden usar también aquellas secuencias de nucleótidos que codifican unas variantes de las proteínas mencionadas, que adicionalmente contienen un alargamiento o un acortamiento por al menos un (1) aminoácido en el terminal de N o C. Este alargamiento o acortamiento no es de más que 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 o 2 aminoácidos o radicales de aminoácidos.

Unos apropiados alelos incluyen también los que codifican unas proteínas en las que por lo menos un (1) aminoácido es introducido (inserción) o retirado (deleción). El número máximo de dichos cambios, denominados indelos, se puede relacionar con 2, 3, 5, 10, 20 pero en ningún caso más de 30 aminoácidos.

Unos apropiados alelos incluyen además los que son obtenibles por hibridación, en particular en condiciones rigurosas, usando una SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7 o partes de las mismas, en particular las regiones de codificación o las secuencias complementarias con ellas.

Unas instrucciones para identificar secuencias de ADN por medio de una hibridación se pueden encontrar por parte del experto, entre otras citas, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" [La guía para los usuarios del sistema DIG para la hibridación con filtros] de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en la cita de Liebl y colaboradores (International Journal of Systematic Bacteriology [Revista Internacional de Bacteriología Sistemática] 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas, es decir que solamente se forman unos híbridos en los que la sonda y la secuencia diana, es decir los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticas/os al menos en un 80 %. Es conocido que la rigurosidad de la hibridación, inclusive las operaciones de lavado, es influida o determinada haciendo variar la composición del tampón, la temperatura y la concentración de sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo en general mediando una rigurosidad relativamente baja comparada con las operaciones de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996).

Un tampón que corresponde al 5x SSC de tampón a una temperatura de aproximadamente 50°C – 68°C, por ejemplo, se puede emplear para la reacción de hibridación. Las sondas se pueden hibridar aquí también con unos polinucleótidos que son idénticos en menos que 80 % a la secuencia de la sonda. Dichos híbridos son menos estables y son eliminados por lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, disminuyendo la concentración de sales a 2x SSC y opcionalmente de modo subsiguiente a 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995) siendo establecida 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 - 68°C, aproximadamente 64°C - 68°C o aproximadamente 66°C - 68°C. Los intervalos de temperaturas de aproximadamente 64°C - 68°C o de aproximadamente 66°C - 68°C son preferidos. Opcionalmente es posible disminuir la concentración de sales a una concentración correspondiente a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Unos fragmentos de polinucleótidos que son idénticos, por ejemplo, por lo menos en un 80 % o por lo menos en un 90 %, por lo menos en un 91 %, por lo menos en un 92 %, por lo menos en un 93 %, por lo menos en un 94 %, por lo menos en un 95 %, por lo menos en un 96 %, por lo menos en un 97 %, por lo menos en un 98 % o por lo menos en un 99 % a la secuencia de la sonda empleada o a las secuencias de nucleótidos que se muestran en SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7, se pueden aislar aumentando la temperatura de hibridación escalonadamente desde 50°C hasta 68°C en escalones de aproximadamente 1 – 2°C. Unas instrucciones adicionales acerca de la hibridación son obtenibles en el mercado en la forma de unos denominados estuches (p.ej. el DIG Easy Hyb de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania , nº de catálogo 1603558). Las secuencias de nucleótidos obtenidas de esta manera codifican unos polipéptidos que son idénticos por lo menos en 90 %, en particular idénticos en el grado de por lo menos 95 %, de manera preferible en el grado de por lo menos 98 % o de por lo menos 99 %, de manera muy particularmente preferible en el grado de 99,7%, a las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 o SEQ ID No. 8.

Para conseguir una intensificación, por ejemplo, se puede aumentar la expresión de los genes o de las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas. Las dos medidas técnicas pueden opcionalmente ser combinadas.

Así, por ejemplo, se puede aumentar el número de copias de los correspondientes genes, o se pueden mutar las regiones de promotores y de regulación o el sitio de fijación a ribosomas situado corriente arriba del gen estructural. Unos casetes de expresión, que son incorporados corriente arriba del gen estructural, actúan de la misma manera. Mediante unos promotores inducibles, es adicionalmente posible aumentar la expresión en el curso de la producción de L-treonina por fermentación, y puede además ser ventajoso también usar unos promotores para la expresión de genes, que permiten otra expresión de un gen con respecto al tiempo. La expresión es mejorada similarmente por medio de medidas técnicas para prolongar la vida del ARNm (mensajero). Además, la actividad de la enzima es también aumentada impidiendo la degradación de la proteína enzimática. Los genes o las construcciones artificiales de genes pueden o bien estar presentes en plásmidos con un número variable de copias, o se pueden integrar y amplificar en el cromosoma. Alternativamente, una sobreexpresión de los genes en cuestión se puede conseguir además también por cambio de la composición de los medios y del proceso de cultivo.

Unos métodos de sobreexpresión se describen adecuadamente en la técnica anterior – por ejemplo por Makrides y colaboradores (Microbiological Reviews 60 (3), 512-538 (1996)). Usando unos vectores, el número de copias es aumentado por al menos una (1) copia. Unos vectores que se pueden usar son unos plásmidos tales como los que se describen, por ejemplo, en el documento US 5.538.873. Unos vectores que se pueden usar también son unos fagos, por ejemplo el fago Mu, tal como se describe en el documento EP 0332448, o el fago lambda (λ). Un aumento en el número de copias se puede conseguir también incorporando una copia adicional en un sitio adicional del

cromosoma – por ejemplo en el sitio att del fago λ (Yu y Court, Gene 223, 77-81 (1998)). El documento US 5.939.307 describe que por incorporación de casetes de expresión o promotores, tales como, por ejemplo, el promotor tac, el promotor trp, el promotor lpp o el promotor P_L y el promotor P_R del fago λ por ejemplo corriente arriba del operón de treonina cromosomal, era posible conseguir un aumento en la expresión. Los promotores del fago T7,

5 los promotores de caja de engranajes o el promotor nar se pueden usar de la misma manera. Dichos casetes de expresión o promotores se pueden usar también, tal como se describe en el documento EP 0 593 792, para sobreexpresar genes unidos a plásmidos. Usando el alelo lac^Q se puede controlar a su vez la expresión de genes unidos a plásmidos (Glascock y Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)). Es posible además que la actividad de los promotores sea aumentada por modificación de su secuencia por medio de uno o más intercambio(s) de nucleótidos, mediante una o varias inserción(ones) y/o delección(ones). Otra expresión de un gen con respecto al tiempo se puede conseguir, por ejemplo, tal como se ha descrito por Walker y colaboradores (Journal of Bacteriology 181: 1269-80 (1999)) usando el promotor fis dependiente de la fase de crecimiento.

10 El experto puede encontrar instrucciones generales a este respecto, entre otras citas, en la de Chang y Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), en la de Hartley y Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), en la de Amann y Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), en la de Broer y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América] 80: 21-25 (1983)), en la de LaVallie y colaboradores (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), en el documento de patente PCT/US97/13359, en la cita de Llosa y colaboradores (Plasmid 26: 222-224 (1991)), en la cita de Quandt y Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), en la cita de Hamilton y colaboradores (Journal of Bacteriology 171:4617-4622 (1989)), en la cita de Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) y en libros de texto conocidos de biología genética y molecular.

20 Se pueden usar unos vectores plasmídicos que se pueden replicar en Enterobacteriáceas, tales como p.ej. vectores de clonación que se derivan de derivados de pACYC184 (Bartolomé y colaboradores; Gene 102: 75-78 (1991)), de pTrc99A (Amann y colaboradores; Gene 69: 301-315 (1988)) o de pSC101 (Vocke y Bastia; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561 (1983)). Una cepa transformada con un vector plasmídico, en donde el vector plasmídico lleva por lo menos el gen eno o una secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico del mismo o un alelo, se puede emplear en un procedimiento de acuerdo con el invento.

25 Se entiende que el término transformación significa la absorción y recogida de un ácido nucleico aislado por un anfitrión (microorganismo).

30 También es posible transferir unas mutaciones que afectan a la expresión de los genes particulares dentro de diversas cepas por medio de intercambio de secuencias (Hamilton y colaboradores; (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), conjugación o transducción.

35 Unas explicaciones más detalladas de los términos en biología genética y molecular se encuentran en libros de texto conocidos de biología genética y molecular, tal como, por ejemplo, en el libro de texto de Birge (Bacterial y Bacteriophage Genetics, 4^a edición, editorial Springer, Nueva York (EE.UU.), 2000) o en el libro de texto de Berg, Tymoczko y Stryer (Biochemistry, 5^a edición, Freeman and Company, Nueva York (EE.UU.), 2002) o en el manual de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning, A Laboratory Manual [Clonación molecular, un manual de laboratorio] (conjunto de 3 volúmenes), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE.UU.), 2001).

40 Puede además ser ventajoso que la producción de L-treonina con cepas de la familia de las Enterobacteriáceas intensifique a una o más enzimas de la conocida ruta de biosíntesis de la treonina o enzimas del metabolismo anaplerótico o enzimas para la producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido o enzimas de glicólisis o enzimas de PTS o enzimas del metabolismo del azufre, además de la intensificación del gen eno. Se prefiere en general el uso de genes endógenos.

45 Por consiguiente, al mismo tiempo se puede(n) intensificar uno o más de los genes escogidos entre el conjunto que consiste en

- 50 • 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 de Corynebacterium glutamicum que codifica la piruvato carboxilasa (documento WO 99/18228),
- el gen pps que codifica la fosfoenol piruvato sintasa (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),
- el gen ppc que codifica la fosfoenol piruvato carboxilasa (documento WO 02/064808),

- los genes pntA y pntB que codifican subunidades de la piridina transhidrogenasa (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
 - el gen rhtB que codifica la proteína que confiere resistencia a homoserina (documento de solicitud de patente europea (EP-A-0 994 190),
- 5 • el gen rhtC que codifica la proteína que confiere resistencia a treonina (documento EP-A-1 013 765),
- el gen thrE de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la proteína portadora de exportación de treonina (documento WO 01/92545),
 - el gen gdhA que codifica la glutamato deshidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- 10 • 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 de ptsHlcrr que codifica la fosfohistidina proteína hexosa fosfotransferasa del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
- 15 • el gen ptsI del operón ptsHlcrr que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
- el gen crr del operón ptsHlcrr que codifica el componente IIA específico para glucosa del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
 - 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 fad (documento WO 03/038106),
- el gen iclR que codifica el regulador del metabolismo intermedio central (documento WO 03/038106),
 - el gen ahpC del operón ahpCF que codifica la subunidad pequeña de una alquil hidroperóxido reductasa (documento WO 03/004663),
- 25 • el gen ahpF del operón ahpCF que codifica la subunidad grande de una alquil hidroperóxido reductasa (documento WO 03/004663),
- el gen cysK que codifica la cisteína sintasa A (documento WO 03/006666),
 - el gen cysB que codifica el regulador del regulón cys (documento WO 03/006666),
 - el gen cysJ del operón cysJIH que codifica la flavoproteína de NADPH sulfito reductasa (documento WO 03/006666),
- 30 • el gen cysI del operón cysJIH que codifica la hemoproteína de NADPH sulfito reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen cysH del operón cysJIH que codifica la adenilil sulfato reductasa (documento WO 03/006666),
 - el gen rseA del operón rseABC que codifica una proteína de membrana con actividad anti-sigmaE (documento WO 03/008612),
- 35 • el gen rseC del operón rseABC que codifica un regulador global del factor sigmaE (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),

- el gen sucB del operón sucABCD que codifica la subunidad E2 de dihidrolipoíltranssuccinasa de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa (documento WO 03/008614),
- el gen sucC del operón sucABCD que codifica la subunidad β de la succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- 5 • el gen sucD del operón sucABCD que codifica la subunidad α de la succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- el gen aceE que codifica el componente E1 del complejo de la piruvato deshidrogenasa (documento WO 03/076635),
- 10 • el gen aceF que codifica el componente E2 del complejo de la piruvato deshidrogenasa (documento WO 03/076635), y
- el gen rseB que codifica el regulador de la actividad del factor sigmaE (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997)),
- 15 • el producto génico del cuadro de lectura abierto (ORF, acrónimo de Open Reading Frame) yodA de Escherichia coli (Número de Acceso AE000288 en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento de patente alemana DE10361192.4),
- el producto génico del cuadro de lectura abierto (ORF) yaaU de Escherichia coli (Número de Acceso AE005181 en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento DE10361268.8) y
- 20 • el gen malT que codifica el activador de transcripción positiva del regulón de maltosa (Gene 42: 201-208 (1986)).

Adicionalmente puede ser ventajoso para la producción de L-treonina, además de la intensificación del gen eno, que uno o más de los genes escogidos entre el conjunto que consiste en

- 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)),
- 25 • el producto génico del cuadro de lectura abierto (orf) yjfA de Escherichia coli (Número de Acceso AAC77180 en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), documento WO 02/29080)),
- el producto génico del cuadro de lectura abierto (orf) ytfP de Escherichia coli (Número de Acceso AAC77179 en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), WO 02/29080)),
- 30 • el gen pckA que codifica la enzima fosfoenol piruvato carboxicinasa (documento WO 02/29080),
- el gen poxB que codifica la piruvato oxidasa (documento WO 02/36797),
- 35 • el gen dgsA que codifica el regulador DgsA del sistema de la fosfotransferasa (documento WO 02/081721) y es conocido también bajo el nombre del gen mlc,
- el gen fruR que codifica el represor de fructosa (documento WO 02/081698) y es conocido también bajo el nombre del gen cra,
- el gen rpoS que codifica el factor sigma³⁸ (documento WO 01/05939) y es conocido también bajo el nombre del gen katF, y
- 40 • el gen aspA que codifica la aspartato amonio liase (documento WO 03/008603),

sea(n) atenuado(s), en particular eliminado(s) o que su expresión sea reducida.

El término “atenuación” en este contexto describe la reducción o eliminación de la actividad o concentración intracelular de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo, que son codificadas por el correspondiente ADN, por ejemplo por uso de un promotor más débil que en el microorganismo o cepa parental que no es recombinante para la correspondiente enzima o proteína, o un gen o alelo que codifica una correspondiente enzima o proteína con una baja actividad, o desactivando la correspondiente enzima (proteína) o el cuadro de lectura abierto o el gen, y opcionalmente combinar estas medidas técnicas.

Mediante medidas técnicas de atenuación, la actividad o concentración de la correspondiente proteína es en general reducida 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 silvestre o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo o cepa parental que no es recombinante para la correspondiente enzima o proteína. Se entiende que un microorganismo o una cepa parental que no es recombinante significa el microorganismo en el que se llevan a cabo las medidas técnicas.

Para conseguir una atenuación, por ejemplo, se puede reducir o eliminar la expresión de los genes o cuadros de lectura abiertos o las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas. Las dos medidas técnicas pueden opcionalmente ser combinadas.

- 5 La reducción en la expresión de genes puede tener lugar por apropiada cultivación, por modificación genética (mutación) de las estructuras de señales de expresión de los genes o también mediante la tecnología de ARN antisentido. Unas estructuras de señales de la expresión de genes son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de fijación a ribosomas, el codón de iniciación y terminadores. El experto puede encontrar información a este respecto, entre otras citas, por ejemplo, en la de Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58: 191-195 (1998)), en la de Carrier y Keasling (*Biotechnology Progress* 15: 58-64 (1999)), en la de Franch y Gerdes (*Current Opinion in Microbiology* 3: 159-164 (2000)) y en libros de texto conocidos de biología genética y molecular, tal como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers (“*Molekulare Genetik [Genética molecular]*”, 6^a edición, editorial Georg Thieme, Stuttgart, Alemania, 1995) o el de Winnacker (“*Gene und Klone [Genes y clones]*”, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990).
- 10 Unas mutaciones que conducen a un cambio o a una reducción en las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas son conocidas a partir de la técnica anterior. Ejemplos que pueden ser mencionados son 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)), de Wente y Schachmann (*Journal of Biological Chemistry* 266: 20833-20839 (1991)). Unas descripciones recopiladoras se pueden encontrar en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tal como p.ej. el de Hagemann (“*Allgemeine Genetik [genética general]*”, Editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1986).

Unas posibles mutaciones son transiciones, transversiones, inserciones y delecciones de por lo menos un (1) par de bases o nucleótido. Dependiendo del efecto del intercambio de aminoácidos, causado por la mutación de la actividad de enzima, se hace referencia a “mutaciones con sentido erróneo” o “mutaciones sin sentido”. Una mutación con sentido erróneo conduce a un intercambio de un aminoácido dado en una proteína por otro, siendo éste, en particular, un intercambio no conservativo de aminoácidos. La capacidad o actividad funcional de la proteína es perjudicada por estos medios y es reducida a un valor de 0 a 75 %, de 0 a 50 %, de 0 a 25 %, de 0 a 10 % o de 0 a 5 %. Una mutación sin sentido conduce a un codón de detención en la región de codificación del gen y por lo tanto a una interrupción prematura en la traducción. Unas inserciones o delecciones de por lo menos un par de bases en un gen conducen a unas mutaciones de desplazamiento del cuadro, que conducen a que unos aminoácidos incorrectos sean incorporados o a que la traducción sea interrumpida prematuramente. Si se forma un codón de detención en la región de codificación como una consecuencia de la mutación, esto conduce también a una terminación prematura de la traducción. Unas delecciones de por lo menos uno (1) o más codones conducen típicamente también a una pérdida completa de la actividad de la enzima.

- 15 Unas instrucciones acerca de la generación de dichas mutaciones constituyen una técnica anterior y se pueden encontrar en conocidos libros de texto de genética y biología molecular, tales como p.ej. el libro de texto de Knippers (“*Molekulare Genetik [Genética molecular]*”, 6^a 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).
- 20 Unas mutaciones apropiadas en los genes pueden ser incorporadas dentro de cepas apropiadas mediante reemplazo de genes o alelos.

Un método corriente es el método, descrito por Hamilton y colaboradores (*Journal of Bacteriology* 171: 4617-4622 (1989)), de reemplazo de genes con la ayuda de un derivado de pSC101 pMAK705, que se replica condicionadamente. Se pueden usar similarmente otros métodos descritos en la técnica anterior, tales como, por ejemplo, el de Martínez-Morales y colaboradores (*Journal of Bacteriology* 181: 7143-7148 (1999)) o el de Boyd y colaboradores (*Journal of Bacteriology* 182: 842-847 (2000)).

También es posible transferir unas mutaciones en los genes particulares o unas mutaciones que afectan a la expresión de los genes o de cuadros de lectura abiertos particulares dentro de diversas cepas, por conjugación o transducción.

Además de la intensificación del gen eno, puede ser ventajoso además, para la producción de L-treonina y L-lisina, eliminar unas reacciones secundarias indeseables (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 pueden ser cultivados en el proceso batch (cultivo discontinuo, por tandas), en el proceso fed batch (proceso de alimentación), en el proceso repeated fed batch (proceso de alimentación repetida) o en un proceso continuo (documentos DE102004028859.3 o US 5.763.230). Un sumario de métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocessos 1 Introducción en la técnica de los procedimientos biológicos] (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und peripherie Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo que se ha de usar debe de cumplir los requisitos de las cepas particulares de una manera apropiada. Unas descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos están contenidas en el libro de texto "Manual of Methods for General Bacteriology" [Manual de métodos para bacteriología general] de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981).

Azúcares e hidratos de carbono, tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, un almidón y opcionalmente una celulosa, 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, se pueden usar como la fuente de carbono. Estas sustancias se pueden usar individualmente o como una mezcla.

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

El ácido fosfórico, el dihidrógeno fosfato de potasio o el hidrógeno fosfato de dipotasio o las correspondientes sales que contienen sodio, se pueden usar como la fuente de fósforo. Los medios de cultivo deben de comprender 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 esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas, además de las sustancias más arriba mencionadas.

Unos compuestos precursores apropiados se pueden añadir además al medio de cultivo. Las sustancias de partida mencionadas se pueden añadir al cultivo en la forma de una única tanda, o se pueden alimentar durante la cultivación de una manera apropiada.

La fermentación se lleva a cabo en general a un pH de 5,5 a 9,0, en particular de 6,0 a 8,0. Unos compuestos de carácter básico, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o amoniaco acuoso, o unos compuestos de carácter ácido, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se pueden emplear de una manera apropiada para controlar el pH del cultivo. Se pueden emplear unos agentes antiespumantes, tales como p.ej. ésteres de polílicos con ácidos grasos, para reprimir el desarrollo de espuma. Unas sustancias apropiadas que tienen una acción selectiva, p.ej. unos antibióticos, se pueden añadir al medio para mantener la estabilidad de los plásmidos. Para mantener unas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como p.ej. aire. La temperatura del cultivo es usualmente de 25°C a 45°C, y preferiblemente de 30°C a 40°C. La cultivación se continúa hasta que se haya formado una cantidad máxima de L-aminoácidos o L-treonina. Este objetivo se alcanza usualmente en el transcurso de 10 horas a 160 horas.

Los análisis de L-aminoácidos se pueden llevar a cabo por cromatografía con intercambio de aniones con subsiguiente derivatización con ninhidrina, tal como ha sido descrita por Spackman y colaboradores (Analytical Chemistry, 30: 1190-1206 (1958)) o se pueden llevar a cabo por una HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) en fase inversa, tal como ha sido descrita por Lindroth y colaboradores (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

El procedimiento de acuerdo con el invento se usa para la preparación por fermentación de L-treonina y L-lisina, en particular de L-treonina.

El siguiente microorganismo ha sido depositado en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ = colección alemana de microorganismos y cultivos celulares), Braunschweig, Alemania) de acuerdo con el tratado de Budapest:

- cepa de Escherichia coli E. coli MG442 como DSM 16574.

5 El presente invento es explicado con mayor detalle a continuación con la ayuda de ejemplos de realización.

Los medios mínimos (M9) y completos (LB) para Escherichia coli usados se han descrito por J.H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics [Un corto curso en genética bacteriana] (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento de un ADN plasmídico a partir de Escherichia coli y todas las técnicas de restricción, ligación 10 tratamiento Klenow y tratamiento con una fosfatasa alcalina, se llevan a cabo por el método de Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). A menos que se describa otra cosa distinta, la transformación de Escherichia coli se lleva a cabo por el método de Chung y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175 (1989)).

La temperatura de incubación para la preparación de cepas y transformantes es de 37°C.

15 Ejemplo 1

Construcción del plásmido de expresión pTrc99Aeno

El gen eno procedente de E. coli K12 es amplificado usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, acrónimo 20 de polymerase chain reaction) y oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia de nucleótidos del gen eno en E. coli K12 MG1655 (Número de Acceso AE000361, Blattner y colaboradores, (Science 277: 1453-1474 (1997)), se sintetizan unos cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Los cebadores contienen unas secuencias para enzimas de restricción que son marcadas subrayando en la secuencia de nucleótidos mostrada seguidamente. El cebador eno1 contiene el sitio de disociación por restricción para XbaI, el cebador eno2 contiene el sitio para HindIII.

eno1 :

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

eno2 :

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

25 El ADN cromosomal de E. coli K12 MG1655 empleado para la PCR es aislado de acuerdo con las instrucciones del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 1.381 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. Una guía para métodos y aplicaciones], Academic Press) con la polimerasa de ADN Vent (New England BioLabs, Frankfurt, Alemania), (SEQ ID No. 3).

30 El fragmento de eno amplificado es restringido con las enzimas de restricción HindIII y XbaI y después de una purificación (con el Purification Kit [Estuche de purificación], de QIAGEN, Hilden, Alemania) comprobada en un gel de agarosa al 0,8 %. El vector pTrc99A (de Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) es disociado con las enzimas HindIII y XbaI y una ligación se lleva a cabo con el fragmento de eno restringido. La cepa de E. coli TOP10 One Shot (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Los Países Bajos) es transformada con la tanda de ligación, y se seleccionan células portadoras de un plásmido sobre un agar LB, al que se le han añadido 50 µg/ml de ampicilina. Una clonación satisfactoria puede ser demostrada después de un aislamiento del ADN plasmídico mediante una disociación de control con las enzimas HindIII/XbaI y PvuI. El plásmido es denominado pTrc99Aeno (figura 1).

Ejemplo 2

40 Preparación de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99Aeno

La cepa MG442 de E. coli productora de L-treonina es descrita en la memoria descriptiva de la patente US-A-4.278.765 y ha sido depositada como CMIM B-1628 en la Colección Nacional Rusa para Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia) y como DSM 16574 en la Colección Alemana para Microorganismos y Cultivos

Celulares (DSMZ = acrónimo de Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemania) de acuerdo con el tratado de Budapest.

La cepa MG442 es transformada con el plásmido de expresión pTrc99Aeno descrito en el Ejemplo 1 y con el vector pTrc99A y unas células portadoras del plásmido son seleccionadas sobre un agar LB con 50 µg/ml de ampicilina.

5 Unas transformaciones satisfactorias pueden ser demostradas después de un aislamiento del ADN plasmídico mediante disociaciones de control con las enzimas HindIII/XbaI. Las cepas MG442/pTrc99Aeno y MG442/pTrc99A son formadas de esta manera. Luego, unas colonias individuales seleccionadas son multiplicadas adicionalmente sobre un medio mínimo que tiene la siguiente composición: 3,5 g/l de Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de NH₄Cl, 0,1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar y 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina es comprobada en cultivos en tandas de 10 ml contenidos en matraces cónicos 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, 10 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de MgSO₄*7H₂O, 15 g/l de CaCO₃, 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina, y la tanda es incubada durante 16 horas a 37°C y 180 rpm en una incubadora ESR procedente de Kühner AG (Birsfelden, Suiza).

10 15 Unas porciones de 250 µl de este cultivo previo son inoculadas por transmisión dentro de 10 ml de un medio de producción (25 g/l de (NH₄)₂SO₄, 2 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 0,03 g/l de FeSO₄*7H₂O, 0,018 g/l de MnSO₄*1H₂O, 30 g/l de CaCO₃, 20 g/l de glucosa y 50 mg/l de ampicilina) y la tanda es incubada durante 48 horas a 37°C. Para una inducción completa de la expresión del gen eno, se añaden 100 mg/l de isopropil β-D-thiogalactopiranósido (IPTG) en tandas paralelas. La formación de L-treonina por la cepa de partida MG442 es investigada de la misma manera, pero no tiene lugar ninguna adición de ampicilina al medio. Después de la incubación, la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo es determinada con un fotómetro LP2W del Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) con una longitud de onda de medición de 660 nm.

20 25 La concentración de L-treonina formada es luego determinada en el material sobrenadante de cultivo filtrado en condiciones estériles, con un analizador de aminoácidos procedente de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) mediante una cromatografía por intercambio de iones y una reacción posterior a la columna con detección por ninhidrina.

El resultado del experimento se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Cepa	Aditivos	DO (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	-	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	-	3,8	1,3
MG442/pTrc99Aeno	-	2,6	1,7
MG442/pTrc99Aeno	IPTG	5,1	2,6

30 Breve Descripción de la Figura:

Figura 1: Mapa del plásmido pTrc99Aeno que contiene el gen eno.

Los datos de longitud han de entenderse como datos aproximados. Las abreviaturas y designaciones usadas tienen los siguientes significados:

- 35 • Amp: gen de resistencia a ampicilina
• lacI: gen para la proteína represora del promotor trc
• P_{trc}: región del promotor trc, inducible por IPTG
• eno: región codificadora del gen eno
• 5S: región 5S de ARNr
• rrnBT: región del terminador de ARNr

40 45 Las abreviaturas para las enzimas de restricción tienen los siguientes significados
• HindIII: endonucleasa de restricción procedente de Haemophilus influenzae R_C
• Pvul: endonucleasa de restricción procedente de Proteus vulgaris
• XbaI: endonucleasa de restricción procedente de Xanthomonas campestris.

LISTAS DE LAS SECUENCIAS

<110> Degussa AG

5 <120> Procedimiento para la preparación de L-treonina o L-lisina, que usa cepas de la familia de las Enterobacteriáceas

<130> 020479 BT

10 <160> 8

10 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 31

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> Cebador

20 <222> (1) .. (31)

<223> eno1

<400> 1

25 gtttgtctag agtttcagtt taactagtga c 31

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<221> Cebador

<222> (1) .. (25)

<223> eno2

35 <400> 2

25 ccggaggctg gcaagcttaa atcag 25

<210> 3

40 <211> 1381

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

45 <221> Producto de PCR

<222> (1) .. (1381)

<220>

<221> CDS

50 <222> (46) .. (1344)

<223> gen eno

ES 2 385 651 T3

<400> 3

gttggcttag agtttcagtt taactagtga cttgaggaaa accta atg tcc aaa atc Val Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg Gly Asn Pro Thr	5	10	15	20	57
105					
gta aaa atc atc ggt cgt gaa atc atc gac tcc cgt ggt aac ccg act Val Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg Gly Asn Pro Thr	5	10	15	20	
153					
gtt gaa gcc gaa gta cat ctg gag ggt ggt ttc gtc ggt atg gca gct Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Phe Val Gly Met Ala Ala	25	30	35		
201					
gct ccg tca ggt gct tct act ggt tcc cgt gaa gct ctg gaa ctg cgc Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala Leu Glu Leu Arg	40	45	50		
249					
gat ggc gac aaa tcc cgt ttc ctg ggt aaa ggc gta acc aaa gct gtt Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val Thr Lys Ala Val	55	60	65		
297					
gct gcg gta aac ggc ccg atc gct cag gcg ctg att ggc aaa gat gct Ala Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Leu Ile Gly Lys Asp Ala	70	75	80		
345					
aaa gat cag gct ggc att gac aag atc atg atc gac ctg gac ggc acc Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp Leu Asp Gly Thr	85	90	95	100	
393					
gaa aac aaa tcc aaa ttc ggc gcg aac gca atc ctg gct gta tct ctg Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu Ala Val Ser Leu	105	110	115		
441					
gct aac gcc aaa gct gct gca gct gct aaa ggt atg ccg ctg tac gag Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Gly Met Pro Leu Tyr Glu	120	125	130		
489					
cac atc gct gaa ctg aac ggt act ccg ggc aaa tac tct atg ccg gtt His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Tyr Ser Met Pro Val	135	140	145		
537					
ccg atg atg aac atc atc aac ggt ggt gag cac gct gac aac aac gtt Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Glu His Ala Asp Asn Asn Val	150	155	160		
585					
gat atc cag gaa ttc atg att cag ccg gtt ggc gcg aaa act gtg aaa Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala Lys Thr Val Lys	165	170	175	180	
633					
gaa gcc atc cgc atg ggt tct gaa gtt ttc cat cac ctg gca aaa gtt Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His Leu Ala Lys Val	185	190	195		
681					
ctg aaa gcg aaa ggc atg aac act gct gtt ggt gac gaa ggt ggc tat Leu Lys Ala Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp Glu Gly Gly Tyr	200	205	210		
729					
gct ccg aac ctg ggt tcc aac gct gaa gct ctg gct gtt atc gct gaa Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala Val Ile Ala Glu	215	220	225		
777					
gct gtt aaa gct gct ggt tat gaa ctg ggc aaa gac atc act ttg gcg Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp Ile Thr Leu Ala	230	235	240		
825					
atg gac tgc gca gct tct gaa ttc tac aaa gat ggt aaa tac gtt ctg Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly Lys Tyr Val Leu	245	250	255	260	

ES 2 385 651 T3

gct ggc gaa ggc aac aaa gcg ttc acc tct gaa gaa ttc act cac ttc Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu Phe Thr His Phe 265 270 275	873
ctg gaa gaa ctg acc aaa cag tac ccg atc gtt tct atc gaa gac ggt Leu Glu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser Ile Glu Asp Gly 280 285 290	921
ctg gac gaa tct gac tgg gac ggt ttc gca tac cag acc aaa gtt ctg Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln Thr Lys Val Leu 295 300 305	969
ggc gac aaa atc cag ctg gtt ggt gac gac ctg ttc gta acc aac acc Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe Val Thr Asn Thr 310 315 320	1017
aag atc ctg aaa gaa ggt atc gaa aaa ggt atc gct aac tcc atc ctg Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala Asn Ser Ile Leu 325 330 335 340	1065
atc aaa ttc aac cag atc ggt tct ctg acc gaa act ctg gct gca atc Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr Leu Ala Ala Ile 345 350 355	1113
aag atg gcg aaa gat gct ggc tac act gca gtt atc tct cac cgt tct Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile Ser His Arg Ser 360 365 370	1161
ggc gaa act gaa gac gct acc atc gct gac ctg gct gtt ggt act gct Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala Val Gly Thr Ala 375 380 385	1209
gca ggc cag atc aaa act ggt tct atg agc cgt tct gac cgt gtt gct Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser Asp Arg Val Ala 390 395 400	1257
aaa tac aac cag ctg att cgt atc gaa gaa gct ctg ggc gaa aaa gca Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Ala Leu Gly Glu Lys Ala 405 410 415 420	1305
ccg tac aac ggt cgt aaa gag atc aaa ggc cag gca taa gactgacttt Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala 425 430	1354
atctgattta agcttgccag cctccgg	1381

<210> 4

<211> 432

5 <212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Lys Ile Val Lys Ile Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg 1 5 10 15
Gly Asn Pro Thr Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Gly Phe Val 20 25 30
Gly Met Ala Ala Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala 35 40 45
Leu Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val 50 55 60

ES 2 385 651 T3

Thr Lys Ala Val Ala Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Leu Ile
 65 70 75 80
 Gly Lys Asp Ala Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp
 85 90 95
 Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Lys Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu
 100 105 110
 Ala Val Ser Leu Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Gly Met
 115 120 125
 Pro Leu Tyr Glu His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Lys Tyr
 130 135 140
 Ser Met Pro Val Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Glu His Ala
 145 150 155 160
 Asp Asn Asn Val Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala
 165 170 175
 Lys Thr Val Lys Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His
 180 185 190
 Leu Ala Lys Val Leu Lys Ala Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp
 195 200 205
 Glu Gly Gly Tyr Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala
 210 215 220
 Val Ile Ala Glu Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp
 225 230 235 240
 Ile Thr Leu Ala Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly
 245 250 255
 Lys Tyr Val Leu Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu
 260 265 270
 Phe Thr His Phe Leu Glu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser
 275 280 285
 Ile Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln
 290 295 300
 Thr Lys Val Leu Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe
 305 310 315 320
 Val Thr Asn Thr Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala
 325 330 335
 Asn Ser Ile Leu Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr
 340 345 350
 Leu Ala Ala Ile Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile
 355 360 365
 Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala
 370 375 380
 Val Gly Thr Ala Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser
 385 390 395 400
 Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu
 405 410 415
 Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala
 420 425 430

ES 2 385 651 T3

<210> 5
<211> 1299
<212> ADN
<213> Shigella flexneri

5

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1299)
<223> Región de codificación de eno

10

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

ES 2 385 651 T3

Leu Ala Lys Val Leu Lys Ala Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp			
195	200	205	
gaa ggt ggc tat gcg ccg aac ctg ggt tcc aac gct gaa gct ctg gct			672
Glu Gly Gly Tyr Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala			
210	215	220	
gtt atc gct gaa gct gtt aaa gct gct ggt tat gaa ctg ggc aaa gac			720
Val Ile Ala Glu Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp			
225	230	235	240
atc act ctg gcg atg gac tgc gca gct tct gaa ttc tac aaa gat ggt			768
Ile Thr Leu Ala Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly			
245	250	255	
aaa tac gtt ctg gct ggc gaa ggc aac aaa gcg ttc acc tct gaa gaa			816
Lys Tyr Val Leu Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu			
260	265	270	
ttc act cac ttc ctg gaa gaa ctg acc aaa cag tac ccg atc gtt tct			864
Phe Thr His Phe Leu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser			
275	280	285	
atc gaa gac ggt ctg gac gaa tct gac tgg gac ggt ttc gca tac cag			912
Ile Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln			
290	295	300	
acc aaa gtt ctg ggc gac aaa atc cag ctg gtt ggt gac gac ctg ttc			960
Thr Lys Val Leu Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe			
305	310	315	320
gta acc aac acc aag atc ctg aaa gaa ggt atc gaa aaa ggt atc gct			1008
Val Thr Asn Thr Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala			
325	330	335	
aac tcc atc ctg atc aaa ttc aac cag atc ggt tct ctg acc gaa act			1056
Asn Ser Ile Leu Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr			
340	345	350	
ctg gct gca atc aag atg gcg aaa gat gct ggc tac act gca gtt atc			1104
Leu Ala Ala Ile Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile			
355	360	365	
tct cac cgt tct ggt gaa act gaa gat gct acc atc gct gat ctg gct			1152
Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala			
370	375	380	
gtt ggt act gct gca ggc cag atc aaa act ggt tct atg agc cgt tct			1200
Val Gly Thr Ala Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser			
385	390	395	400
gac cgt gtt gct aaa tac aac cag ctg att cgt atc gaa gaa gct ctg			1248
Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu			
405	410	415	
ggc gaa aaa gca ccg tac aac ggt cgt aaa gag atc aaa ggc cag gca			1296
Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala			
420	425	430	
taa			1299

<210> 6

<211> 432

5 <212> PRT

<213> Shigella flexneri

ES 2 385 651 T3

<400> 6

Met	Ser	Lys	Ile	Val	Lys	Ile	Ile	Gly	Arg	Glu	Ile	Ile	Asp	Ser	Arg
1					5				10					15	
Gly	Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Ala	Glu	Val	His	Leu	Glu	Gly	Gly	Phe	Val
				20				25					30		
Gly	Met	Ala	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala
	35					40						45			
Leu	Glu	Leu	Arg	Asp	Gly	Asp	Lys	Ser	Arg	Phe	Leu	Gly	Lys	Gly	Val
	50				55					60					
Thr	Lys	Ala	Val	Ala	Ala	Val	Asn	Gly	Pro	Ile	Ala	Gln	Ala	Leu	Ile
	65					70				75				80	
Gly	Lys	Asp	Ala	Lys	Asp	Gln	Ala	Gly	Ile	Asp	Lys	Ile	Met	Ile	Asp
		85					90						95		
Leu	Asp	Gly	Thr	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Phe	Gly	Ala	Asn	Ala	Ile	Leu
		100					105						110		
Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Asn	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Lys	Gly	Met	
	115					120						125			
Pro	Leu	Tyr	Glu	His	Ile	Ala	Glu	Leu	Asn	Gly	Thr	Pro	Gly	Lys	Tyr
	130					135					140				
Ser	Met	Pro	Val	Pro	Met	Met	Asn	Ile	Ile	Asn	Gly	Gly	Glu	His	Ala
	145				150					155				160	
Asp	Asn	Asn	Val	Asp	Ile	Gln	Glu	Phe	Met	Ile	Gln	Pro	Val	Gly	Ala
		165					170						175		
Lys	Thr	Val	Lys	Glu	Ala	Ile	Arg	Met	Gly	Ser	Glu	Val	Phe	His	His
		180					185						190		
Leu	Ala	Lys	Val	Leu	Lys	Ala	Lys	Gly	Met	Asn	Thr	Ala	Val	Gly	Asp
		195				200						205			
Glu	Gly	Gly	Tyr	Ala	Pro	Asn	Leu	Gly	Ser	Asn	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala
	210					215					220				
Val	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Lys	Ala	Ala	Gly	Tyr	Glu	Leu	Gly	Lys	Asp
	225					230				235				240	
Ile	Thr	Leu	Ala	Met	Asp	Cys	Ala	Ala	Ser	Glu	Phe	Tyr	Lys	Asp	Gly
		245					250						255		
Lys	Tyr	Val	Leu	Ala	Gly	Glu	Gly	Asn	Lys	Ala	Phe	Thr	Ser	Glu	Glu
		260					265					270			
Phe	Thr	His	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Gln	Tyr	Pro	Ile	Val	Ser
	275				280						285				
Ile	Glu	Asp	Gly	Leu	Asp	Glu	Ser	Asp	Trp	Asp	Gly	Phe	Ala	Tyr	Gln
	290					295					300				
Thr	Lys	Val	Leu	Gly	Asp	Lys	Ile	Gln	Leu	Val	Gly	Asp	Asp	Leu	Phe
	305					310					315				320
Val	Thr	Asn	Thr	Lys	Ile	Leu	Lys	Glu	Gly	Ile	Glu	Lys	Gly	Ile	Ala

ES 2 385 651 T3

325	330	335	
Asn Ser Ile Leu Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr			
340	345	350	
Leu Ala Ala Ile Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile			
355	360	365	
Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala			
370	375	380	
Val Gly Thr Ala Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser			
385	390	395	400
Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu			
405	410	415	
Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala			
420	425	430	

<210> 7

<211> 1299

<212> ADN

5 <213> Salmonella typhimurium

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1299)

10 <223> región codificadora de eno

<400> 7

atg tcc aaa atc gtt aaa gtc atc ggt cgt gaa atc atc gac tcc cgt Met Ser Lys Ile Val Lys Val Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg	48
1 5 10 15	
ggt aac ccg act gtt gaa gct gaa gta cac ctg gaa ggt ggt ttc gta Gly Asn Pro Thr Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Gly Phe Val	96
20 25 30	
ggt atg gcg gcg gct ccg tca ggt gct tct act ggt tcc cgc gaa gcg Gly Met Ala Ala Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala	144
35 40 45	
ctg gaa ctg cgc gat ggc gac aaa tcc cgt ttc ctg ggt aaa ggc gta Leu Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val	192
50 55 60	
acc aaa gct gtt ggc gcg gtt aac ggc ccg atc gct cag gct att ctt Thr Lys Ala Val Gly Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Ile Leu	240
65 70 75 80	
ggc aaa gac gct aaa gac cag gct ggc atc gac aaa atc atg atc gac Gly Lys Asp Ala Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp	288
85 90 95	
ctg gac ggt act gaa aac aaa tct aac ttc ggt gca aac gcc att ctg Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Asn Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu	336
100 105 110	
gct gtc tct ctg gct aac gcc aaa gct gct gct gcc gct aaa ggt atg Ala Val Ser Leu Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Gly Met	384
115 120 125	
ccg ctg tac gag cac att gct gaa ctg aat ggc acg ccg ggc aaa tac Pro Leu Tyr Glu His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Lys Tyr	432

ES 2 385 651 T3

130	135	140	
tcc atg ccg gtt ccg atg atg aac atc atc aac ggc ggc gag cac gct Ser Met Pro Val Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Glu His Ala	145	150	155
160			
gac aac aac gtc gac atc cag gaa ttc atg atc cag ccg gtt ggc gcg Asp Asn Asn Val Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala	165	170	175
528			
aaa acg gtt aaa gaa gcc atc cgt atg ggt tct gaa gtt ttc cat cac Lys Thr Val Lys Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His	180	185	190
576			
ctg gca aaa gtg ctg aaa ggc aaa ggc atg aac acc gct gtg ggt gac Leu Ala Lys Val Leu Lys Gly Lys Met Asn Thr Ala Val Gly Asp	195	200	205
624			
gaa ggc ggc tat gcg ccg aac ctg ggt tcc aac gct gaa ggc ctg gct Glu Gly Tyr Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala	210	215	220
672			
gtt atc gct gaa gcg gtt aaa gcg gct ggt tac gag ctg ggt aaa gac Val Ile Ala Glu Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp	225	230	235
720			
atc acc ctg gcg atg gac tgc gca gca tct gaa ttc tac aaa gac ggt Ile Thr Leu Ala Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly	245	250	255
768			
aaa tac gtt ctg gct ggc gaa ggc aac aaa gcg ttc acc tcc gaa gaa Lys Tyr Val Leu Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu	260	265	270
816			
ttc acc cac ttc ctg gaa gaa ctg acc aaa cag tac ccg atc gtt tcc Phe Thr His Phe Leu Glu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser	275	280	285
864			
atc gaa gat ggt ctg gac gag tct gac tgg gac ggt ttt gca tac cag Ile Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln	290	295	300
912			
acc aaa gta ctg ggc gac aaa atc cag ctg gtt ggt gac gac ctg ttc Thr Lys Val Leu Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe	305	310	315
960			
gta acc aac acc aaa atc ctg aaa gaa ggc atc gag aaa ggc atc gct Val Thr Asn Thr Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala	325	330	335
1008			
aac tcc atc ctg atc aaa ttc aac cag atc ggt tct ctg acc gaa act Asn Ser Ile Leu Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr	340	345	350
1056			
ctg gct gca atc aag atg gcg aaa gac gct ggc tat act gct gtc atc Leu Ala Ala Ile Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile	355	360	365
1104			
tct cac cgt tct ggc gaa act gaa gac gct acc atc gct gac ctg gct Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala	370	375	380
1152			
gtt ggt acc gct gca ggc cag atc aaa acc ggt tct atg agc cgt tct Val Gly Thr Ala Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser	385	390	395
1200			
400			

ES 2 385 651 T3

gac cgt gtt gct aaa tac aac cag ctg att cgt atc gaa gaa gct ctg Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu 405 410 415	1248
ggc gaa aaa gca ccg tat aac ggt cgt aaa gag atc aaa ggc cag gcg Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala 420 425 430	1296
taa	1299
<210> 8	
<211> 432	
<212> PRT	
5 <213> Salmonella typhimurium	
<400> 8	
Met Ser Lys Ile Val Lys Val Ile Gly Arg Glu Ile Ile Asp Ser Arg 1 5 10 15	
Gly Asn Pro Thr Val Glu Ala Glu Val His Leu Glu Gly Gly Phe Val 20 25 30	
Gly Met Ala Ala Ala Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Ser Arg Glu Ala 35 40 45	
Leu Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Arg Phe Leu Gly Lys Gly Val 50 55 60	
Thr Lys Ala Val Gly Ala Val Asn Gly Pro Ile Ala Gln Ala Ile Leu 65 70 75 80	
Gly Lys Asp Ala Lys Asp Gln Ala Gly Ile Asp Lys Ile Met Ile Asp 85 90 95	
Leu Asp Gly Thr Glu Asn Lys Ser Asn Phe Gly Ala Asn Ala Ile Leu 100 105 110	
Ala Val Ser Leu Ala Asn Ala Lys Ala Ala Ala Ala Lys Gly Met 115 120 125	
Pro Leu Tyr Glu His Ile Ala Glu Leu Asn Gly Thr Pro Gly Lys Tyr 130 135 140	
Ser Met Pro Val Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Glu His Ala 145 150 155 160	
Asp Asn Asn Val Asp Ile Gln Glu Phe Met Ile Gln Pro Val Gly Ala 165 170 175	
Lys Thr Val Lys Glu Ala Ile Arg Met Gly Ser Glu Val Phe His His 180 185 190	
Leu Ala Lys Val Leu Lys Gly Lys Gly Met Asn Thr Ala Val Gly Asp 195 200 205	
Glu Gly Gly Tyr Ala Pro Asn Leu Gly Ser Asn Ala Glu Ala Leu Ala 210 215 220	
Val Ile Ala Glu Ala Val Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Leu Gly Lys Asp 225 230 235 240	
Ile Thr Leu Ala Met Asp Cys Ala Ala Ser Glu Phe Tyr Lys Asp Gly 245 250 255	

ES 2 385 651 T3

Lys Tyr Val Leu Ala Gly Glu Gly Asn Lys Ala Phe Thr Ser Glu Glu
260 265 270

Phe Thr His Phe Leu Glu Glu Leu Thr Lys Gln Tyr Pro Ile Val Ser
275 280 285

Ile Glu Asp Gly Leu Asp Glu Ser Asp Trp Asp Gly Phe Ala Tyr Gln
290 295 300

Thr Lys Val Leu Gly Asp Lys Ile Gln Leu Val Gly Asp Asp Leu Phe
305 310 315 320

Val Thr Asn Thr Lys Ile Leu Lys Glu Gly Ile Glu Lys Gly Ile Ala
325 330 335

Asn Ser Ile Leu Ile Lys Phe Asn Gln Ile Gly Ser Leu Thr Glu Thr
340 345 350

Leu Ala Ala Ile Lys Met Ala Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Ala Val Ile
355 360 365

Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ala Thr Ile Ala Asp Leu Ala
370 375 380

Val Gly Thr Ala Ala Gly Gln Ile Lys Thr Gly Ser Met Ser Arg Ser
385 390 395 400

Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Ile Arg Ile Glu Glu Ala Leu
405 410 415

Gly Glu Lys Ala Pro Tyr Asn Gly Arg Lys Glu Ile Lys Gly Gln Ala
420 425 430

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de L-treonina o L-lisina por fermentación de microorganismos recombinantes de la familia de las Enterobacteriáceas, en el que

- 5 a) los microorganismos, que producen el deseado L-aminoácido y en los que el gen eno o las secuencias de nucleótidos o los alelos que codifican una proteína con la actividad de una enolasa, se intensifican, y se cultivan en un medio en unas condiciones en las que el deseado L-aminoácido es concentrado en el medio o en las células, y
- 10 b) el deseado L-aminoácido es aislado, quedando en el producto que ha sido aislado o siendo eliminados completamente los constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o en porciones (≥ 0 a 100 %) del mismo,

en el que una intensificación describe la actividad o concentración intracelular aumentada de dicha proteína por al menos un 10 % basada en la de la proteína de tipo silvestre o en la de la cepa parental.

15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se intensifica un polinucleótido que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en un grado de por lo menos 90 % a una secuencia de aminoácidos escogida entre el conjunto que consiste en SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, y SEQ ID No. 8.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los microorganismos contienen un polinucleótido sobreexpresado o intensificado, que corresponde al gen eno, escogido entre el conjunto que consiste en:

- 20 a) un polinucleótido con la secuencia 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 la SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7; dentro del contexto de la degeneración del código genético;
- c) una secuencia de polinucleótidos con una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia complementaria con respecto a la SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7;
- 25 d) un polinucleótido con una secuencia SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7 que contiene mutantes con sentido de función neutra.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en el grado de por lo menos 95 % a una de las secuencias escogidas entre el conjunto que consiste en SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, y SEQ ID No. 8.

30 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 100 % a la de SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 o SEQ ID No. 8.

6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 5, en el que los microorganismos se producen por transformación, transducción o conjugación, o por una combinación de estos métodos, con un vector que contiene el gen eno, un alelo de este gen o partes del mismo y/o un promotor.

35 7. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 6, en el que el número de copias del gen eno o de los alelos es aumentado por al menos 1.

8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el aumento en el número de copias del gen eno por al menos 1 es efectuado por integración del cuadro de lectura abierto (ORF) o de los alelos dentro del cromosoma de los microorganismos.

40 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el aumento en el número de copias del gen eno por al menos 1 se consigue por medio de un vector que se replica extracromosomalmente.

10. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que, para conseguir la intensificación,

- a) la región de promotor y de regulación o el sitio de fijación de ribosomas situado corriente arriba del gen eno es mutada/o
- b) unos casetes de expresión o promotores son incorporados corriente arriba del gen eno.

11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el gen eno está puesto bajo el control de un promotor que intensifica la expresión del gen.
- 5 12. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 11, en el que la concentración o actividad del producto del gen eno es aumentada por sobreexpresión del gen eno o de las secuencias de nucleótidos o los alelos que codifican el producto génico del mismo.
13. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 12, en el que los microorganismos se escogen a partir del género Escherichia.
14. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 13, en el que los microorganismos se escogen a partir de la especie Escherichia coli.
- 10 15. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 14, en el que, para la preparación de L-treonina, unos microorganismos de la familia de la Enterobacteriáceas son fermentados y en el que adicionalmente, al mismo tiempo, uno o más de los genes escogidos entre el conjunto que consiste en:
- 15.1 por lo menos un gen del operón thrABC que codifica la aspartato cinasa, la homoserina deshidrogenasa, la homoserina cinasa y la treonina sintasa,
- 15 15.2 el gen pyc de Corynebacterium glutamicum que codifica la piruvato carboxilasa,
- 15.3 el gen pps que codifica la fosfoenol piruvato sintasa,
- 15.4 el gen ppc que codifica la fosfoenol piruvato carboxilasa,
- 15.5 los genes pntA y pntB, que codifican subunidades de la piridina transhidrogenasa,
- 15.6 el gen rhtB que codifica la proteína que confiere resistencia a homoserina,
- 20 15.7 el gen rhtC que codifica la proteína que confiere resistencia a treonina,
- 15.8 el gen thrE de Corynebacterium que codifica la proteína portadora de exportación de treonina,
- 15.9 el gen gdhA que codifica la glutamato deshidrogenasa,
- 15.10 el gen pgm que codifica la fosfoglucomutasa,
- 15.11 el gen fba que codifica la fructosa bifosfato aldolasa,
- 25 15.12 el gen ptsH que codifica la fosfohistidina proteína hexosa fosfotransferasa,
- 15.13 el gen ptsI que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa,
- 15.14 el gen crr que codifica el componente IIA específico para glucosa,
- 15.15 el gen ptsG que codifica el componente IIBC específico para glucosa,
- 15.16 el gen lrp que codifica el regulador del regulón de leucina,
- 30 15.17 el gen fadR que codifica el regulador del regulón fad,
- 15.18 el gen iclR que codifica el regulador del metabolismo intermedio central,
- 15.19 el gen ahpC que codifica la subunidad pequeña de una alquil hidroperóxido reductasa,
- 15.20 el gen ahpF que codifica la subunidad grande de una alquil hidroperóxido reductasa,
- 15.21 el gen cysK que codifica la cisteína sintasa A,
- 35 15.22 el gen cysB que codifica el regulador del regulón cys,

- 15.23 el gen *cysJ* que codifica la flavoproteína de NADPH sulfito reductasa,
- 15.24 el gen *cysI* que codifica la hemoproteína de NADPH sulfito reductasa,
- 15.25 el gen *cysH* que codifica la adenilil sulfato reductasa,
- 15.26 el gen *rseA* que codifica una proteína de membrana con actividad anti-sigmaE,
- 5 15.27 el gen *rseC* que codifica un regulador global del factor sigmaE,
- 15.28 el gen *sucA* que codifica la sub-unidad de descarboxilasa de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 15.29 el gen *sucB* que codifica la subunidad E2 de dihidrolipoiltranssuccinasa de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 15.30 el gen *sucC* que codifica la sub-unidad β de la succinil-CoA sintetasa,
- 10 15.31 el gen *sucD* que codifica la sub-unidad α de la succinil-CoA sintetasa,
- 15.32 el gen *aceE* que codifica el componente E1 del complejo de la piruvato deshidrogenasa,
- 15.33 el gen *aceF* que codifica el componente E2 del complejo de la piruvato deshidrogenasa,
- 15.34 el gen *rseB* que codifica el regulador de la actividad del factor sigmaE,
- 15.35 el producto génico del cuadro de lectura abierto (ORF) *yodA* de *Escherichia coli*, y
- 15 15.36 el producto génico del cuadro de lectura abierto (ORF) *yaaU* de *Escherichia coli*
es o son intensificados, en particular sobreexpresados.
16. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 15, en el que, para la preparación de L-treonina, se fermentan unos microorganismos de la familia de las Enterobacteriáceas, en que adicionalmente, al mismo tiempo, uno o más de los genes escogidos entre el conjunto que consiste en:
- 20 16.1 el gen *tdh* que codifica la treonina deshidrogenasa,
- 16.2 el gen *mdh* que codifica la malato deshidrogenasa,
- 16.3 el producto génico del cuadro de lectura abierto (ORF) *yjfA* de *Escherichia coli*,
- 16.4 el producto génico del cuadro de lectura abierto (ORF) *ytfP* de *Escherichia coli*,
- 16.5 el gen *pckA* que codifica la fosfoenol piruvato carboxicinasa,
- 25 16.6 el gen *poxB* que codifica la piruvato oxidasa,
- 16.7 el gen *dgsA* que codifica el regulador *DgsA* del sistema de la fosfotransferasa,
- 16.8 el gen *fruR* que codifica el represor de fructosa,
- 16.9 el gen *rpoS* que codifica el factor sigma³⁸,
y
- 30 16.10 el gen *aspA* que codifica la aspartato amonio liasa
es o son atenuados, en particular eliminados o reducidos en su expresión.

ES 2 385 651 T3

Figura 1: Mapa del plásmido pTrc99Aeno.

