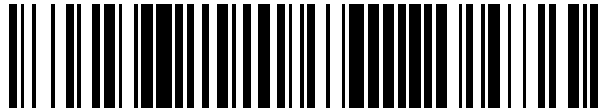


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 367**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2006 E 06112245 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1715056**

54 Título: **Procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediante utilización de unas cepas mejoradas de la familia de las enterobacteriáceas**

30 Prioridad:

**23.04.2005 DE 102005019040**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**07.11.2013**

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)  
Rellinghauser Strasse 1-11  
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**RIEPING, DR., MECHTHILD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 428 367 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediando utilización de unas cepas mejoradas de la familia de las enterobacteriáceas

5

Este invento se refiere a un procedimiento para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-treonina y L-triptófano, conteniendo el medio glicerol como fuente de carbono, mediando utilización de unos microorganismos recombinantes de la familia de las enterobacteriáceas, en los cuales el gen *glpR* es debilitado, y que muestran una capacidad mejorada para el aprovechamiento de glicerol y por consiguiente para la formación y el enriquecimiento de L-aminoácidos.

10

### Estado de la técnica

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

15

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

20

Para el mejoramiento de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos se utilizan unos métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. De esta manera se obtienen unas cepas, que son resistentes a unos antimetabolitos tales como p.ej. el compuesto análogo a la treonina ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivaleriano (AHV), o que son auxótrofas para unos metabolitos importantes para regulación y que producen unos L-aminoácidos tales como p.ej. L-treonina. La resistencia frente al compuesto análogo al triptófano 5-metil-DL-triptófano (5-MT) distingue p.ej. a una cepa, que produce L-triptófano.

25

30

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

35

Toda la industria de la fermentación para la producción de L-aminoácidos trabaja hoy en día en la mayoría de los casos basándose en glucosa o sacarosa como fuente de carbono, que se obtienen en el caso de la elaboración de productos agrarios. Puesto que, sin embargo, el precio de estas fuentes de carbono está subiendo, es deseable una alternativa que se pueda llevar a cabo tecnológicamente para la producción de los L-aminoácidos, de manera preferida de L-treonina y L-triptófano, con un aprovechamiento mejorado de un material más barato como materia prima alternativa para la fermentación.

40

45

Es conocido el hecho de que los microorganismos que producen L-aminoácidos crecen sobre glicerol como única fuente de carbono (véase el documento de patente de los EE.UU. US-A-5.175.107). El glicerol (propanotriol) es un componente natural de los aceites y las grasas, y une como un "puente" a las moléculas de ácidos grasos en los triglicéridos. La molécula de glicerol es fuertemente polar y por lo tanto bien soluble en agua. Como producto de copulación o acoplamiento, esta valiosa materia prima resulta en el caso de la producción de un gasóleo biológico (éster metílico de ácido graso de colza) y se emplea en productos cosméticos, farmacéuticos, alimentos y para usos técnicos. Para el empleo de glicerol como una materia prima para la producción de componentes de piensos es decisiva la baratura. Se ha de partir del hecho de que con una producción creciente de gasóleo biológico, el glicerol se volverá interesante para el sector de los piensos.

50

55

### Misión del invento

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

60

### Descripción del invento

Es objeto del invento un procedimiento para la producción por fermentación de L-aminoácidos, en particular de L-treonina y L-triptófano, conteniendo el medio glicerol como fuente de carbono, mediando utilización de unos

65

5 microorganismos recombinantes de la familia de las enterobacteriáceas, que ya producen en particular L-aminoácidos, y en los que por lo menos el gen *glpR* o unas secuencias de nucleótidos que codifican su producto génico, es debilitado o respectivamente son debilitadas, en particular es desconectado o respectivamente son desconectadas, que muestran una capacidad mejorada para el aprovechamiento de glicerol y que producen L-aminoácidos, en particular L-treonina y L-triptófano, de un modo mejorado.

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

15 El concepto de "debilitamiento" describe en este contexto la disminución o la desconexión de la actividad intracelular o de la concentración en un microorganismo de una o varias enzima(s) o proteína(s), que es(son) codificada(s) por el correspondiente ADN, mediante el recurso de que, por ejemplo, se utiliza un promotor más débil, que el que se encuentra en el microorganismo no recombinante o en la cepa parental para la correspondiente enzima o respectivamente proteína, o un gen o respectivamente un alelo, que codifica una correspondiente enzima o respectivamente proteína con una actividad más baja, o respectivamente que desactiva al marco de lectura abierto o al gen para la correspondiente enzima o respectivamente proteína, y eventualmente se combinan estas medidas técnicas.

20 Por el concepto de marco de lectura abierto (ORF, acrónimo del inglés "open reading frame") se designa a un segmento de una secuencia de nucleótidos, que codifica o puede codificar una proteína o respectivamente un polipéptido o un ácido ribonucleico, a la (al) que no se le asigna ninguna función de acuerdo con el estado de la técnica. Después de la asignación de una función al correspondiente segmento de la secuencia de nucleótidos se habla por lo general de un gen. Por el concepto de "alelos" se entienden por lo general unas formas alternativas de un gen establecido. Las formas se distinguen por ciertas diferencias en la secuencia de nucleótidos.

25 Por el concepto de "un producto génico" se designa por lo general a la proteína o al ácido ribonucleico que ha sido codificada/o por una secuencia de nucleótidos, es decir un ORF, un gen o un alelo.

30 Mediante las medidas técnicas del debilitamiento se disminuye la actividad o la concentración de la correspondiente proteína por lo general a 0 hasta 75 %, 0 hasta 50 %, 0 hasta 25 %, 0 hasta 10 % o 0 hasta 5 % de la actividad o la concentración de la proteína de tipo silvestre, o respectivamente se disminuye la actividad o la concentración de la proteína en el microorganismo recombinante o la cepa parental para la correspondiente enzima o respectivamente proteína. Por el concepto de "microorganismo no recombinante" o "cepa parental" (en inglés "parent strain") se entiende el microorganismo, en el que se llevan a cabo las medidas técnicas del invento.

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

- 40 a) los microorganismos que producen el L-aminoácido deseado, en los que se debilita(n), en particular se desconecta(n), el gen *glpR* o las secuencias de nucleótidos o los alelos, que codifican el correspondiente producto génico, son cultivados en un medio que contiene glicerol en unas condiciones, en las que el L-aminoácido deseado se enriquece en el medio o en las células y,
- 45 b) se aísla el L-aminoácido deseado, permaneciendo eventualmente en el producto aislado o siendo eliminados de una manera total ciertos componentes del caldo de fermentación y/o de la biomasa, en su totalidad o en porciones (desde  $\geq 0$  hasta 100 %).

50 En el caso de los microorganismos particularmente recombinantes se trata de unos representantes de la familia de las enterobacteriáceas, que se escogen entre el conjunto que se compone de los géneros *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*. Los géneros *Escherichia* y *Serratia* son preferidos. En el caso del género *Escherichia* se ha de mencionar en particular la especie *Escherichia coli* y en el caso del género *Serratia* se ha de mencionar en particular la especie *Serratia marcescens*.

55 Como unas cepas, adecuadas como cepas parentales, que producen en particular L-treonina, del género *Escherichia*, en particular de la especie *Escherichia coli*, se han de mencionar, por ejemplo:

- 60 - *Escherichia coli* H4581 (documento de patente europea EP 0 301 572)
- *Escherichia coli* KY10935 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61(11): 1877-1882 (1997))
- *Escherichia coli* VNIIgenetika MG442 (documento US-A-4.278.765)
- 65 - *Escherichia coli* VNIIgenetika M1 (documento US-A-4.321.325)

- *Escherichia coli* VNIIgenetika 472T23 (documento US-A-5.631.157)
- 5 - *Escherichia coli* BKIIM B-3996 (documento US-A-5.175.107)
- *Escherichia coli* kat 13 (documento de solicitud de patente internacional WO 98/04715)
- *Escherichia coli* KCCM-10132 (documento WO 00/09660)
- 10 Como unas cepas adecuadas como cepas parentales, que producen L-treonina, del género *Serratia*, en particular de la especie *Serratia marcescens*, se mencionan, por ejemplo:
  - *Serratia marcescens* HNr21 (*Applied and Environmental Microbiology* 38(6): 1045-1051 (1979))
  - 15 - *Serratia marcescens* TLR156 (*Gene* 57(2-3): 151-158 (1987))
  - *Serratia-marcescens* T-2000 (*Applied Biochemistry and Biotechnology* 37(3): 255-265 (1992))

Las cepas que producen L-treonina, procedentes de la familia de las enterobacteriáceas, poseen de manera preferida, entre otras, una o varias de las características genéticas o respectivamente fenotípicas, que se escogen entre el conjunto que se compone de: la resistencia frente al ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivaleriano, la resistencia frente a tialisina, la resistencia frente a etionina, la resistencia frente a  $\alpha$ -metilserina, la resistencia frente al ácido diaminosuccínico, la resistencia frente al ácido  $\alpha$ -aminobutírico, la resistencia frente a borrelidina, la resistencia frente al ácido ciclopentano-carboxílico, la resistencia frente a rifampicina, la resistencia frente a compuestos análogos a valina tales como, por ejemplo, el hidroxamato de valina, la resistencia frente a compuestos análogos a purina tales como, por ejemplo, la 6-dimetilamino-purina, la necesidad de L-metionina, la necesidad eventualmente parcial y compensable de L-isoleucina, la necesidad del ácido meso-diaminopimélico, la auxotrofia en lo que respecta a dipéptidos que contienen treonina, la resistencia frente a L-treonina, la resistencia frente a un material refinado de treonina, la resistencia frente a L-homoserina, la resistencia frente a L-lisina, la resistencia frente a L-metionina, la resistencia frente al ácido L-glutámico, la resistencia frente al L-aspartato, la resistencia frente a L-leucina, la resistencia frente a L-fenilalanina, la resistencia frente a L-serina, la resistencia frente a L-cisteína, la resistencia frente a L-valina, la sensibilidad frente al fluoropiruvato, una treonina deshidrogenasa defectuosa, eventualmente la capacidad para el aprovechamiento de sacarosa, el refuerzo del operón de treonina, el refuerzo de la homoserina deshidrogenasa l-aspartato cinasa I, de manera preferida de la forma resistente frente a la retroalimentación (en inglés feed back), el refuerzo de la homoserina cinasa, el refuerzo de la treonina sintasa, el refuerzo de la aspartato cinasa, eventualmente de la forma resistente frente a la retroalimentación, el refuerzo de la aspartato-semialdehído deshidrogenasa, el refuerzo de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, eventualmente de la forma resistente frente a la retroalimentación, el refuerzo de la fosfoenolpiruvato sintasa, el refuerzo de la transhidrogenasa, el refuerzo del producto génico RhtB, el refuerzo del producto génico RhtC, el refuerzo del producto génico Yfik, el refuerzo de la piruvato carboxilasa, y el debilitamiento de la formación de ácido acético.

- Como unas cepas adecuadas como cepas parentales, que producen L-triptófano, del género *Escherichia*, en particular de la especie *Escherichia coli*, se mencionan, por ejemplo:
- 45 - *Escherichia coli* JP4735/pMU3028 (documento US 5.756.345)
  - *Escherichia coli* JP6015/pMU91 (documento US 5.756.345)
  - *Escherichia coli* SV164 (pGH5) (documento WO 94/08031)
  - 50 - *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) (documento US 4.371.614)
  - *E. coli* AGX6 (pGX50)aroP (NRRL B-12264) (documento US 4.371.614)
  - 55 - *Escherichia coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps (documento WO 97/08333)
  - *Escherichia coli* ATCC 31743 (documento de patente del Canadá CA1182409)
  - *E. coli* C534/pD2310,pDM136 (ATCC 39795) (documento WO 87/01130)
  - 60 - *Escherichia coli* JB102/p5LRPS2 (documento US 5.939.295)

Las cepas que producen L-triptófano, procedentes de la familia de las enterobacteriáceas, poseen de manera preferida, entre otras, una o varias de las características genéticas o respectivamente fenotípicas, que se escogen entre el conjunto que se compone de: la resistencia frente a 5-metil-DL-triptófano, la resistencia frente a 5-fluoro-triptófano, la

resistencia frente a 4-metil-DL-triptófano, la resistencia frente a 6-metil-DL-triptófano, la resistencia frente a 4-fluoro-triptófano, la resistencia frente a 6-fluoro-triptófano, la resistencia frente a antranilato, la resistencia frente a triptazano, la resistencia frente a indol, la resistencia frente al ácido indol-acrílico, la necesidad de fenilalanina, la necesidad de tirosina, eventualmente la capacidad para el aprovechamiento de sacarosa, el refuerzo del operón de triptófano, de manera preferida de la antranilato sintasa, de manera preferida de la forma resistente frente a la retroalimentación (feed back), una triptofanil-ARNt sintasa parcialmente defectuosa, una asimilación debilitada de triptófano, una triptofanasa defectuosa, unas proteínas represoras desactivadas, el refuerzo de la biosíntesis de serina, el refuerzo de la síntesis de fosfoenolpiruvato, el refuerzo de la síntesis de D-eritrosa-4-fosfato, el refuerzo de la síntesis de 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato (DHAP) y el refuerzo de la biosíntesis de corismato.

Se encontró que ciertos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, después de un debilitamiento, en particular después de una desconexión del gen *glpR* o de sus alelos, producen L-aminoácidos, en particular L-treonina y L-triptófano, de un modo mejorado.

Las secuencias de nucleótidos de los genes o de los marcos de lectura abiertos (ORF) de *Escherichia coli* pertenecen al estado de la técnica y pueden ser tomadas de la secuencia genómica de *Escherichia coli* publicada por Blattner y colaboradores (Science 277: 1453-1462 (1997)).

A partir de los *Salmonella typhimurium* (n° de acceso: NC 003197 (secuencia del genoma total)), *Shigella flexneri*, (n° de acceso: NC 004337 (secuencia del genoma total) y *Erwinia carotovora* (n° de acceso: NC 004547 (secuencia del genoma total), que pertenecen asimismo a la familia de las enterobacteriáceas, se conoce la secuencia de nucleótidos para el gen *glpR*.

Es conocido el hecho de que por medio de unas enzimas propias del anfitrión (la metionina aminopeptidasa), se puede disociar el aminoácido N-terminal metionina.

Los genes y las actividades del metabolismo del glicerol (en inglés "glycerol metabolism") se han descrito de manera recopilativa también en la cita de Lin (En: Neidhardt (coordinador de edición): *Escherichia coli* y *Salmonella*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., EE.UU: 307-342 (1996)).

El gen *glpR* de *Escherichia coli* K12 se describe, entre otras cosas, por medio de los siguientes datos:

Gen *glpR*:

Denominación: Represor del regulón de *glp*  
 Referencia: Blattner y colaboradores; Science 277 (5.331): 1453-1474 (1997)  
 SEQ ID No.: 1  
 N° de acceso: U00096 (región: 3557870-3558628)  
 Nombre alternativo del gen: b3423

La expresión de las enzimas, que participan en el transporte y el metabolismo del glicerol, es regulada estrictamente. Esto se hace posible mediante la organización estructural de los genes *glp*. El regulón de glicerofosfato (*glp*) se compone de cinco operones, que están situados en tres sitios génicos diferentes sobre el cromosoma de *E. coli* (Cozzarelli y colaboradores; Journal of Molecular Biology 31: 371-387 (1968)). Todos los genes del sistema de *glp* están puestos bajo el control del represor *GlpR* (Schweizer y Larson, Journal of Bacteriology 169:507-513 (1987)). El sitio (locus) del gen *glpR* se sitúa en 75 min, y es transcrito en sentido contrario a las agujas de un reloj (Lin, en: Neidhardt (compilador de edición), *Escherichia coli* y *Salmonella*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., EE.UU: 307-342 (1996)). El represor forma en el estado activo un tetrámero a base de unas subunidades idénticas de 30 kDa (Larson y colaboradores, Journal of Biological Chemistry 262: 15869-15874 (1987)) y se fija específicamente a las regiones de control del regulón de *glp*. Unos análisis de la estructura secundaria muestran, que la fijación específica al ADN del represor es posible por medio de un motivo de hélice-bucle-hélice en la proximidad del extremo terminal de N (Zeng y colaboradores, Journal of Bacteriology 178: 7080-7089 (1996)). Esta fijación al ADN puede ser suprimida por el inductor G3P (Larson y colaboradores, Journal of Biological Chemistry 262: 15869-15874 (1987)). Mediante unos ensayos con un mutante con una glicerol cinasa desactivada se mostró, que para realizar una inducción de los genes de *glp* es necesaria una fosforilación del glicerol. Como consecuencia, el G3P es el único inductor (Hayashi y Lin, Journal of Molecular Biology 14: 515-521 (1965); Lin, Annu. Rev. Microbiology 30:535-578 (1976)). Como anti-inductor se identificó el D-galactosa-1-fosfato (Sundarajan, Biochemistry 50:463-469 (1963)).

Un regulón es una unidad de genes, que ciertamente están localizados en diferentes sitios de un genoma, pero cuya expresión es controlada por las mismas proteínas reguladoras. Un operón es una unidad de genes regulados en común en un sitio génico.

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

5 Para una mejor claridad de comprensión, la secuencia conocida para el gen *glpR* de *Escherichia coli* se ha representado bajo la SEQ ID No. 1 y las secuencias asimismo conocidas para el gen *glpR* de *Salmonella typhimurium* o respectivamente de *Shigella flexneri* o respectivamente de *Erwinia carotovora* se han representado bajo la SEQ ID No. 3 o respectivamente la SEQ ID No. 5 o respectivamente la SEQ ID No. 7. Las proteínas codificadas por estos marcos de lectura se han representado como las SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6 y SEQ ID No. 8.

10 Los marcos de lectura abiertos descritos en las citas bibliográficas indicadas pueden ser utilizados conforme al invento. Además, se pueden utilizar unos alelos de los genes o unos marcos de lectura abiertos, que resultan a partir de la degenerabilidad del código genético o por mutaciones del mismo sentido, neutras en su función (en inglés "sense mutations"). Se prefiere la utilización de genes endógenos o respectivamente de marcos de lectura abiertos endógenos.

15 Por el concepto de "genes endógenos" o de "secuencias endógenas de nucleótidos" se entienden los genes o marcos de lectura abiertos o alelos o respectivamente las secuencias de nucleótidos, que están presentes en la población de una especie.

20 Entre los alelos adecuados del gen *glpR*, que contienen unas mutaciones con sentido, neutras en su función, se cuentan, entre otros, los que conducen a lo sumo a 30 o a lo sumo a 20 o a lo sumo a 10, de manera preferida a lo sumo a 7 o a lo sumo a 5, de manera especialmente preferida a lo sumo a 3 o a lo sumo a 2 o a por lo menos un intercambio(s) conservativo(s) de aminoácidos en la proteína codificada por ellos.

25 En el caso de los aminoácidos aromáticos se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian unos/as por otros/as fenilalanina, triptófano y tirosina. En el caso de los aminoácidos hidrófobos se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian unas por otras leucina, isoleucina y valina. En el caso de los aminoácidos polares se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian una por otra glutamina y asparagina. En el caso de los aminoácidos de carácter básico se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian unas por otras arginina, lisina e histidina. En el caso de los aminoácidos de carácter ácido se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian uno por otro el ácido aspártico y el ácido glutámico. En el caso de los aminoácidos que contienen grupos hidroxilo se habla de intercambios conservativos cuando se intercambian una por otra serina y treonina.

30 De igual manera, se pueden utilizar también aquellas secuencias de nucleótidos, que codifican unas variantes de las mencionadas proteínas, que contienen adicionalmente junto al extremo terminal de N o C una prolongación o un acortamiento en por lo menos un (1) aminoácido. Esta prolongación o este acortamiento es de no más que 30, 20, 10, 7, 5, 3 o 2 aminoácidos o radicales de aminoácidos.

35 Entre los alelos adecuados se cuentan también aquellos que codifican unas proteínas, en las que se ha introducido (inserción) o suprimido (delección) por lo menos un (1) aminoácido. El número máximo de tales modificaciones denominadas como "indels" puede ser de 2, 3, 5, 10, pero en ningún caso de más que 15 aminoácidos.

40 Entre los alelos adecuados se cuentan además los que son obtenibles mediante hibridación, en particular en condiciones rigurosas, mediando utilización de las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5 o SEQ ID No 7 de partes de éstas, en particular de las regiones codificadoras o respectivamente de las secuencias complementarias a éstas.

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

55 Para la reacción de hibridación se puede emplear, por ejemplo, un tampón correspondiente al tampón 5x SSC a una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C. En este caso, también se pueden hibridar unas sondas con unos polinucleótidos, que tienen una identidad de menos que un 70 % con la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y son eliminados mediante un lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante una disminución de la concentración de sales hasta 2x SSC y eventualmente a continuación hasta 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aproximadamente 50°C - 68°C, aproximadamente 52°C - 68°C, aproximadamente 54°C - 68°C, aproximadamente 56°C - 68°C, aproximadamente 58°C - 68°C, aproximadamente 60°C - 68°C, aproximadamente 62°C - 68°C, aproximadamente 64°C - 68°C, o aproximadamente 66°C - 68°C. Se prefieren unos intervalos de temperatura de aproximadamente 64°C - 68°C o aproximadamente 66°C - 68°C. Eventualmente, es posible disminuir la concentración

de sales hasta una concentración correspondiente a 0,2x SSC o a 0,1x SSC. Mediante un aumento escalonado de la temperatura de hibridación en unos escalones de aproximadamente 1 - 2°C desde 50°C hasta 68°C se pueden aislar unos fragmentos de polinucleótidos, que poseen una identidad de por ejemplo por lo menos un 70 % o de por lo menos un 80 %, por lo menos un 90 %, por lo menos un 91 %, por lo menos un 92 %, por lo menos un 93 %, por lo menos un 94 %, por lo menos un 95 %, por lo menos un 96 %, por lo menos un 97 %, por lo menos un 98 % o por lo menos un 99 % o por lo menos un 99,6 % con respecto a la secuencia de la sonda empleada o respectivamente a las secuencias de nucleótidos que se representan en las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5 o SEQ ID No. 7. Unas instrucciones adicionales para la hibridación son obtenibles en el comercio en forma de los denominados estuches (p.ej. el DIG Easy Hyb de la entidad Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1603558).

Para la consecución de un debilitamiento se pueden disminuir o respectivamente desconectar, por ejemplo, la expresión de los genes o marcos de lectura abiertos o las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas. Eventualmente, se pueden combinar las dos medidas técnicas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Además, para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-triptófano con cepas de la familia de las enterobacteriáceas puede ser ventajoso, adicionalmente al refuerzo de uno o varios de los genes del metabolismo de glicerol (en inglés "glycerol metabolism"), que se escoge(n) entre el conjunto que se compone de *glpA*, *glpB*, *glpC*, *glpD*, *glpE*, *glpF*, *glpG*, *glpK*, *glpQ*, *glpT*, *glpX*, *tpiA*, *gldA*, *dhaK*, *dhaL*, *dhaM*, *dhaR*, *fsa* y *talC*, reforzar una o varias enzimas de la conocida ruta de biosíntesis del triptófano o unas enzimas de la biosíntesis de la serina o unas enzimas para la producción de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DHAP) y corimato. La utilización de genes endógenos se prefiere por lo general.

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

Unos microorganismos recombinantes con un tal reforzamiento se producen por lo general mediante transformación, transducción o conjugación, o mediante una combinación de estos métodos, con un vector, que contiene el deseado gen, el deseado ORF, un alelo de este gen u ORF, o partes de éstos, y/o un promotor que refuerza la expresión del gen u ORF. En el caso de este promotor se puede tratar de un promotor que procede por una mutación reforzadora de la propia secuencia reguladora situada secuencia arriba (en inglés "upstream") del gen u ORF, o se había fusionado un promotor eficiente con el gen u ORF.

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

Para la consecución de una sobreexpresión, por ejemplo se puede aumentar el número de copias de los correspondientes genes o de los marcos de lectura abiertos, o se puede mutar la región de promotor y de regulación o el sitio de fijación a ribosomas, que se encuentra secuencia arriba del gen estructural. De igual manera, actúan unos casetes de expresión, que son incorporados secuencia arriba del gen estructural. Por medio de unos promotores inducibles es adicionalmente posible aumentar la expresión en el transcurso de la producción por fermentación de L-treonina y L-triptófano, por lo demás puede ser ventajosa también la utilización de unos promotores para la expresión génica, que hacen posible otra expresión génica cronológica. En el plano de la regulación en la traducción de la expresión génica es posible aumentar la frecuencia de la iniciación (el adosamiento del ribosoma al ARNm) o la velocidad de la elongación (fase de prolongación). Por medio de estas medidas técnicas para la prolongación de la duración de vida del ARNm (mensajero) se mejora asimismo la expresión. Además mediante la evitación de la degradación de la proteína enzimática se refuerza asimismo la actividad enzimática. Los ORFs, los genes o las construcciones artificiales de genes pueden presentarse o bien en plásmidos con diferentes números de copias, o se pueden integrar en un cromosoma y amplificar. Alternativamente, se puede conseguir además una sobreexpresión de los correspondientes genes mediante una modificación de la composición de los medios y mediante la realización de la cultivación.

Unos métodos para la sobreexpresión se han descrito suficientemente dentro del estado de la técnica - por ejemplo en la cita de Makrides y colaboradores (Microbiological Reviews 60 (3), 512-538 (1996)) -. Mediante utilización de vectores



se aumenta el número de copias en por lo menos una (1) copia. Como vectores se pueden utilizar unos plásmidos tales como los que por ejemplo se han descrito en el documento US 5.538.873. Como vectores se pueden utilizar asimismo unos fagos, por ejemplo, el fago Mu, tal como se describe en el documento EP 0.332.448, o el fago lambda ( $\lambda$ ). Un aumento del número de copias se puede conseguir también incorporando una copia adicional en otro sitio del cromosoma - por ejemplo, en el sitio att del fago  $\lambda$  (Yu y Court, Gene 223, 77-81 (1998)) -. En el documento US 5.939.307 se describe que, mediante incorporación de casetes de expresión o de promotores tales como, por ejemplo, el promotor tac, el promotor trp, el promotor lpp o el promotor P<sub>L</sub> y el promotor P<sub>R</sub> del fago  $\lambda$ , se pudo conseguir un aumento de la expresión, por ejemplo secuencia arriba del operón cromosómico de la treonina. De igual manera, se pueden utilizar los promotores del fago T7, los promotores de gear box (caja de engranajes) o el promotor nar. Tales casetes de expresión o promotores se pueden utilizar también, tal como se describe en el documento EP 0 593 792, para sobreexpresar unos genes unidos a plásmidos. Mediante utilización del alelo lacI<sup>Q</sup> se puede controlar, por su parte, la expresión de genes unidos a plásmidos (Glascocock y Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)). Además, es posible aumentar la actividad de los promotores mediante una modificación de su secuencia por medio de uno o varios intercambios de nucleótidos, mediante una(s) inserción/ones y/o supresión/ones. Otra expresión génica cronológica se puede conseguir por ejemplo tal como se describe en la cita de Walker y colaboradores (Journal of Bacteriology 181: 1269-80 (1999)) mediante la utilización del promotor fis dependiente de las fases de crecimiento. La velocidad de la elongación es influida por la utilización de los codones, mediante el uso de codones para unos ARN-ts que están frecuentemente presentes en la cepa parental (en inglés "parent strain") se puede reforzar la expresión génica.

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

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

Así, por ejemplo, para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-treonina, se pueden reforzar, en particular sobreexpresar, simultáneamente uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de

- por lo menos un gen del operón thrABC, que codifica la aspartato cinasa, la homoserina deshidrogenasa, la homoserina cinasa y la treonina sintasa (documento US-A-4.278.765),
- el gen pyc, que codifica la piruvato carboxilasa, de Corynebacterium glutamicum (documento WO 99/18228),
- el gen pps, que codifica la fosfoenolpiruvato sintasa (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),
- el gen ppc, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa (documento WO 02/064808),
- los genes pntA y pntB, que codifican las subunidades de la transhidrogenasa (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),
- el gen rhtC, que codifica la proteína que media en la resistencia frente a treonina (documento EP-A-1 013 765),
- el gen thrE, que codifica la proteína de vehículo y exportación de treonina, de Corynebacterium glutamicum (documento WO 01/92545),
- el gen gdhA, que codifica la glutamato deshidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- el gen ptsH del operón ptsHlcr, que codifica la fosfohistidina proteína hexosa fosfotransferasa del sistema PTS de la fosfotransferasa (documento WO 03/004674),
- el gen ptsI del operón ptsHlcr, que codifica la enzima I del sistema PTS de la fosfotransferasa (documento WO 03/004674),

- el gen *crr* del operón *ptsH/crr*, que codifica el componente IIA, específico para glucosa, del sistema PTS de la fosfotransferasa (documento WO 03/004674),
- 5 • el gen *ptsG*, que codifica el componente IIBC, específico para glucosa (documento WO 03/004670),
- el gen *cysK*, que codifica la cisteína sintasa A (documento WO 03/006666),
- 10 • el gen *cysB*, que codifica el regulador del regulón de *cys* (WO 03/006666),
- el gen *cysJ* del operón *cysJIH*, que codifica la flavoproteína de la NADPH sulfito reductasa (documento WO 03/006666),
- 15 • el gen *cysI* del operón *cysJIH*, que codifica la hemoproteína de la NADPH sulfito reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen *cysH* del operón *cysJIH*, que codifica la adenililsulfato reductasa (documento WO 03/006666),
- 20 • 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 de dihidrolipoil transsuccinasa E2 de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa (documento WO 03/008614),
- 25 • el gen *sucC* del operón *sucABCD*, que codifica la subunidad  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- el gen *sucD* del operón *sucABCD*, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- 30 • el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yibD* de *Escherichia coli* (número de acceso AE000439 del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU), documento DE102004005836.9).
- 35 Por lo demás, por ejemplo, para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-triptófano, simultáneamente se pueden reforzar, en particular sobreexpresar, uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de
- 40 • por lo menos un gen del operón de triptófano, que codifica la antranilato sintasa, la antranilato fosforribosil transferasa, la fosforribosil antranilato isomerasa, la indol-3-glicerofosfato sintasa y la triptófano sintasa (Applied and Environmental Microbiology 38(2) : 181-190 (1979)),
- el gen *serA*, que codifica la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (documento WO 87/01130),
- 45 • el gen *serB*, que codifica la fosfoserina fosfatasa (documento WO 87/01130)
- el gen *serC*, que codifica la fosfoserina amino transferasa (documento WO 87/01130)
- 50 • el gen *aroF*, que codifica la DHAP sintasa sensible frente a L-tirosina (documentos WO 87/01130; EP 1270721)
- el gen *aroG*, que codifica la DHAP sintasa sensible frente a L-fenilalanina (documentos WO 87/01130; EP 1270721)
- 55 • el gen *aroH*, que codifica la DHAP sintasa sensible frente a L-triptófano (documentos WO 87/01130; EP 1270721)
- el gen *pps*, que codifica la fosfoenolpiruvato sintasa (documento WO 96/08567)
- el gen *pckA*, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxicinasa (documento WO 2004/090125),
- 60 • el gen *tktA*, que codifica la transcetolasa A (documento US 5.168.056),
- el gen *tktB*, que codifica la transcetolasa B (documento US 5.168.056),

- el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yddG de *Escherichia coli* (número de acceso NC000913 (región 1544312-1545193) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU), documento EP 1449918).

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

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

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

- el gen *tnaA*, que codifica la triptofanasa (documento US 4.371.614),
- 40 • el gen *trpR*, que codifica el represor del operón *trp* (documento US 4.371.614),
- el gen *tyrA*, que codifica la corismato mutasa T y la pterinato deshidrogenasa (documento US 4.371.614),
- 45 • el gen *pheA*, que codifica la corismato mutasa P y la pterinato deshidrogenasa (documento US 4.371.614),
- el gen *mtr*, que codifica la proteína de transporte específica para triptófano (documento US 5.756.345),
- 50 • el gen *tnaB*, que codifica la triptófano permeasa (documento US 5.756.345),
- el gen *aroP*, que codifica la proteína transportadora para aminoácidos aromáticos (documento US 5.756.345),
- el gen *sdaA*, que codifica la L-serina desaminasa (documento EP 0149539),
- 55 • el gen *pgi*, que codifica la glucosa-6-fosfato-isomerasa (documento WO 87/01130),
- el gen *tyrB*, que codifica la tirosina aminotransferasa (documento WO 87/01130).

60 Además, para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-treonina y L-triptófano, adicionalmente al debilitamiento del gen *glpR*, puede ser ventajoso desconectar reacciones secundarias indeseadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms" [Crianza de microorganismos que producen aminoácidos] en: Overproduction of Microbial Products [Sobreproducción de productos microbianos], Krumphanzl, Sikyta, Vanek (coordinadores de edición), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

El rendimiento de las bacterias aisladas o respectivamente del proceso de fermentación mediante utilización de las mismas en lo que respecta a uno o varios de los parámetros escogidos entre el conjunto que se compone de la concentración del producto (producto por volumen), del rendimiento de producto (producto formado por fuente consumida de carbono) y de la formación del producto (producto formado por volumen y tiempo) o también de otros parámetros del proceso y de unas combinaciones de éstos, es mejorado en por lo menos un 0,5 %, por lo menos un 1 %, por lo menos un 1,5 % o por lo menos un 2 %, referido al microorganismo no recombinante o a la cepa parental o respectivamente al proceso de fermentación mediante utilización de los mismos.

Los microorganismos producidos conforme al invento se pueden cultivar en el procedimiento batch (= discontinuo) (cultivación por tandas), en el procedimiento fed batch (procedimiento de afluencia) o en el procedimiento fed batch repeated (procedimiento de afluencia repetida) o en un procedimiento continuo (documentos DE 10200402859.3 o US 5.763.230). Una recopilación acerca de métodos conocidos de cultivación se describe en el libro de texto de Chemiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocesos 1, introducción en la técnica de los bioprocesos] (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

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

Como fuente de carbono se emplea glicerol. Éste se puede utilizar individualmente o como una mezcla. Se pueden añadir azúcares e hidratos de carbono, tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidones y eventualmente celulosas, aceites y grasas, tales como p.ej. aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, tales como p.ej. ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como p.ej. etanol y metanol, y ácidos orgánicos tales como p.ej. ácido acético, debiendo ser la proporción del glicerol por lo menos igual a o mayor que ( $\geq$ ) 50 % o por lo menos  $\geq$  75 % o por lo menos  $\geq$  90 %, por lo menos  $\geq$  95 %, de manera preferida de 100 % en peso.

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

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

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

A partir del caldo de cultivo extraído, la L-treonina o el L-triptófano se pueden obtener, recolectar o concentrar, y eventualmente purificar. Unos métodos típicos para la purificación de los L-aminoácidos son la cromatografía de intercambio de iones y la cristalización. De esta manera se obtienen unos L-aminoácidos ampliamente puros.

Asimismo, es posible producir un producto a partir del caldo de cultivo extraído (= caldo de fermentación), mediante el recurso de que la biomasa de la bacteria, que está contenida en el caldo de cultivo, sea eliminada totalmente (en un 100 %) o casi totalmente, es decir que se elimine más de un (>) 90 %, >95 %, >97 %, >99 % y que los componentes restantes del caldo de fermentación sean dejados ampliamente en el producto, es decir en un 30 % - 100 %, 40 % -

100 %, 50 % - 100 %, 60 % - 100 %, 70 % - 100 %, 80 % - 100 %, o 90 % - 100 %, de manera preferida en una proporción igual a o mayor que ( $\geq$ ) 50 %,  $\geq$  60 %,  $\geq$  70 %,  $\geq$  80 %  $\geq$  90 % o  $\geq$ 95 % o también totalmente (en un 100 %).

5 Para la eliminación o separación de la biomasa se emplean ciertos métodos de separación, tales como, por ejemplo, los de centrifugación, filtración, decantación, floculación, o una combinación de éstos.

10 El caldo obtenido se espesa o respectivamente se concentra a continuación con unos métodos conocidos tales como, por ejemplo, con ayuda de un evaporador rotatorio, un evaporador de capa fina, un evaporador con película descendente, mediante una osmosis inversa, mediante una nanofiltración o por una combinación de éstos/as.

15 Este caldo concentrado se elabora a continuación mediante unos métodos de liofilización, desecación por atomización, granulación por atomización o mediante procedimientos de otros tipos para dar un polvo finamente dividido que es de manera preferida capaz de corrimiento. Este polvo finamente dividido, capaz de corrimiento, se puede transformar por su parte mediante unos adecuados procedimientos de compactación o granulación en un producto de granos gruesos, bien capaz de corrimiento, almacenable y ampliamente exento de polvo. El agua se elimina en este caso en total en más de un 90 %, de tal manera que el contenido de agua en el producto sea menor que 10 %, menor que 5 % o menor que 3 %.

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

25

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Degussa AG

5 <120> Procedimiento para la producción de L-aminoácidos mediante utilización de cepas mejoradas de la familia de las enterobacteriáceas

<130> 050067 BT

10 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 759

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<220>

20 <221> CDS

<222> (1) .. (759)

<223> zona codificadora de glpR

<400> 1

atg aaa caa aca caa cgt cac aac ggt att atc gaa ctg gtt aaa cag 48  
Met Lys Gln Thr Gln Arg His Asn Gly Ile Ile Glu Leu Val Lys Gln  
1 5 10 15

cag ggt tat gtc agt acc gaa gag ctg gta gag cat ttc tcc gtc agc 96  
Gln Gly Tyr Val Ser Thr Glu Glu Leu Val Glu His Phe Ser Val Ser  
20 25 30

ccg cag act att cgc cgc gac ctc aat gag ctg gcg gag caa aac ctg 144  
Pro Gln Thr Ile Arg Arg Asp Leu Asn Glu Leu Ala Glu Gln Asn Leu  
35 40 45

atc ctg cgc cat cat ggc ggt gcg gcg ctg cct tcc agt tcg gtt aac 192  
Ile Leu Arg His His Gly Gly Ala Ala Leu Pro Ser Ser Val Asn  
50 55 60

acg ccg tgg cac gat cgc aag gcc acc cag acc gaa gaa aaa gag cgc 240  
Thr Pro Trp His Asp Arg Lys Ala Thr Gln Thr Glu Glu Lys Glu Arg  
65 70 75 80

atc gcc cgc aaa gtg gcg gag caa atc ccc aat ggc tcg acg ctg ttt 288  
Ile Ala Arg Lys Val Ala Glu Gln Ile Pro Asn Gly Ser Thr Leu Phe  
85 90 95

atc gat atc ggc acc acg ccg gaa gcg gta gcg cac gca ctg ctc aat 336  
Ile Asp Ile Gly Thr Thr Pro Glu Ala Val Ala His Ala Leu Leu Asn  
100 105 110

cac agc aat ttg cgc att gtc acc aac aat ctc aac gtt gct aac acg 384  
His Ser Asn Leu Arg Ile Val Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Asn Thr  
115 120 125

ttg atg gta aaa gaa gat ttt cgc atc att ctc gcc ggt ggc gaa tta 432  
Leu Met Val Lys Glu Asp Phe Arg Ile Ile Leu Ala Gly Gly Glu Leu  
130 135 140

cgc agc cgc gat ggc ggg atc att ggc gaa gcg acg ctc gat ttt atc 480  
Arg Ser Arg Asp Gly Gly Ile Ile Gly Glu Ala Thr Leu Asp Phe Ile  
145 150 155 160

tcc cag ttc cgc ctt gat ttc ggc att ctg ggg ata agc ggc atc gat 528

25

ES 2 428 367 T3

Ser Gln Phe Arg Leu Asp Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ser Gly Ile Asp  
 165 170 175

agc gac ggc tgc ctg ctg gag ttc gat tac cac gaa gtt cgc acc aaa 576  
 Ser Asp Gly Ser Leu Leu Glu Phe Asp Tyr His Glu Val Arg Thr Lys  
 180 185 190

cgc gcc att att gag aac tgc cgc cac gtt atg ctg gtt gtc gat cac 624  
 Arg Ala Ile Ile Glu Asn Ser Arg His Val Met Leu Val Val Asp His  
 195 200 205

tgc aaa ttt ggc cgt aac gcg atg gtc aat atg ggc agc atc agc atg 672  
 Ser Lys Phe Gly Arg Asn Ala Met Val Asn Met Gly Ser Ile Ser Met  
 210 215 220

gta gat gcc gtc tac acc gac gcc ccg ccg cca gta agc gtg atg cag 720  
 Val Asp Ala Val Tyr Thr Asp Ala Pro Pro Val Ser Val Met Gln  
 225 230 235 240

gtg ctg acg gac cac cat att caa ctg gag ctg tgc tga 759  
 Val Leu Thr Asp His His Ile Gln Leu Glu Leu Cys  
 245 250

<210> 2  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

5

<400> 2  
 Met Lys Gln Thr Gln Arg His Asn Gly Ile Ile Glu Leu Val Lys Gln  
 1 5 10 15

Gln Gly Tyr Val Ser Thr Glu Glu Leu Val Glu His Phe Ser Val Ser  
 20 25 30

Pro Gln Thr Ile Arg Arg Asp Leu Asn Glu Leu Ala Glu Gln Asn Leu  
 35 40 45

Ile Leu Arg His His Gly Gly Ala Ala Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn  
 50 55 60

Thr Pro Trp His Asp Arg Lys Ala Thr Gln Thr Glu Glu Lys Glu Arg  
 65 70 75 80

Ile Ala Arg Lys Val Ala Glu Gln Ile Pro Asn Gly Ser Thr Leu Phe  
 85 90 95

Ile Asp Ile Gly Thr Thr Pro Glu Ala Val Ala His Ala Leu Leu Asn  
 100 105 110

His Ser Asn Leu Arg Ile Val Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Asn Thr  
 115 120 125

Leu Met Val Lys Glu Asp Phe Arg Ile Ile Leu Ala Gly Gly Glu Leu  
 130 135 140

ES 2 428 367 T3

Arg Ser Arg Asp Gly Gly Ile Ile Gly Glu Ala Thr Leu Asp Phe Ile  
145 150 155 160

Ser Gln Phe Arg Leu Asp Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ser Gly Ile Asp  
165 170 175

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

Arg Ala Ile Ile Glu Asn Ser Arg His Val Met Leu Val Val Asp His  
195 200 205

Ser Lys Phe Gly Arg Asn Ala Met Val Asn Met Gly Ser Ile Ser Met  
210 215 220

Val Asp Ala Val Tyr Thr Asp Ala Pro Pro Pro Val Ser Val Met Gln  
225 230 235 240

Val Leu Thr Asp His His Ile Gln Leu Glu Leu Cys  
245 250

<210> 3

<211> 759

<212> ADN

5 <213> Salmonella typhimurium

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (759)

10 <223> zona codificadora de glpR

<400> 3

atg aaa caa aca caa cgg cat gac gcg atc att gaa ctg gta aaa aaa 48  
Met Lys Gln Thr Gln Arg His Asp Ala Ile Ile Glu Leu Val Lys Lys  
1 5 10 15

cag ggg tac gtc agt acg gaa gag ctg gtg gag cat ttt tct gtc agc 96  
Gln Gly Tyr Val Ser Thr Glu Glu Leu Val Glu His Phe Ser Val Ser  
20 25 30

ccg caa acc att cgt cgg gat ctt aac gat ctg gcg gaa cag aat atg 144  
Pro Gln Thr Ile Arg Arg Asp Leu Asn Asp Leu Ala Glu Gln Asn Met  
35 40 45

att ttg cgc cac cac ggc ggc gcg gcg ttg ccc tcc agc tcg gtg aac 192  
Ile Leu Arg His His Gly Gly Ala Ala Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn  
50 55 60

acg ccg tgg cac gat cgt aag gcg acg caa acg gaa gaa aaa gag cgc 240  
Thr Pro Trp His Asp Arg Lys Ala Thr Gln Thr Glu Glu Lys Glu Arg  
65 70 75 80

atc gct cgc aaa gtc gcg gcc cag atc ccc aat ggt tca acg ctg ttt 288  
Ile Ala Arg Lys Val Ala Ala Gln Ile Pro Asn Gly Ser Thr Leu Phe  
85 90 95

att gat atc ggc acg acg ccg gaa gcc gta gcg cac gcc ctg tta ggg 336



ES 2 428 367 T3

Ile Asp Ile Gly Thr Thr Pro Glu Ala Val Ala His Ala Leu Leu Gly  
 100 105 110

cac agt aat ttg cgg atc gtg acc aac aat ttg aac gta gcg aac acg 384  
 His Ser Asn Leu Arg Ile Val Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Asn Thr  
 115 120 125

cta atg gcg aaa gag gat ttt cgt att atc ctc gcc gcc ggt gaa ctc 432  
 Leu Met Ala Lys Glu Asp Phe Arg Ile Ile Leu Ala Gly Gly Glu Leu  
 130 135 140

cgt agc cgc gac gcc gcc att att gcc gaa gcg acg cag gac ttt atc 480  
 Arg Ser Arg Asp Gly Glu Ile Ile Gly Glu Ala Thr Gln Asp Phe Ile  
 145 150 155 160

gcc cag ttc cgt ctc gat ttc gcc att ctc ggt att agc ggt att gat 528  
 Ala Gln Phe Arg Leu Asp Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ser Gly Ile Asp  
 165 170 175

agc gac gcc tcg ttg ctg gaa ttt gac tac cat gag gta cgc acc aag 576  
 Ser Asp Gly Ser Leu Leu Glu Phe Asp Tyr His Glu Val Arg Thr Lys  
 180 185 190

cgc gcg att atc gaa aat tcg cgc cac gtg atg ctg gtg gtg gat cac 624  
 Arg Ala Ile Ile Glu Asn Ser Arg His Val Met Leu Val Val Asp His  
 195 200 205

tct aaa ttt gcc cgt aac gcg atg gta aac atg gcc agc att agt atg 672  
 Ser Lys Phe Gly Arg Asn Ala Met Val Asn Met Gly Ser Ile Ser Met  
 210 215 220

gtc gat gcg gtc tac acc gat acc ctg ccg ccg ccg gcc gtg atg cag 720  
 Val Asp Ala Val Tyr Thr Asp Thr Leu Pro Pro Pro Gly Val Met Gln  
 225 230 235 240

gtg ttg acg gag aac cat att caa ctg gag ctg tgt taa 759  
 Val Leu Thr Glu Asn His Ile Gln Leu Glu Leu Cys  
 245 250

<210> 4

<211> 252

<212> PRT

<213> Salmonella typhimurium

5

<400> 4

Met Lys Gln Thr Gln Arg His Asp Ala Ile Ile Glu Leu Val Lys Lys  
 1 5 10 15

Gln Gly Tyr Val Ser Thr Glu Glu Leu Val Glu His Phe Ser Val Ser  
 20 25 30

Pro Gln Thr Ile Arg Arg Asp Leu Asn Asp Leu Ala Glu Gln Asn Met  
 35 40 45

Ile Leu Arg His His Gly Gly Ala Ala Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn  
 50 55 60

Thr Pro Trp His Asp Arg Lys Ala Thr Gln Thr Glu Glu Lys Glu Arg  
 65 70 75 80

ES 2 428 367 T3

Ile Ala Arg Lys Val Ala Ala Gln Ile Pro Asn Gly Ser Thr Leu Phe  
85 90 95

Ile Asp Ile Gly Thr Thr Pro Glu Ala Val Ala His Ala Leu Leu Gly  
100 105 110

His Ser Asn Leu Arg Ile Val Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Asn Thr  
115 120 125

Leu Met Ala Lys Glu Asp Phe Arg Ile Ile Leu Ala Gly Gly Glu Leu  
130 135 140

Arg Ser Arg Asp Gly Gly Ile Ile Gly Glu Ala Thr Gln Asp Phe Ile  
145 150 155 160

Ala Gln Phe Arg Leu Asp Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ser Gly Ile Asp  
165 170 175

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

Arg Ala Ile Ile Glu Asn Ser Arg His Val Met Leu Val Val Asp His  
195 200 205

Ser Lys Phe Gly Arg Asn Ala Met Val Asn Met Gly Ser Ile Ser Met  
210 215 220

Val Asp Ala Val Tyr Thr Asp Thr Leu Pro Pro Pro Gly Val Met Gln  
225 230 235 240

Val Leu Thr Glu Asn His Ile Gln Leu Glu Leu Cys  
245 250

<210> 5

<211> 759

<212> ADN

5 <213> Shigella flexneri

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (759)

10 <223> zona codificadora de glpR

<400> 5

atg aaa caa aca caa cgt cac aac ggt att atc gaa ctg gtt aaa cag 48  
Met Lys Gln Thr Gln Arg His Asn Gly Ile Ile Glu Leu Val Lys Gln  
1 5 10 15

cag ggt tat gtc agt acc gag gaa ctg gtg gag cac ttc tcc gtc agc 96  
Gln Gly Tyr Val Ser Thr Glu Glu Leu Val Glu His Phe Ser Val Ser  
20 25 30

ccg cag act att cgc cgc gac ctc aac gag ctg gca gag caa aac ctg 144

ES 2 428 367 T3

Pro Gln Thr Ile Arg Arg Asp Leu Asn Glu Leu Ala Glu Gln Asn Leu  
 35 40 45

atc ctg cgc cat cat ggc ggc gcg gcg ctg cct tcc agt tcg gtt aac 192  
 Ile Leu Arg His His Gly Gly Ala Ala Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn  
 50 55 60

acg ccg tgg cac gat cgt aaa gcc acc cag acc gaa gaa aaa gag cgc 240  
 Thr Pro Trp His Asp Arg Lys Ala Thr Gln Thr Glu Glu Lys Glu Arg  
 65 70 75 80

atc gcc cgc aaa gtg gcg gag caa atc ccc aat ggc tcg acg ctg ttt 288  
 Ile Ala Arg Lys Val Ala Glu Gln Ile Pro Asn Gly Ser Thr Leu Phe  
 85 90 95

atc gat atc ggc acc acg ccg gaa gcg gtg gcg cac gcg ctg ctc aat 336  
 Ile Asp Ile Gly Thr Thr Pro Glu Ala Val Ala His Ala Leu Leu Asn  
 100 105 110

cac agc aat ttg cgc att gtc acc aac aat ctc aac gtt gct aac acg 384  
 His Ser Asn Leu Arg Ile Val Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Asn Thr  
 115 120 125

ttg atg gta aaa gaa gat ttc cgc att att ctc gcc ggt ggc gaa tta 432  
 Leu Met Val Lys Glu Asp Phe Arg Ile Ile Leu Ala Gly Gly Glu Leu  
 130 135 140

cgt agc cgc gat ggc ggg atc att ggc gaa gcg acg ctc gat ttt atc 480  
 Arg Ser Arg Asp Gly Gly Ile Ile Gly Glu Ala Thr Leu Asp Phe Ile  
 145 150 155 160

tcc cag ttc cgc ctt gat ttc ggc att ctg ggg atc agc ggc atc gac 528  
 Ser Gln Phe Arg Leu Asp Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ser Gly Ile Asp  
 165 170 175

agc gac ggc tcg ctg ctg gag ttc gat tac cac gaa gtt cgt acc aag 576  
 Ser Asp Gly Ser Leu Leu Glu Phe Asp Tyr His Glu Val Arg Thr Lys  
 180 185 190

cgc gcc att att gag aac tcg cgc cac gtt atg ctg gtg gtt gac cat 624  
 Arg Ala Ile Ile Glu Asn Ser Arg His Val Met Leu Val Val Asp His  
 195 200 205

tca aaa ttt ggc cgt aat gcg atg gtc aat atg ggg agc atc agc atg 672  
 Ser Lys Phe Gly Arg Asn Ala Met Val Asn Met Gly Ser Ile Ser Met  
 210 215 220

gtt gat gcc gtc tac acc gac gcc ccg ccg cca gta agc gtg atg cag 720  
 Val Asp Ala Val Tyr Thr Asp Ala Pro Pro Pro Val Ser Val Met Gln  
 225 230 235 240

gtg ctg acg gac cac cat att caa ctg gag ctg tgc tga 759  
 Val Leu Thr Asp His His Ile Gln Leu Glu Leu Cys  
 245 250

<210> 6  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Shigella flexneri

5

<400> 6  
 Met Lys Gln Thr Gln Arg His Asn Gly Ile Ile Glu Leu Val Lys Gln  
 1 5 10 15

ES 2 428 367 T3

Gln Gly Tyr Val Ser Thr Glu Glu Leu Val Glu His Phe Ser Val Ser  
 20 25 30

Pro Gln Thr Ile Arg Arg Asp Leu Asn Glu Leu Ala Glu Gln Asn Leu  
 35 40 45

Ile Leu Arg His His Gly Gly Ala Ala Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn  
 50 55 60

Thr Pro Trp His Asp Arg Lys Ala Thr Gln Thr Glu Glu Lys Glu Arg  
 65 70 75 80

Ile Ala Arg Lys Val Ala Glu Gln Ile Pro Asn Gly Ser Thr Leu Phe  
 85 90 95

Ile Asp Ile Gly Thr Thr Pro Glu Ala Val Ala His Ala Leu Leu Asn  
 100 105 110

His Ser Asn Leu Arg Ile Val Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Asn Thr  
 115 120 125

Leu Met Val Lys Glu Asp Phe Arg Ile Ile Leu Ala Gly Gly Glu Leu  
 130 135 140

Arg Ser Arg Asp Gly Gly Ile Ile Gly Glu Ala Thr Leu Asp Phe Ile  
 145 150 155 160

Ser Gln Phe Arg Leu Asp Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ser Gly Ile Asp  
 165 170 175

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

Arg Ala Ile Ile Glu Asn Ser Arg His Val Met Leu Val Val Asp His  
 195 200 205

Ser Lys Phe Gly Arg Asn Ala Met Val Asn Met Gly Ser Ile Ser Met  
 210 215 220

Val Asp Ala Val Tyr Thr Asp Ala Pro Pro Pro Val Ser Val Met Gln  
 225 230 235 240

Val Leu Thr Asp His His Ile Gln Leu Glu Leu Cys  
 245 250

<210> 7

<211> 759

<212> ADN

5 <213> Erwinia carotovora

ES 2 428 367 T3

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (759)  
 <223> zona codificadora de glpR

5

<400> 7  
 gtg aag cag aca caa cgg cat gac gcc att att gaa ctg gtg cgt cgg 48  
 Met Lys Gln Thr Gln Arg His Asp Ala Ile Ile Glu Leu Val Arg Arg  
 1 5 10 15  
 cag ggg tat gtc agt act gaa gaa ctg gtg gat cat ttt gcg gtg agc 96  
 Gln Gly Tyr Val Ser Thr Glu Glu Leu Val Asp His Phe Ala Val Ser  
 20 25 30  
 ccg cag acc atc cgt cgc gat ctg aac gat ctg gct gaa cag aat aaa 144  
 Pro Gln Thr Ile Arg Arg Asp Leu Asn Asp Leu Ala Glu Gln Asn Lys  
 35 40 45  
 atc cat cgt cac cac ggt ggt gcg gct ttg ccg tcc agt tca gtt aac 192  
 Ile His Arg His His Gly Gly Ala Ala Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn  
 50 55 60  
 acg gct tat cat gac cgt aaa atg atg tgg tcg gat gaa aaa gcg cgc 240  
 Thr Ala Tyr His Asp Arg Lys Met Met Trp Ser Asp Glu Lys Ala Arg  
 65 70 75 80  
 att gcc cgt cgg gtg gcg agc cag att cca gac ggg gct acc ttg ttt 288  
 Ile Ala Arg Arg Val Ala Ser Gln Ile Pro Asp Gly Ala Thr Leu Phe  
 85 90 95  
 atc gac atc ggc acc acg ccc gaa gcg gtg gcc tat gcg ctg atg cag 336  
 Ile Asp Ile Gly Thr Thr Pro Glu Ala Val Ala Tyr Ala Leu Met Gln  
 100 105 110  
 cat aag gat ctg cgt gtg gtc acc aat aac ctg aat gtg gca aca ctg 384  
 His Lys Asp Leu Arg Val Val Thr Asn Asn Leu Asn Val Ala Thr Leu  
 115 120 125  
 ctg act gca aaa gag gat ttt cgc ctg att ttg gct ggt ggc gaa gtg 432  
 Leu Thr Ala Lys Glu Asp Phe Arg Leu Ile Leu Ala Gly Gly Glu Val  
 130 135 140  
 cgg acc cgc gat ggc ggt att atg ggg gag gcg acg ctc gat ttt atc 480  
 Arg Thr Arg Asp Gly Gly Ile Met Gly Glu Ala Thr Leu Asp Phe Ile  
 145 150 155 160  
 tct cag ttc cgt ctg gat ttc ggc att ttg ggc atc agc ggt att gac 528  
 Ser Gln Phe Arg Leu Asp Phe Gly Ile Leu Gly Ile Ser Gly Ile Asp  
 165 170 175  
 atg gat ggg tca tta ctg gag ttt gat tac cat gaa gtg cgt aca aaa 576  
 Met Asp Gly Ser Leu Leu Glu Phe Asp Tyr His Glu Val Arg Thr Lys  
 180 185 190  
 cgg gcg att att gaa aat tct cgc tgc gtc atg ctg gtg aca gat cat 624  
 Arg Ala Ile Ile Glu Asn Ser Arg Cys Val Met Leu Val Thr Asp His  
 195 200 205  
 tcc aag ttc ggc cgc aat gcg atg gtg aat ttg ggt aac atg gat ttg 672  
 Ser Lys Phe Gly Arg Asn Ala Met Val Asn Leu Gly Asn Met Asp Leu  
 210 215 220  
 atc gac tat ctt ttt acc gac cag tca cca cca ccc agc gta ctg aaa 720  
 Ile Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Gln Ser Pro Pro Pro Ser Val Leu Lys  
 225 230 235 240



ES 2 428 367 T3

210

215

220

Ile Asp Tyr Leu Phe Thr Asp Gln Ser Pro Pro Pro Ser Val Leu Lys  
225 230 235 240

Ile Ile Glu Gln His Lys Val Gln Leu Glu Leu Cys  
245 250

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de L-aminoácidos, caracterizado por que se llevan a cabo las siguientes etapas:
- 5 a) Fermentación de los microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, que producen el L-aminoácido deseado, en los que se debilita, en particular se desconecta, el gen *glpR* o a la secuencia de nucleótidos que lo codifica, en un medio que contiene glicerol y
- b) enriquecimiento del L-aminoácido deseado en el medio o en las células de los microorganismos.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que se aísla el L-aminoácido deseado, realizándose que eventualmente quedan en el producto unos componentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o en ciertas proporciones (desde > 0 hasta 100 %) de éstos.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para la producción de L-aminoácidos, en particular de L-treonina y L-triptófano, o unos aditivos para piensos que contienen estos compuestos, mediante la fermentación de unos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, caracterizado por que en éstos se debilita, en particular se desconecta, el gen *glpR* o las secuencias de nucleótidos que lo codifican, y se aísla el producto deseado.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3, caracterizado por que se emplean unos microorganismos, en los cuales se disminuye la actividad o la concentración del producto génico de *glpR* a un 0 hasta 75 % de la actividad o la concentración de la proteína de tipo silvestre o en la cepa parental.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, o 3, caracterizado por que se debilita, en particular se desconecta, la expresión del polinucleótido, que codifica el producto del gen *glpR*.
6. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3, caracterizado por que se disminuyen las propiedades reguladoras y/o catalíticas del polipéptido (la proteína enzimática), que codifica el polinucleótido del gen *glpR*.
- 30 7. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6, caracterizado por que para la producción de L-treonina se fermentan unos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, en los que se refuerza(n), en particular se sobreexpresa(n) adicionalmente, de manera simultánea, uno o varios genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de
- 35 7.1 por lo menos un gen del operón *thrABC*, que codifica la aspartato cinasa, la homoserina deshidrogenasa, la homoserina cinasa y la treonina sintasa,
- 7.2 el gen *pyc*, que codifica la piruvato carboxilasa, de *Corynebacterium glutamicum*,
- 40 7.3 el gen *pps*, que codifica la fosfoenolpiruvato sintasa,
- 7.4 el gen *ppc*, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa,
- 45 7.5 los genes *pntA* y *pntB*, que codifican las subunidades de la piridina transhidrogenasa,
- 7.6 el gen *rhtC*, que codifica la proteína que media en la resistencia frente a treonina,
- 7.7 el gen *thrE*, que codifica la proteína de vehículo y exportación de treonina, de *Corynebacterium glutamicum*,
- 50 7.8 el gen *gdhA*, que codifica la glutamato deshidrogenasa,
- 7.9 el gen *ptsH*, que codifica la fosfohistidina proteína hexosa fosfotransferasa,
- 7.10 el gen *ptsI*, que codifica la enzima I del sistema de la fosfotransferasa,
- 55 7.11 el gen *crr*, que codifica el componente IIA, específico para glucosa,
- 7.12 el gen *ptsG*, que codifica el componente IIBC, específico para glucosa,
- 60 7.13 el gen *cysK*, que codifica la cisteína sintasa A,
- 7.14 el gen *cysB*, que codifica el regulador del regulón de *cys*,
- 65 7.15 el gen *cysJ*, que codifica la flavoproteína de la NADPH sulfito reductasa,



- 7.16 el gen *cysI*, que codifica la hemoproteína de la NADPH sulfito reductasa,
- 7.17 el gen *cysH*, que codifica la adenililsulfato reductasa,
- 5 7.18 el gen *sucA*, que codifica la subunidad de descarboxilasa de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 7.19 el gen *sucB*, que codifica la subunidad de dihidrolipoil transsuccinasa E2 de la 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 7.20 el gen *sucC*, que codifica la subunidad  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa,
- 10 7.21 el gen *sucD*, que codifica la subunidad  $\alpha$  de la succinil-CoA sintetasa,
- 7.22 el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yibD* de *Escherichia coli*.
- 15 8. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6, caracterizado por que para la producción de L-triptófano se fermentan unos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, en los que se refuerza(n), en particular se sobreexpresan(n) adicionalmente, de manera simultánea, uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de:
- 20 8.1 por lo menos un gen del operón de triptófano, que codifica la antranilato sintasa, la antranilato fosforribosil transferasa, la fosforribosil antranilato isomerasa, la indol-3-glicerofosfato sintasa y la triptófano sintasa,
- 8.2 el gen *serA*, que codifica la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa,
- 25 8.3 el gen *serB*, que codifica la fosfoserina fosfatasa,
- 8.4 el gen *serC*, que codifica la fosfoserina amino transferasa,
- 8.5 el gen *aroF*, que codifica la DHAP sintasa sensible frente a L-tirosina,
- 30 8.6 el gen *aroG*, que codifica la DHAP sintasa sensible frente a L-fenilalanina,
- 8.7 el gen *aroH*, que codifica la DHAP sintasa sensible frente a L-triptófano,
- 35 8.8 el gen *pps*, que codifica la fosfoenolpiruvato sintasa,
- 8.9 el gen *pckA*, que codifica la fosfoenolpiruvato carboxinasa,
- 8.10 el gen *tktA*, que codifica la transcetolasa A,
- 40 8.11 el gen *tktB*, que codifica la transcetolasa B, y
- 8.12 el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yddG* de *Escherichia coli*.
- 45 9. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 7, caracterizado por que para la producción de L-treonina se fermentan unos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, en los cuales adicionalmente, de manera simultánea, se debilita(n), en particular se desconecta(n) o se disminuye la expresión de uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de:
- 50 9.1 el gen *tdh*, que codifica la treonina deshidrogenasa,
- 9.2 el gen *mdh*, que codifica la malato deshidrogenasa,
- 9.3 el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yjfA* de *Escherichia coli*,
- 55 9.4 el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *ytfP* de *Escherichia coli*,
- 9.5 el gen *pckA*, que codifica la enzima fosfoenolpiruvato carboxi cinasa,
- 60 9.6 el gen *poxB*, que codifica la piruvato oxidasa,
- 9.7 el gen *dgsA*, que codifica el regulador de DgsA del sistema de la fosfotransferasa,
- 9.8 el gen *fruR*, que codifica el represor de la fructosa,
- 65

- 9.9 el gen rpoS, que codifica el factor Sigma<sup>38</sup>, y
- 9.10 el gen aspA, que codifica la aspartato amonio liasa.
- 5 10. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6 u 8, caracterizado por que para la producción de L-triptófano se fermentan unos microorganismos de la familia de las enterobacteriáceas, en los cuales adicionalmente, de manera simultánea, se debilita(n), en particular se desconecta(n) o se disminuye la expresión de, uno o varios de los genes, que se escogen entre el conjunto que se compone de:
- 10 10.1 el gen tnaA, que codifica la triptofanasa,
- 10.2 el gen trpR, que codifica el represor del operón trp,
- 10.3 el gen tyrA, que codifica la corismato mutasa T y la prefenato deshidrogenasa,
- 15 10.4 el gen pheA, que codifica la corismato mutasa P y la prefenato deshidrogenasa,
- 10.5 el gen mtr, que codifica la proteína de transporte específica para el triptófano,
- 20 10.6 el gen tnaB, que codifica la triptófano permeasa,
- 10.7 el gen aroP, que codifica la proteína transportadora de aminoácidos aromáticos,
- 10.8 el gen sdaA, que codifica la L-serina desaminasa,
- 25 10.9 el gen pgi, que codifica la glucosa-6-fosfato-isomerasa, y
- 10.10 el gen tyrB, que codifica la tirosina aminotransferasa.
- 30 11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6, caracterizado por que se producen unos L-aminoácidos que se escogen entre el conjunto que se compone de L-asparagina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-arginina y L-homoserina.
- 35 12. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 hasta 6, caracterizado por que se producen unos L-aminoácidos que se escogen entre el conjunto que se compone de L-isoleucina, L-valina, L-metionina, L-homoserina y L-lisina.