

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 389 276**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **08163518 .7**

(96) Fecha de presentación: **27.02.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2006386**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

(54) Título: **Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos usando cepas de la familia de enterobacteriáceas**

(30) Prioridad:

13.03.2002 DE 10210960

(73) Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
RELLINGHAUSER STRASSE 1-11
45128 ESSEN, DE**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2012

(72) Inventor/es:

**FARWICK, MIKE;
HERMANN, THOMAS y
RIEPING, MECHTHILD**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2012

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, Isabel

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).

ES 2 389 276 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos usando cepas de la familia de enterobacteriáceas

Campo de la Invención

Esta invención se refiere a un procedimiento para la preparación de L-treonina usando cepas de la familia de enterobacteriáceas en las que el gen bet B y opcionalmente uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en aldB y aldH está/están sobreexpresados.

Técnica anterior

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

Se sabe que los L-aminoácidos se preparan mediante fermentación de cepas de enterobacteriáceas, en particular *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*. Debido a su gran importancia, están realizándose constantemente trabajos para mejorar los procedimientos de preparación. Las mejoras en los procedimientos pueden referirse a medidas de fermentación técnicas, tales como, por ejemplo, agitación y suministro de oxígeno, o a la composición de los medios nutrientes, tales como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación, o a la elaboración en la forma del producto, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio iónico, o a las propiedades intrínsecas de productividad del microorganismo propiamente dicho.

Para mejorar las propiedades de productividad de estos microorganismos se usan métodos de mutagénesis, selección y selección de mutantes. De esta manera se obtienen cepas que son resistentes a antimetabolitos, tales como, por ejemplo, el análogo de treonina ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV), o que son auxótrofas con respecto a metabolitos de importancia reguladora y producen L-aminoácido, tal como, por ejemplo, L-treonina.

También se han utilizado desde hace algunos años métodos de tecnología de ADN recombinante para mejorar el linaje de cepas de la familia de enterobacteriáceas que producen L-aminoácidos, amplificando genes individuales de la biosíntesis de aminoácidos e investigando el efecto sobre la producción.

Objeto de la invención

El objetivo de los inventores fue proporcionar nuevas medidas para la preparación mejorada de L-treonina.

Sumario de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la preparación de L-treonina, usando microorganismos de la familia de enterobacteriáceas que, en particular, ya producen L-aminoácidos, y en los que el gen bet B y opcionalmente una o más de las secuencias nucleotídicas que codifican los productos génicos de aldB y aldH están sobreexpresadas.

Descripción detallada de la invención

El término "intensificación" describe en este contexto el incremento de la actividad intracelular de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo que están codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo incrementando el número de copias del gen o genes, usando un promotor fuerte o un gen o alelo que codifica una enzima o proteína correspondiente que tiene una actividad elevada, y opcionalmente combinando estas medidas.

Mediante las medidas de intensificación, en particular sobreexpresión, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se incrementa generalmente en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, y como máximo hasta 1000% o 2000%, con respecto a la proteína de tipo salvaje o la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo inicial.

El procedimiento se caracteriza porque se llevan a cabo las siguientes etapas:

a) fermentación de los microorganismos de la familia de enterobacteriáceas que producen L-treonina, y en los que el gen betB y opcionalmente uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en aldB y aldH está/están sobreexpresados,

b) concentración de la L-treonina deseada en el medio o en las células de los microorganismos, y

c) aislamiento del L-aminoácido deseado, con lo que los constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o en porciones (≥ 0 a 100%) de la misma permanecen en el producto.

Los microorganismos proporcionados 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. Dichos microorganismos son representativos de la familia de enterobacteriáceas seleccionados de los géneros *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*. Se prefieren los géneros *Escherichia* y *Serratia*. Del género

Escherichia puede mencionarse en particular la especie *Escherichia coli*, y del género *Serratia* la especie *Serratia marcescens*.

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

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

15 Las cepas adecuadas del género *Serratia* productoras de L-treonina, en particular de la especie *Serratia marcescens*, son, por ejemplo:

Serratia marcescens HNr21
Serratia marcescens TLr156
Serratia marcescens T2000.

20 Las cepas de la familia de enterobacteriáceas que producen L-treonina tienen preferiblemente, entre otras, una o más características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo que comprende: 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 borreliolina, 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, necesidad de L-metionina, opcionalmente una necesidad parcial y compensable de L-isoleucina, necesidad de ácido meso-diaminopimélico, auxotrofia con respecto a dipéptidos que contienen treonina, resistencia a L-treonina, resistencia a L-homoserina, resistencia a L-lisina, resistencia a L-metionina, resistencia a ácido L-glutámico, resistencia a L-aspartato, resistencia a L-leucina, resistencia a L-fenilalanina, resistencia a L-serina, resistencia a L-cisteína, resistencia a L-valina, sensibilidad a fluoropiruvato, deficiencia en treonina deshidrogenasa, opcionalmente una capacidad para utilización de sacarosa, intensificación del operón de treonina, intensificación de homoserina deshidrogenasa I-aspartato cinasa I, preferiblemente de la forma resistente a la realimentación, intensificación de homoserina cinasa, intensificación de treonina sintasa, intensificación de aspartato cinasa, opcionalmente de la forma resistente a la realimentación, intensificación de aspartato semialdehído deshidrogenasa, intensificación de fosfoenol piruvato carboxilasa, opcionalmente de la forma resistente a la realimentación, intensificación de fosfoenol piruvato sintasa, intensificación de transhidrogenasa, intensificación del producto del gen RhtB, intensificación del producto del gen RhtC, intensificación del producto del gen YfiK, intensificación de una piruvato carboxilasa, y atenuación de la formación de ácido acético.

30 Se ha encontrado que microorganismos de la familia de enterobacteriáceas producen L-treonina, de manera mejorada después de sobreexpresión, del gen betB y opcionalmente uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en aldB y aldH.

35 Las secuencias nucleotídicas de los genes de *Escherichia coli* pertenecen a la técnica anterior (véanse las referencias de texto siguientes), y también pueden encontrarse en la secuencia genómica de *Escherichia coli* publicada por Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)).

40 Los genes aldA, aldB, aldH y betB se describen, entre otros, mediante los siguientes datos:

Gen aldA:

Descripción

EC No.: 1.2.1.22

Fridange et al.; Journal of Bacteriology 175 (1993): 31-35; Limon et al.; International Microbiology 2 (1): 33-38 (1999)

No. de Acceso: AE000239

Nombre alternativo del gen: Alu

Gen aldB:

Descripción:	Aldehído deshidrogenasa B, lactaldehído deshidrogenasa, ruptura de pequeñas moléculas (compuestos de carbono)
EC No.:	1.2.1.22
Referencia:	Xu y Johnson; Journal of Bacteriology 177(11): 3166-3175 (1995)
No. de Acceso:	AE000436
Gen aldH:	
Descripción:	Aldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD
EC No.:	1.2.1.3
Referencia:	Heim y Strehler; Gene 99(1): 15-23 (1991)
No. de Acceso:	AE000228
Gen betB:	
Descripción:	Betaína aldehído deshidrogenasa, dependiente de NAD
EC No.:	1.2.1.8
Referencia:	Lamark et al.; Molecular Microbiology 5(5): 1049-1064 (1991) Falkenberg y Strom; Biochimica et Biophysica Acta 1034(3): 253-259 (1990)
No. de Acceso:	AE000138

Las secuencias de ácido nucleico pueden encontrarse en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, EE.UU.), la base de datos de secuencias nucleotídicas de European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania o Cambridge, Reino Unido) o la base de datos de DNA de Japón (DDBJ, Mishima, Japón).

5 Los genes descritos en las referencias de texto mencionadas pueden usarse de acuerdo con la invención. Adicionalmente, pueden usarse alelos de los genes que son resultado de la degeneración del código genético o como un resultado de mutaciones de sentido funcionalmente neutras. Se prefiere el uso de genes endógenos.

"Genes endógenos" o "secuencias nucleotídicas endógenas" debe entenderse que significa los genes o alelos o secuencias nucleotídicas que están presentes en la población de una especie.

10 Para lograr una intensificación, la expresión de los genes o las propiedades catalíticas de las proteínas, por ejemplo, se pueden incrementar. Las dos medidas se pueden combinar opcionalmente.

Para lograr una sobreexpresión, puede incrementarse el número de copias de los genes correspondientes, o pueden mutarse el promotor y la región reguladora o el sitio de unión de ribosoma en dirección del gen estructural. Los cassetes de expresión que se incorporan en dirección del gen estructural actúan del mismo modo. Por medio de promotores inducibles es posible adicionalmente aumentar la expresión en el curso de la producción de L-treonina por fermentación. La expresión se mejora análogamente a través de medidas para prolongar la vida del ARNm. Adicionalmente, la actividad enzimática también se incrementa previniendo la degradación de la proteína enzimática. Los genes o constructos génicos pueden estar presentes en plásmidos con un número variable de copias, o pueden integrarse y amplificarse en el cromosoma. Alternativamente, una sobreexpresión de los genes en cuestión puede lograrse también cambiando la composición de los medios y el procedimiento de cultivo.

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

30 Pueden usarse vectores plasmídicos que son capaces de replicarse en enterobacteriáceas, tales como, por ejemplo, vectores de clonación derivados de pACYC184 (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) o derivados de pSC101 (Vocke y Bastia, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21): 6557-6561 (1983)). En un procedimiento según la invención, se puede emplear una cepa transformada con un vector plasmídico, en el que el vector plasmídico tiene al menos uno o más genes seleccionados del grupo que comprende aldA, aldB, aldH y betB, o secuencias nucleotídicas que los codifican.

También es posible transferir mutaciones que afectan a la expresión de los genes particulares a diversas cepas mediante intercambio de secuencias (Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989))), conjugación o transducción.

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de L-treonina, con cepas de la familia de enterobacteriáceas, intensificar una o más enzimas de la ruta conocida de la biosíntesis de treonina, o enzimas del metabolismo anaplerótico, o enzimas para la producción de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido, o enzimas de la glucólisis, o enzimas PTS, o enzimas del metabolismo del azufre, además de la sobreexpresión del gen betB y opcionalmente uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende aldB y aldH. Se prefiere generalmente el uso de genes endógenos.

Así, por ejemplo, se puede intensificar, en particular sobreexpresar, al mismo tiempo uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende

- el operón thrABC que codifica aspartato cinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina cinasa 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 fosfoenol piruvato sintasa (Molecular and General Genetics 231: (2)332-336 (1992)),
- el gen ppc que codifica fosfoenol piruvato 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 proporciona resistencia a homoserina (documento EP-A-0 994 190),
- el gen mqo que codifica malato:quinona oxidoreductasa (documento DE 100 348 33.5),
- el gen rhtC que proporciona resistencia a treonina (documento EP-A-1 013 765),
- el gen thrE de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la proteína exportadora 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 de unión a ADN HLP-II (Molecular and General Genetics 212: 199-202 (1988)),
- el gen pgm que codifica fosfoglucomutasa (Journal of Bacteriology 176: 5847-5851 (1994)),
- el gen fba que codifica fructosa bifosfato aldolasa (Biochemical Journal 257: 529-534 (1989)),
- el gen ptsH del operón ptsHlcrr que codifica la fosfohistidina proteína hexosa fosfotransferasa del sistema de fosfotransferasa PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen ptsI del operón ptsHlcrr que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen crr del operón ptsHlcrr que codifica el componente IIa específico de glucosa del sistema de fosfotransferasa PTS (Journal of Biological Chemistry 262: 16241-16253 (1987)),
- el gen ptsG que codifica el componente IIIC específico de glucosa (Journal of Biological Chemistry 261: 16398-16403 (1986)),
- el gen lrp que codifica el regulador del regulón leucina (Journal of Biological Chemistry 266: 10768-10774 (1991)),
- el gen csrA que codifica el regulador global Csr (Journal of Bacteriology 175: 4744-4755 (1993)),
- el gen fadR que codifica el regulador del regulón fad (Nucleic Acids Research 16: 7995-8009 (1988)),
- el gen iclR que codifica el regulador del metabolismo central intermedio (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)) y es conocido también por el nombre "groES",

- el gen ahpC del operón ahpCF que codifica la subunidad pequeña de la alquil hidroperóxido reductasa (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 7617-7621 (1995)),
- el gen ahpF del operón ahpCF que codifica la subunidad grande de la alquil hidroperóxido reductasa (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 7617-7621 (1995)),
- 5 • el gen cysK que codifica cisteína sintasa A (*Journal of Bacteriology* 170: 3150-3157 (1988)),
- el gen cysB que codifica el regulador del regulón cys (*Journal of Biological Chemistry* 262: 5999-6005 (1987)),
- el gen cysJ del operón cysJIH que codifica la flavoproteína de la NADPH sulfito reductasa (*Journal of Biological Chemistry* 264: 15796-15808 (1989), *Journal of Biological Chemistry* 264: 15726-15737 (1989)),
- 10 • el gen cysI del operón cysJIH que codifica la hemoproteína de NADPH sulfito reductasa (*Journal of Biological Chemistry* 264: 15796-15808 (1989), *Journal of Biological Chemistry* 264: 15726-15737 (1989)),
- el gen cysH del operón cysJIH que codifica adenilil sulfato reductasa (*Journal of Biological Chemistry* 264: 15796-15808 (1989), *Journal of Biological Chemistry* 264: 15726-15737 (1989)),
- 15 • el gen phoB del operón phoBR que codifica el regulador positivo PhoB del regulón pho (*Journal of Molecular Chemistry* 190 (1): 37-44 (1986)),
- el gen phoR del operón phoBR que codifica la proteína sensora del regulón pho (*Journal of Molecular Biology* 192 (3): 549-556 (1986)),
- el gen phoE que codifica la proteína E de la membrana celular externa (*Journal of Molecular Biology* 163 (4): 513-532 (1983)),
- 20 • el gen pykF que codifica piruvato cinasa I que es estimulada por fructosa (*Journal of Bacteriology* 177 (19): 5719-5722 (1995)),
- el gen pkfB que codifica 6-fosfofructocinasa II (*Gene* 28 (3): 337-342 (1984)),
- el gen malE que codifica la proteína de unión periplásmica del transporte de maltosa (*Journal of Biological Chemistry* 259 (16): 10606-10613 (1984)),
- 25 • el gen rseA del operón rseABC que codifica una proteína de membrana con actividad anti-sigmaE (*Molecular Microbiology* 24 (2): 355-371 (1997)),
- el gen rseC del operón rseABC que codifica un regulador global del factor sigmaE (*Molecular Microbiology* 24 (2): 355-371 (1997)),
- el gen sodA que codifica superóxido dismutasa (*Journal of Bacteriology* 155 (3): 1078-1087 (1983)),
- 30 • el gen sucA del operón sucABCD que codifica la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa (*European Journal of Biochemistry* 141 (2) : 351-359 (1984)),
- el gen sucB del operón sucABCD que codifica la subunidad dihidrolipoil transsuccinasa E2 de 2-cetoglutarato deshidrogenasa (*European Journal of Biochemistry* 141 (2): 361-374 (1984)),
- 35 • el gen sucC del operón sucABCD que codifica la subunidad β de succinil-CoA sintetasa (*Biochemistry* 24 (22) : 6245-6252 (1985)), y
- el gen sucD del operón sucACBD que codifica la subunidad α de succinil-CoA sintetasa (*Biochemistry* 24 (22): 6245-6252 (1985)).

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de L-treonina, además de la sobreexpresión del gen betB y opcionalmente uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en aldB y aldH, que se elimine uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende

- 40 • el gen tdh que codifica treonina deshidrogenasa (*Journal of Bacteriology* 169: 4716-4721 (1987)),
- el gen mdh que codifica malato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.37) (*Archives in Microbiology* 149: 36-42 (1987)),
- el producto génico del marco de lectura abierto (orf) yjfA (Número de Acceso AAC77180 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
- 45 • el producto génico del marco de lectura abierto (orf) ytfP (Número de Acceso AAC77179 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),

- el gen pckA que codifica la enzima fosfoenol piruvato carboxicinasa (Journal of Bacteriology 172: 7151-7156 (1990)),
- el gen poxB que codifica piruvato oxidasa (Nucleic Acids Research 14(13): 5449-5460 (1986)),
- el gen aceA que codifica la enzima isocitrato liasa (Journal of Bacteriology 170, 4528-4536 (1988)),
- 5 • el gen dgsA que codifica el regulador DgsA del sistema de fosfotransferasa (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 59: 256-251 (1995)), y es conocido también con el nombre "gen mlc",
- el gen fruR que codifica el represor de fructosa (Molecular and General Genetics 226: 332-336 (1991)) y es conocido también con el nombre "gen cra",
- 10 • el gen rpoS que codifica el factor sigma³⁸ (documento WO 01/05939) y es conocido también con el nombre "gen katF",
- el gen aspA que codifica aspartato amonio liasa (aspartasa) (Nucleic Acids Research 13(6): 2063-2074 (1985)), y
- el gen aceB que codifica malato sintasa A (Nucleic Acids Research 16(19): 9342 (1988)).

El término "atenuación", en este contexto, describe la reducción o eliminación de la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo que están codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo usando un promotor débil o un gen o alelo que codifica una enzima correspondiente con una actividad baja o desactiva la enzima o gen correspondiente, y combinando opcionalmente estas medidas.

Mediante las medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce en general hasta 0 a 75%, 0 a 50%, 0 a 25%, 0 a 10% o 0 a 5% de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

Adicionalmente puede ser ventajoso para la producción de L-treonina, además de la sobreexpresión del gen betB y opcionalmente de uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en aldB y aldH, eliminar reacciones secundarias indeseables (Nakayama: "Breeding of Amino-Acid Producing Microorganisms", en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

25 Los microorganismos producidos según la invención pueden cultivarse en el proceso por lotes (cultivo por lotes), el proceso por lotes alimentados o el proceso por lotes alimentados repetido. Un sumario de métodos de cultivo conocidos se describe 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 peripherie Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

30 El medio de cultivo a usar tiene que satisfacer los requisitos de las cepas particulares de una manera adecuada. Las descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

Como fuente de carbono se pueden usar azúcares y carbohidratos, tales como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidón y opcionalmente celulosa, aceites y grasas, tales como, por ejemplo, aceite de haba soja, aceite de girasol, aceite de cacahuate y aceite de coco, ácidos grasos, tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como, por ejemplo, glicerol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético. Estas sustancias se pueden usar individualmente o como una mezcla.

40 Como fuente de nitrógeno, se pueden usar compuestos nitrogenados orgánicos, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz, harina de haba 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 usar individualmente o como una mezcla.

Como fuente de fósforo, se pueden usar ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio. El medio de cultivo debe contener adicionalmente sales de metales, tales como, por ejemplo, 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 mencionadas anteriormente. Además, se pueden añadir al medio de cultivo precursores adecuados. Las sustancias de alimentación mencionadas se pueden añadir al cultivo en forma de una sola carga, o se pueden alimentar durante el cultivo de manera adecuada.

50 La fermentación se lleva a cabo generalmente a un pH de 5,5 a 9,0, especialmente de 6,0 a 8,0. Para controlar el pH del cultivo se pueden emplear de una manera adecuada compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o amoniaco acuoso, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para controlar el desarrollo de espuma se pueden emplear antiespumantes, tales como, por ejemplo,

ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Se pueden añadir al medio sustancias adecuadas que tienen una acción selectiva, por ejemplo, antibióticos, para mantener la estabilidad de los plásmidos. Para mantener condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como, por ejemplo, aire. La temperatura del cultivo es habitualmente 25°C a 45°C, y preferiblemente 30°C a 40°C. El cultivo se continua hasta que se ha formado un máximo de L-aminoácidos o L-treonina. Este objetivo se alcanza habitualmente en el transcurso de 10 horas a 160 horas.

El análisis de L-aminoácidos se puede llevar a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico con derivación subsiguiente de ninhidrina, como se ha descrito por Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)), o puede realizarse mediante HPLC en fase inversa, como se ha descrito por Limbroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

El procedimiento según la invención sirve para la preparación de L-treonina por fermentación.

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

Ejemplo 1

Preparación de L-treonina usando el gen aldA

1a) Construcción del plásmido de expresión pTrc99AaldA

El gen aldA procedente de *E. coli* K12 se amplificó aplicando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y también oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia nucleotídica del gen aldA en *E. coli* K12 MG1655 (Número de Acceso AE000239, Blattner et al. (Science 277 (5331): 1453-1474 (1997))), se sintetizaron cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Las secuencias de los cebadores se modificaron de tal modo que surgieron sitios de reconocimiento por enzimas de restricción. Para el cebador aldA1 se escogió la secuencia de reconocimiento para XbaI, y para el cebador aldA2 se escogió la secuencia de reconocimiento para HindIII, marcándose estas secuencias de reconocimiento mediante un subrayado en las secuencias nucleotídicas representadas a continuación:

aldA1: 5'- CCGAAAACAACATCTAGATCACAGGAG -3' (SEC ID No. 1)

aldA2: 5'- CCTCCGAAGCTTCACTCATTAAG -3' (SEC ID No. 2)

El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655 empleado para la PCR se aisló, según las instrucciones del fabricante, con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN de alrededor de 1490 pb de tamaño se puede amplificar con los cebadores específicos en condiciones estándar de PCR (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con Taq-ADN-polimerasa (QIAGEN, Hilden, Alemania). El producto de la PCR se ligó, según las instrucciones del fabricante, con el vector pCR®2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se transformó en la cepa TOP10F' de *E. coli*. La selección de las células que poseen el plásmido se llevó a cabo en agar LB, que se roció con 50 µg/ml de ampicilina. Despues de aislar el ADN plasmídico, el vector se escindió con las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y HindIII/XbaI, y, despues de comprobar mediante fraccionamiento en gel de agarosa al 0,8%, se denominó pCR2.1TOPOaldA.

Subsiguentemente, el vector pCR2.1TOPOaldA se restringió con las enzimas de restricción HindIII y XbaI, y el fragmento aldA se aisló tras fraccionar en el gel de agarosa al 0,8% con la ayuda del QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se escindió con las enzimas de restricción HindIII y XbaI, y se ligó con el fragmento aldA aislado. La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, USA) se transformó con la carga de ligación y se seleccionó, con respecto a células que poseen el plásmido, en agar LB, al que se añadieron 50 µg/ml de ampicilina. La clonación con éxito puede confirmarse tras aislar el ADN plasmídico mediante escisión de control con las enzimas HindIII/XbaI. El plásmido se denomina pTrc99AaldA (Figura 1).

1b) Preparación de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99AaldA

La cepa de *E. coli* MG442 productora de L-treonina se describe en la patente US-A-4.278.765 y ha sido depositada como CMIM B-1628 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia).

La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99AaldA descrito en el Ejemplo 1a y con el vector pTrc99A y se selecciona, con respecto a las células que poseen el plásmido, en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. De este modo surgen las cepas MG442/pTrc99AaldA y MG442/pTrc99A. Las colonias individuales seleccionadas se multiplican luego adicionalmente en medio mínimo que tiene la composición siguiente: 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, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina se comprueba en cultivos por lotes de 10 ml que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para esto, se inoculan 10 ml de medio de precultivo que tiene la composición siguiente: 2 g/l de 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 se incuba durante 16 horas a 37°C y 180 rpm en una incubadora ESR fabricada por Kühner AG (Birsfelden, Suiza). 250 µl de este precultivo se inoculan en 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 glucosa, 50 mg/l de ampicilina) y se incuban durante 48 horas a 37°C. Con vistas a inducir completamente la expresión del gen aldA, se añaden cargas en paralelo de 100 mg/l de isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG). La formación de L-treonina mediante la cepa MG442 progenitora se examina de la misma manera, pero sin adición de ampicilina al medio. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo con un fotómetro LP2W fabricado por Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una longitud de onda de medida de 660 nm.

5

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

10

El resultado del experimento se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Cepa	Mezclas	OD (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	-	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	-	3,8	1,3
MG442/pTrc99AaldA	-	5,6	1,8
MG442/pTrc99AaldA	IPTG	4,7	2,5

15

Ejemplo 2

Preparación de L-treonina usando el gen aldB

2a) Construcción del plásmido de expresión pTrc99AaldB

El gen aldB procedente de E. coli K12 se amplificó aplicando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y también oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia nucleotídica del gen aldB en E. coli K12 MG1655 (Número de Acceso AE000436, Blattner et al. (Science 277(5331): 1453-1474 (1997))), se sintetizaron cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Las secuencias de los cebadores se modificaron de tal modo que surgieron sitios de reconocimiento por enzimas de restricción. Para el cebador aldB1 se escogió la secuencia de reconocimiento para XbaI, y para el cebador aldB2 se escogió la secuencia de reconocimiento para HindIII, marcándose estas secuencias de reconocimiento subrayando las secuencias nucleotídicas representadas a continuación:

aldB1: 5' - CAACTATCTCTAGAACCCTTGCCCG - 3' (SEC ID No. 3)

aldB2: 5' - CCAATGCGACAAGCTTCTTATATC - 3' (SEC ID No. 4)

El ADN cromosómico de E. coli K12 MG1655 empleado para la PCR se aisló, según las instrucciones del fabricante, con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN de alrededor de 1680 pb de tamaño se puede amplificar con los cebadores específicos en condiciones estándar de PCR (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con Taq-ADN-polimerasa (QIAGEN, Hilden, Alemania). El producto de la PCR se ligó, según las instrucciones del fabricante, con el vector pCR®2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se transformó en la cepa TOP10F' de E. coli. La selección de las células que poseen el plásmido se llevó a cabo en agar LB, que se roció con 50 µg/ml de ampicilina. Despues de aislar el ADN plasmídico, el vector se escindió con las enzimas de restricción XbaI y HindIII/XbaI, y, después de comprobar mediante fraccionamiento en gel de agarosa al 0,8%, se denominó pCR2.1TOPOaldB.

Subsiguentemente, el vector pCR2.1TOPOaldB se restringió con las enzimas de restricción HindIII y XbaI, y el fragmento aldB se aisló tras fraccionar en el gel de agarosa al 0,8% con la ayuda del QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se escindió con las enzimas de restricción HindIII y XbaI, y se ligó con el fragmento aldB aislado. La cepa de E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, USA) se transformó con la carga de ligación y se seleccionó, con respecto a células que poseen el plásmido, en agar LB, al que se añadieron 50 µg/ml de ampicilina. La clonación con éxito puede confirmarse tras aislar el ADN plasmídico mediante escisión de control con las enzimas HindIII/XbaI, EcoRV y XbaI. El plásmido se denomina pTrc99AaldB (Figura 2).

45

2b) Preparación de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99AaldB

La cepa de *E. coli* MG442 productora de L-treonina se describe en la patente US-A-4.278.765 y ha sido depositada como CMIM B-1628 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia).

La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99AaldB descrito en el Ejemplo 2a y con el vector pTrc99A y se selecciona, con respecto a las células que poseen el plásmido, en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. De este modo surgen las cepas MG442/pTrc99AaldB y MG442/pTrc99A. Las colonias individuales seleccionadas se multiplican luego adicionalmente en medio mínimo que tiene la composición siguiente: 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, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina se examina en cultivos por lotes de 10 ml que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para esto, se inoculan 10 ml de medio de precultivo que tiene la composición siguiente: 2 g/l de 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 se incuba durante 16 horas a 37°C y a 180 rpm en una incubadora ESR fabricada por Kühner AG (Birsfelden, Suiza). 250 µl en el momento de este precultivo se inoculan en 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 glucosa, 50 mg/l de ampicilina) y se incuban durante 48 horas a 37°C. Con vistas a inducir completamente la expresión del gen aldB, se añaden cargas en paralelo de 100 mg/l de isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG). La formación de L-treonina mediante la cepa MG442 progenitora se examina de la misma manera, pero sin adición de ampicilina al medio. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo con un fotómetro LP2W fabricado por Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una longitud de onda de medida de 660 nm.

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

El resultado del experimento se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Cepa	Mezclas	OD (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	-	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	-	3,8	1,3
MG442/pTrc99AaldB	-	4,6	2,0
MG442/pTrc99AaldB	IPTG	4,4	2,1

Ejemplo 3

Preparación de L-treonina usando el gen aldh

3a) Construcción del plásmido de expresión pTrc99AaldH

El gen aldh procedente de *E. coli* K12 se amplificó aplicando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y también oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia nucleotídica del gen aldh en *E. coli* K12 MG1655 (Número de Acceso AE000228, Blattner et al. (Science 277(5331): 1453-1474 (1997))), se sintetizaron cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Las secuencias de los cebadores se modificaron de tal modo que surgieron sitios de reconocimiento por enzimas de restricción. Para el cebador aldh5 se escogió la secuencia de reconocimiento para BamHI, y para el cebador aldh3 se escogió la secuencia de reconocimiento para Sall, marcándose estas secuencias de reconocimiento subrayando las secuencias nucleotídicas representadas a continuación:

aldH3: 5'- AGCCGTCGACACCACGCAAACGT CGCAGG -3' (SEC ID No. 5)

aldH5: 5'- ATCGGATCCTCTGCGCCCTCACGTT CACA -3' (SEC ID No. 6)

El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655 empleado para la PCR se aisló, según las instrucciones del fabricante, con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN de alrededor de 1650 pb de tamaño se puede amplificar con los cebadores específicos en condiciones estándar de PCR (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con Taq-ADN-polimerasa (QIAGEN, Hilden, Alemania). El producto de la PCR se ligó, según las instrucciones del fabricante, con el vector pCR-BluntII-TOPO (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se transformó en la cepa TOP10 de *E. coli*. La selección de las células que poseen el plásmido se llevó a cabo en agar LB, que se roció con 50 µg/ml de

kanamicina. Después de aislar el ADN plasmídico, el vector se escindió con las enzimas de restricción BamHI y Sall, y, después de comprobar mediante fraccionamiento en gel de agarosa al 0,8%, se denominó pCRBluntaldH.

Subsiguentemente, el vector pCRBluntaldH se restringió con las enzimas de restricción BamHI y Sall, y el fragmento aldH se aisló tras fraccionar en el gel de agarosa al 0,8% con la ayuda del QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) se escindió con las enzimas BamHI y Sall, después se desfosforiló con fosfatasa alcalina según las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) y se ligó con el fragmento aldH aislado. La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, USA) se transformó con la carga de ligación y se seleccionó, con respecto a células que poseen el plásmido, en agar LB, al que se añadieron 50 µg/ml de ampicilina. La clonación con éxito puede confirmarse tras aislar el ADN plasmídico mediante escisión de control con las enzimas BamHI/Sall, EcoRI y Ncol. El plásmido se denomina pTrc99AaldH (Figura 3).

3b) Preparación de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99AaldH

La cepa de *E. coli* MG442 productora de L-treonina se describe en la patente US-A-4.278.765 y ha sido depositada como CMIM B-1628 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia).

La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99AaldH descrito en el Ejemplo 3a y con el vector pTrc99A y se selecciona, con respecto a las células que poseen el plásmido, en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. De este modo surgen las cepas MG442/pTrc99AaldH y MG442/pTrc99A. Las colonias individuales seleccionadas se multiplican luego adicionalmente en medio mínimo que tiene la composición siguiente: 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, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina se examina en cultivos por lotes de 10 ml que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para esto, se inoculan 10 ml de medio de precultivo que tiene la composición siguiente: 2 g/l de 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 se incuba durante 16 horas a 37°C y a 180 rpm en una incubadora ESR fabricada por Kühner AG (Birsfelden, Suiza). 250 µl en el momento de este precultivo se inoculan en 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 glucosa, 50 mg/l de ampicilina) y se incuban durante 48 horas a 37°C. La formación de L-treonina mediante la cepa MG442 progenitora se examina de la misma manera, pero sin adición de ampicilina al medio. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo con un fotómetro LP2W fabricado por Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una longitud de onda de medida de 660 nm.

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

El resultado del experimento se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Cepa	OD (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	3,8	1,3
MG442/pTrc99AaldH	5,6	3,3

35

Ejemplo 4

Preparación de L-treonina usando el gen betB

4a) Construcción del plásmido de expresión pTrc99AbetB

El gen betB procedente de *E. coli* K12 se amplificó aplicando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y también oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia nucleotídica del gen betB en *E. coli* K12 MG1655 (Número de Acceso AE000138, Blattner et al. (Science 277: 1453-1474 (1997)), se sintetizaron cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Las secuencias de los cebadores se modificaron de tal modo que surgieron sitios de reconocimiento por enzimas de restricción. Para el cebador betB1 se escogió la secuencia de reconocimiento para XbaI, y para el cebador betB2 se escogió la secuencia de reconocimiento para HindIII, marcándose estas secuencias de reconocimiento subrayando las secuencias nucleotídicas representadas a continuación:

betB1: 5' - CAGCATCTAGACACCGATTAAACCGAG - 3' (SEC ID No. 7)

betB2: 5' - CAAATTGCAAATAAAGCTTCTGGTTAG - 3' (SEC ID No. 8)

El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655 empleado para la PCR se aisló, según las instrucciones del fabricante, con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN de alrededor de 1530 pb de tamaño se puede amplificar con los cebadores específicos en condiciones estándar de PCR (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) con *Taq*-ADN-polimerasa (QIAGEN, Hilden, Alemania). El producto de la PCR se ligó, según las instrucciones del fabricante, con el vector pCR®2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Países Bajos) y se transformó en la cepa TOP10F' de *E. coli*. La selección de las células que poseen el plásmido se llevó a cabo en agar LB, que se roció con 50 µg/ml de ampicilina. Despues de aislar el ADN plasmídico, el vector se escindió con las enzimas de restricción EcoRI y Scal, y, después de comprobar mediante fraccionamiento en gel de agarosa al 0,8%, se denominó pCR2.1TOPObetB.

Subsiguentemente, el vector pCR2.1TOPObetB se restringió con las enzimas de restricción HindIII y XbaI, y el fragmento betB se aisló tras fraccionar en el gel de agarosa al 0,8% con la ayuda del QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) se escindió con las enzimas HindIII y XbaI, y se ligó con el fragmento betB aislado. La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, USA) se transformó con la carga de ligación y se seleccionó, con respecto a células que poseen el plásmido, en agar LB, al que se añadieron 50 µg/ml de ampicilina. La clonación con éxito puede confirmarse tras aislar el ADN plasmídico mediante escisión de control con las enzimas EcoRV, HindIII y XbaI. El plásmido se denomina pTrc99AbetB (Figura 4).

4b) Preparación de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99AbetB

La cepa de *E. coli* MG442 productora de L-treonina se describe en la patente US-A-4.278.765 y ha sido depositada como CMIM B-1628 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, Moscú, Rusia).

La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99AbetB descrito en el Ejemplo 4a y con el vector pTrc99A y se selecciona, con respecto a las células que poseen el plásmido, en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. De este modo surgen las cepas MG442/pTrc99AbetB y MG442/pTrc99A. Las colonias individuales seleccionadas se multiplican luego adicionalmente en medio mínimo que tiene la composición siguiente: 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, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina se examina en cultivos por lotes de 10 ml que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para esto, se inoculan 10 ml de medio de precultivo que tiene la composición siguiente: 2 g/l de 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 se incuba durante 16 horas a 37°C y a 180 rpm en una incubadora ESR fabricada por Kühner AG (Birsfelden, Suiza). 250 µl en el momento de este precultivo se inoculan en 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 glucosa, 50 mg/l de ampicilina) y se incuban durante 48 horas a 37°C. La formación de L-treonina mediante la cepa MG442 progenitora se examina de la misma manera, pero sin adición de ampicilina al medio. 35 Despues de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo con un fotómetro LP2W fabricado por Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una longitud de onda de medida de 660 nm.

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

40 El resultado del experimento se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Cepa	OD (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	3,8	1,3
MG442/pTrc99AbetB	4,2	2,6

Breve descripción de las figuras:

Figura 1: Mapa del vector pTrc99AaldA

45

Figura 2: Mapa del vector pTrc99AaldB

Figura 3: Mapa del vector pTrc99AaldH

Figura 4: Mapa del vector pTrc99AbetB

Los datos de longitud deben entenderse como datos aproximados. Las abreviaturas y designaciones que se usan tienen los siguientes significados:

- Amp: gen de resistencia a ampicilina
- lacI: gen para la proteína represora del promotor trc
- 5 • Ptrc: región del promotor trc, inducible por IPTG
- aldA: región codificante del gen aldA
- aldB: región codificante del gen aldB
- aldH: región codificante del gen aldH
- betB: región codificante del gen betB
- 10 • 5S: región de 5S rRNA
- rrnBT: región terminadora de ARNr

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

- BamHI: Endonucleasa de restricción derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* H
- EcoRI: Endonucleasa de restricción derivada de *Escherichia coli* RY13
- 15 • EcoRV: Endonucleasa de restricción derivada de *Escherichia coli* B946
- HindIII: Endonucleasa de restricción derivada de *Haemophilus influenzae*
- Ncol: Endonucleasa de restricción derivada de *Rhodococcus* sp. ATCC® 19070
- PstI: Endonucleasa de restricción derivada de *Providencia stuartii*
- Sall: Endonucleasa de restricción derivada de *Streptomyces albus* G
- 20 • XbaI: Endonucleasa de restricción derivada de *Xanthomonas badrii*
- Xhol: Endonucleasa de restricción derivada de *Xanthomonas holcicola*

Listado de secuencias

<110> Evonik Degussa GmbH

<120> Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos usando cepas de la familia de enterobacteriáceas

<130> 020125 BT / AL2

5 <160>8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 28

<212> ADN

10 <213> secuencia sintética

<220>

<221> Cebador

<222> (1)..(28)

<223> aldA1

15 <400> 1

ccgaaaacaa acatcttagat cacaggag 28

<210>2

<211> 24

<212> ADN

20 <213> secuencia sintética

<220>

<221> Cebador

<222> (1)..(24)

<223> aldA2

25 <400> 2

cctccgaagc tttcactcat taag 24

<210>3

<211> 25

<212> ADN

30 <213> secuencia sintética

<220>

<221> Cebador

<222> (1)..(25)

<223> aldB1

35 <400> 3

caactatctc tagaaccctt gcccc 25

<210>4

	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
5	<221> Cebador	
	<222> (1)..(24)	
	<223> aldB2	
	<400> 4	
	ccaatgcgac aagcttccta tatc	24
10	<210>5	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
15	<221> Cebador	
	<222> (1)..(29)	
	<223> aldH3	
	<400> 5	
	agccgtcgac accacgcaaa cgtcgagg	29
20	<210>6	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
25	<221> Cebador	
	<222> (1)..(29)	
	<223> aldH5	
	<400> 6	
	atcgatcct ctgcgccttg acgttcaca	29
30	<210>7	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> secuencia sintética	
	<220>	
35	<221> Cebador	
	<222> (1)..(26)	
	<223> betB1	

ES 2 389 276 T3

<400> 7
cagcatctag acaccgatta accgag 26
<210>8
<211> 27
5 <212> ADN
<213> secuencia sintética
<220>
<221> Cebador
<222> (1)..(27)
10 <223> betB2
<400> 8
caaattgcaa ataaagcttc tggtag 27

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de L-treonina, en el que se llevan a cabo las siguientes etapas:

- 5 a) fermentación de los microorganismos de la familia de enterobacteriáceas que producen el L-aminoácido deseado, y en los que se sobreexpresa el gen betB que codifica betaína aldehído deshidrogenasa (dependiente de NAD),
- b) concentración del L-aminoácido deseado en el medio o en las células de los microorganismos, y
- c) aislamiento del L-aminoácido deseado, con lo que los constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o en porciones (≥ 0 a 100%) de la misma permanecen en el producto.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se sobreexpresan los polinucleótidos de uno o más genes de seleccionados del grupo que consiste en aldB y aldH, con lo que aldB codifica aldehído deshidrogenasa B, y aldH codifica aldehído deshidrogenasa, dependiente de NADP.

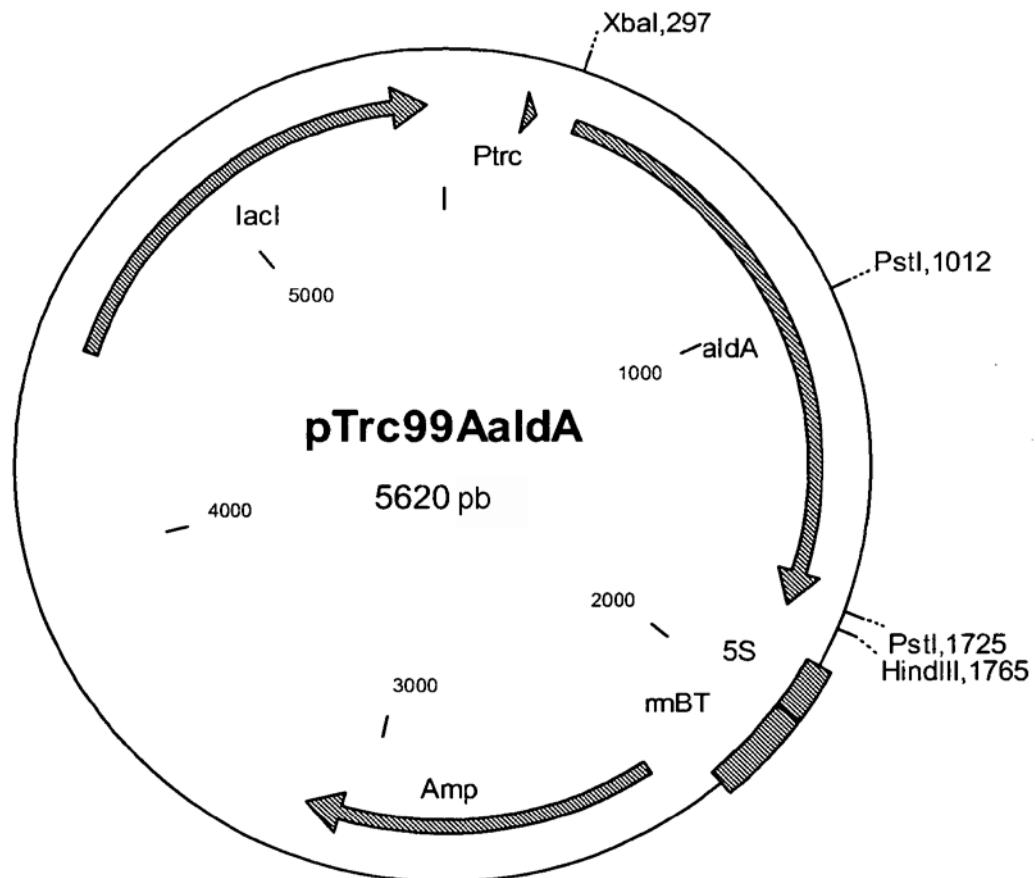
15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que, para la preparación de L-treonina, se fermentan microorganismos de la familia de enterobacteriáceas, en los cuales al mismo tiempo se sobreexpresa adicionalmente uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende:

- 20 3.1 el operón thrABC que codifica aspartato cinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina cinasa y treonina sintasa,
- 3.2 el gen pyc que codifica piruvato carboxilasa,
- 3.3 el gen pps que codifica fosfoenol piruvato sintasa,
- 3.4 el gen ppc que codifica fosfoenol piruvato carboxilasa,
- 25 3.5 los genes pntA y pntB que codifican transhidrogenasa,
- 3.6 el gen rhtB de Escherichia coli que codifica una proteína que proporciona resistencia a homoserina,
- 3.7 el gen mqo que codifica malato:quinona oxidoreductasa,
- 3.8 el gen rhtC de Escherichia coli que codifica una proteína que proporciona resistencia a treonina,
- 3.9 el gen thrE que codifica la proteína exportadora de treonina,
- 25 3.10 el gen gdhA que codifica glutamato deshidrogenasa,
- 3.11 el gen hns que codifica la proteína de unión a ADN HLP-II,
- 3.12 el gen pgm que codifica fosfoglucoisomerasa,
- 3.13 el gen fba que codifica fructosa bifosfato aldolasa,
- 3.14 el gen ptsH que codifica la fosfohistidina proteína hexosa fosfotransferasa,
- 30 3.15 el gen ptsI que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa,
- 3.16 el gen crr que codifica el componente IIa específico de glucosa,
- 3.17 el gen ptsG que codifica el componente IIBC específico de glucosa,
- 3.18 el gen lrp que codifica el regulador del regulón leucina,
- 3.19 el gen csrA que codifica el regulador global Csr,
- 35 3.20 el gen fadR que codifica el regulador FadR del metabolismo de ácidos grasos y acetato,
- 3.21 el gen icIR que codifica el regulador IcIR,
- 3.22 el gen mopB que codifica la chaperona de 10 Kd,
- 3.23 el gen ahpC que codifica la subunidad pequeña de la alquil hidroperóxido reductasa,
- 3.24 el gen ahpF que codifica la subunidad grande de la alquil hidroperóxido reductasa,
- 40 3.25 el gen cysK que codifica cisteína sintasa A,

- 3.26 el gen *cysB* que codifica el regulador del regulón *cys*,
- 3.27 el gen *cysJ* que codifica la flavoproteína de la NADPH sulfito reductasa,
- 3.28 el gen *cysI* que codifica la hemoproteína de NADPH sulfito reductasa,
- 3.29 el gen *cysH* que codifica adenilil sulfato reductasa,
- 5 3.30 el gen *phoB* que codifica el regulador positivo *PhoB* del regulón *pho*,
- 3.31 el gen *phoR* que codifica la proteína sensora del regulón *pho*,
- 3.32 el gen *phoE* que codifica la proteína E de la membrana celular externa,
- 3.33 el gen *pykF* que codifica piruvato cinasa I estimulada por fructosa,
- 3.34 el gen *pkfB* que codifica 6-fosfofructocinasa II,
- 10 3.35 el gen *malE* que codifica la proteína de unión periplásmica del transporte de maltosa,
- 3.36 el gen *rseA* que codifica una proteína de membrana que actúa como un regulador negativo de la actividad *sigmaE*,
- 3.37 el gen *rseC* que codifica un regulador global del factor *sigmaE*,
- 3.38 el gen *sodA* que codifica superóxido dismutasa,
- 15 3.39 el gen *sucA* que codifica la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 3.40 el gen *sucB* que codifica la subunidad dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 3.41 el gen *sucC* que codifica la subunidad β de succinil-CoA sintetasa, y
- 3.42 el gen *sucD* que codifica la subunidad α de succinil-CoA sintetasa.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que, para la preparación de L-treonina, se fermentan microorganismos de la familia de enterobacteriáceas, en los cuales al mismo tiempo se elimina adicionalmente uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende:
- 4.1 el gen *tdh* que codifica treonina deshidrogenasa,
- 4.2 el gen *mdh* que codifica malato deshidrogenasa,
- 25 4.3 el producto génico del marco de lectura abierto (orf) *yjFA* de *E. coli*, cuando dicho microorganismo es de la especie *E. coli*,
- 4.4 el producto génico del marco de lectura abierto (orf) *ytfP* de *E. coli*, cuando dicho microorganismo es de la especie *E. coli*,
- 4.5 el gen *pckA* que codifica fosfoenolpiruvato carboxicinasa,
- 4.6 el gen *poxB* que codifica piruvato oxidasa,
- 30 4.7 el gen *aceA* que codifica isocitrato liasa,
- 4.8 el gen *dgsA* que codifica el regulador *DgsA* del sistema de fosfotransferasa,
- 4.9 el gen *fruR* que codifica el represor de fructosa,
- 4.10 el gen *rpoS* que codifica el factor *sigma*³⁸,
- 4.11 el gen *aspA* que codifica aspartato amonio liasa (aspartasa), y
- 35 4.12 el gen *aceB* que codifica malato sintasa A.
5. Microorganismos transformados del género *Escherichia*, en los que el gen *betB* y uno o más de los genes seleccionados del grupo que consiste en *aldB* y *aldH* están presentes en forma sobreexpresada, y que producen L-treonina.
6. Microorganismos según la reivindicación 5, en los que los microorganismos son de la especie *E. coli*.

ES 2 389 276 T3

Figura 1: Mapa del vector pTrc99AaldA



ES 2 389 276 T3

Figura 2: Mapa del vector pTrc99AaldB

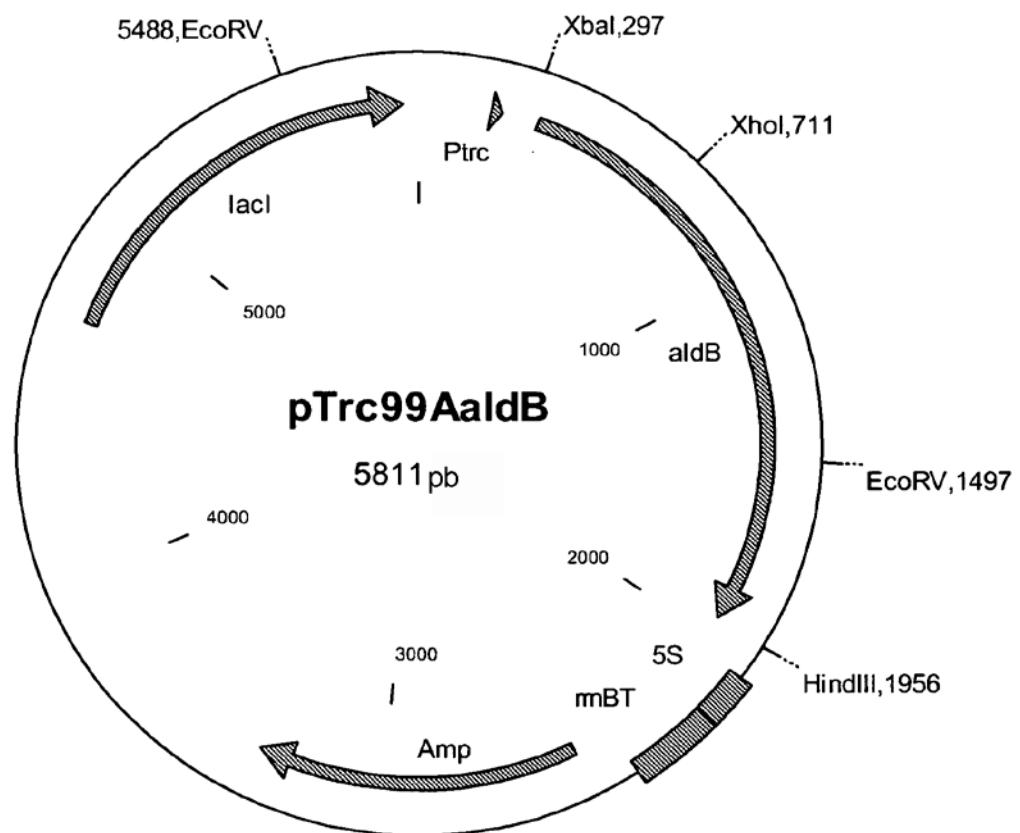
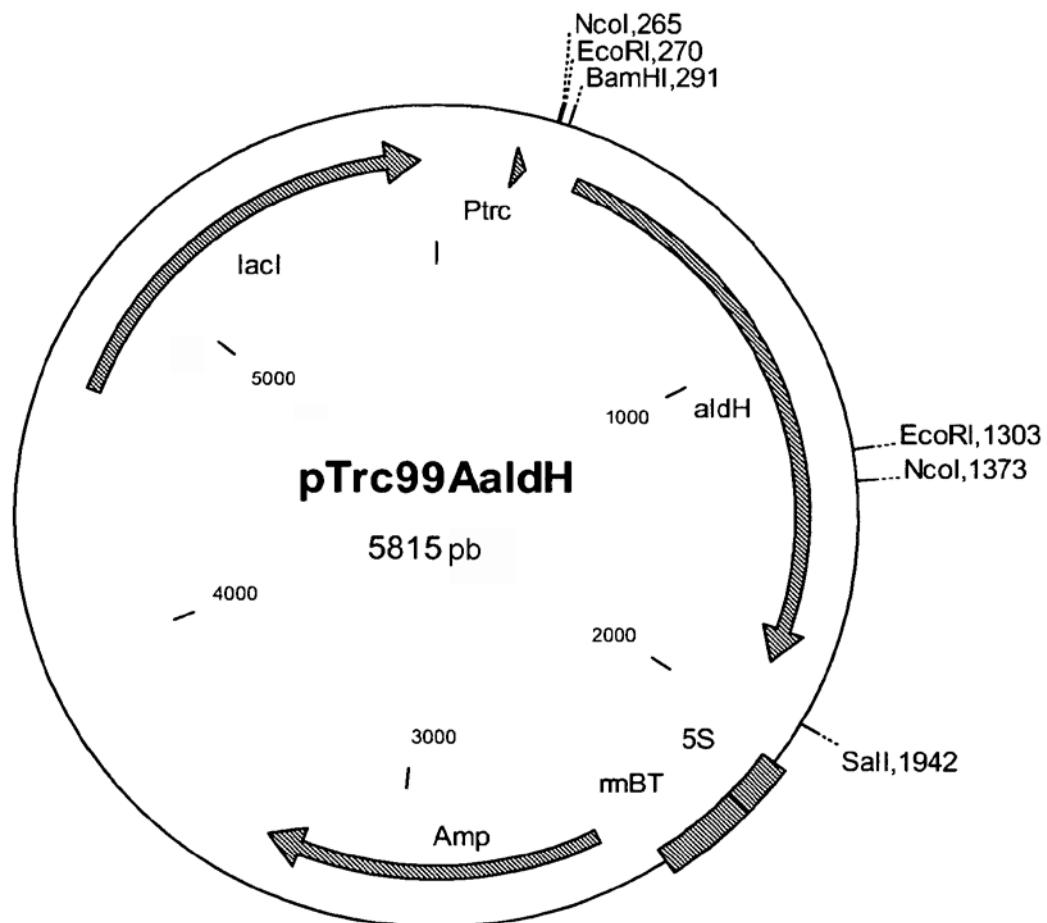


Figura 3: Mapa del vector pTrc99AaldH



ES 2 389 276 T3

Figura 4: Mapa del vector pTrc99AbetB

