

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 605**

51 Int. Cl.:

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2004 E 04739070 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015 EP 1611245**

54 Título: **Procedimiento para la producción de L-treonina, utilizando cepas de la familia Enterobacteriaceae que contienen un marco de lectura abierto yfiD y/o un gen pflB intensificado**

30 Prioridad:

09.04.2003 DE 10316109

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

10.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RIEPING, MECHTHILD y
FARWICK, MIKE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 553 605 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-treonina, utilizando cepas de la familia Enterobacteriaceae que contienen un marco de lectura abierto yfiD y/o un gen pflB intensificado

Campo de la Invención

- 5 Esta invención se refiere a un procedimiento para la producción fermentativa de L-treonina utilizando cepas de la familia Enterobacteriaceae, en el que se intensifica/intensifican el marco de lectura abierto (ORF) que tiene la designación yfiD y/o el gen pflB.

Antecedentes de la invención

- 10 L-aminoácidos, en particular L-treonina, encuentran aplicación en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y, de modo bastante especial, en la nutrición animal.

- 15 Es conocido que los L-aminoácidos se producen por fermentación de cepas de Enterobacteriaceae, en particular Escherichia coli (E. coli) y Serratia marcescens. Debido a su gran importancia, el trabajo para mejorar el procedimiento de producción está en constante progreso. Mejoras en el procedimiento pueden estar relacionados con medidas pertenecientes a la tecnología de la fermentación tal como, por ejemplo, la agitación y la provisión de oxígeno, o la composición de los medios nutrientes tales como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación, o el tratamiento a la forma de producto, mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, o propiedades de rendimiento intrínsecas del propio microorganismo.

- 20 Con vista a mejorar las propiedades de rendimiento de estos microorganismos, se adaptan 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 son auxotróficas con respecto a metabolitos de importancia reguladora y que producen L-aminoácidos tales como L-treonina, por ejemplo.

- 25 Durante un cierto número de años se han empleado también métodos de tecnología de ADN recombinante para la mejora de cepas de cepas productoras de L-aminoácidos de la familia Enterobacteriaceae, por amplificación de genes de la biosíntesis de aminoácidos individuales y por la investigación del efecto sobre la producción. Información recopilatoria sobre la biología celular y molecular de Escherichia coli y Salmonella se puede encontrar en Neidhardt (comp.): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2ª Edición, ASM Press, Washington, DC, EE.UU.,(1996).

Objeto de la invención

- 30 Los autores de la invención se han fijado la misión de producir nuevas medidas disponibles para la producción fermentativa mejorada de L-treonina.

Sumario de la Invención

- 35 La invención proporciona un procedimiento para la producción de L-treonina, utilizando microorganismos de la familia Enterobacteriaceae que ya producen L-treonina y en el que se intensifica/intensifican, en particular se sobre-expresa/sobre-expresan al menos el marco de lectura abierto yfiD y/o el gen pflB, o la o las secuencias de nucleótidos que codifican el producto génico.

Descripción Detallada de la Invención

Cuando se menciona L-treonina en lo que sigue, esto incluye su sal.

- 40 El término "intensificación" en este contexto describe el incremento en la actividad intracelular o concentración de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo que son codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo, aumentando el número de copias del gen o genes, o del ORF o los ORFs en al menos una (1) copia, utilizando un promotor potente o un gen o alelo que codifica una enzima o proteína correspondiente con una alta actividad y opcionalmente combinando estas medidas.

- 45 La expresión 'marco de lectura abierto' (ORF) designa un segmento de una secuencia de nucleótidos que codifica o puede codificar una proteína o, para ser más exactos, un polipéptido o ácido ribonucleico, al cual, de acuerdo con el estado de la técnica, no se le puede asignar función alguna. Después de asignar una función al segmento de la secuencia de nucleótidos en cuestión, se habla generalmente de un gen. El término 'alelos' se entiende

generalmente para dar a entender formas alternativas de un gen dado. Las formas se distinguen por diferencias en la secuencia de nucleótidos.

La expresión 'producto génico' designa, en general, la proteína codificada por una secuencia de nucleótidos, es decir, un ORF, un gen o un alelo, o el ácido ribonucleico codificado.

- 5 Mediante las medidas de intensificación, en particular la sobre-expresión, 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%, hasta un máximo de 1000 ó 2000% en relación con la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo inicial. La expresión 'microorganismo inicial' o 'cepa parental' se entiende que significa el microorganismo con respecto al cual se llevan a cabo las medidas de acuerdo con la invención.
- 10 La invención proporciona un procedimiento para la producción de L-treonina mediante fermentación de microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae, caracterizado por que
- 15 a) en los microorganismos que ya producen L-treonina se sobre-expresan el ORF yfiD y/o el gen pflB o las secuencias de nucleótidos que codifican los productos génicos, y dichos microorganismos se cultivan en un medio en condiciones en las que la L-treonina está enriquecida en el medio o en las células, y
- b) la L-treonina se aísla, con lo que opcionalmente constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o en porciones (> 0 a 100%) permanecen en el producto aislado o se separan por completo.

20 Los microorganismos, en particular, microorganismos recombinantes, que también se proporcionan por la presente invención, son capaces de producir L-aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidón en circunstancias apropiadas, celulosa en circunstancias apropiadas o a partir de glicerol y etanol. Microorganismos de este tipo son representantes de la familia Enterobacteriaceae, seleccionados de los géneros Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia. Se prefieren los géneros Escherichia y Serratia. En el caso del género Escherichia, en particular, se deben mencionar las especies Escherichia coli, y en el caso del género Serratia, en particular la especie Serratia marcescens.

En general, microorganismos recombinantes se generan mediante transformación, transducción o conjugación con un vector que porta el gen deseado.

Cepas adecuadas del género Escherichia, en particular, la especie Escherichia coli que, en particular, producen L-treonina, son, por ejemplo:

- 30 - Escherichia coli H4581 (documento EP 0 301 572)
 - Escherichia coli KY10935 (Bioscience Biotechnology
 and Biochemistry 61 (11): 1877-1882 (1997))
- Escherichia coli VNIIGenetika MG442 (documento US-A-4278.765)
- Escherichia coli VNIIGenetika M1 (documento US-A-4.321.325)
- 35 - Escherichia coli VNIIGenetika 472T23 (documento US-A-5.631.157)
- Escherichia coli BKIIM B-3996 (documento US-A-5.175.107)
- Escherichia coli kat 13 (documento WO 98/04715)
- Escherichia coli KCCM-10132 (documento WO 00/09660)

40 Cepas productoras de L-treonina adecuadas del género Serratia, en particular de la especie Serratia marcescens, son, por ejemplo:

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

45 Cepas productoras de L-treonina de la familia Enterobacteriaceae poseen preferiblemente, entre otras, una o más de las características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo que comprende: resistencia al ácido α -amino- β -

5 hidroxivalérico, resistencia a tialisina, resistencia a etionina, resistencia a α -metilserina, resistencia al ácido diaminosuccínico, resistencia al ácido α -aminobutírico, resistencia a borrelidina, resistencia al ácido ciclopentanocarboxílico, resistencia a rifampicina, resistencia a análogos de valina tales como hidroxamato de valina, resistencia a análogos de purina tales como, por ejemplo, 6-dimetilaminopurina, necesidad de L-metionina, en
 10 circunstancias apropiadas 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 refinado de treonina, resistencia a L-homoserina, resistencia a L-lisina, resistencia a L-metionina, resistencia al ácido L-glutámico, resistencia a L-aspartato, resistencia a L-leucina, resistencia a L-fenilalanina, resistencia a L-serina, resistencia a L-cisteína, resistencia a L-valina, sensibilidad a fluoropiruvato, treonina deshidrogenasa defectuosa, en
 15 circunstancias apropiadas, capacidad de utilizar sacarosa, intensificación del operón treonina, intensificación de homoserina deshidrogenasa l-aspartato quinasa I, preferiblemente de la forma resistente a la retroalimentación, intensificación de homoserina quinasa, intensificación de treonina sintasa, intensificación de aspartato quinasa, opcionalmente de la forma resistente a la retroalimentación, intensificación de la aspartato semialdehído deshidrogenasa, intensificación de fosfoenolpiruvato carboxilasa, opcionalmente de la forma resistente a la retroalimentación, intensificación de la fosfoenol piruvato sintasa, intensificación de transhidrogenasa, intensificación del producto génico RhtB, intensificación del producto génico RhtC, intensificación del producto génico YfiK, intensificación de una piruvato carboxilasa y atenuación de la formación de ácido acético.

20 Se ha encontrado que, después de la sobre-expresión del marco de lectura abierto yfiD y/o del gen pflB o de la o las secuencias que codifican los productos génicos correspondientes, los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae producen L-treonina de una manera mejorada.

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

25 El marco de lectura abierto yfiD y la proteína codificada por este ORF se describen, entre otros, por los siguientes datos:

30	Denominación:	marco de lectura abierto
	Función:	formiato acetiltransferasa putativo
	Descripción:	el marco de lectura abierto yfiD codifica una proteína de 14,3 kDa, el punto isoelectrico se sitúa en 5,1; localizado cromosómicamente, está situado, por ejemplo en el caso de Escherichia coli K12 MG1655, en la región intergénica del marco de lectura abierto yfiK que codifica una L-aspartato oxidasa putativa, y el gen ung que codifica uracil ADN glicosilasa
35	Referencia:	Blankenhorn et al.; Journal of Bacteriology 181 (7): 2209-2216 (1999) Fountoulakis et al.; Electrophoresis 20(11): 2181-2195 (1999) Kirkpatrick et al.; Journal of Bacteriology 183 (21): 6466-6477 (2001)
40		Wyborn et al.; Microbiology 148:1015-1026 (2002)
	Nº de Acceso:	AE000344

El gen pflB y la proteína codificada por este gen se describen, entre otros, por los siguientes datos:

45	Denominación:	formiato acetiltransferasa I, piruvato formiato liasa I
	EC Nº:	2.3.1.54
	Referencia:	Rodel et al.; European Journal of Biochemistry 177(1): 153-158 (1988), Wagner et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89 (3): 996-1000 (1992)
	Nº de Acceso:	AE000192
50	Nombre alternativo del gen:	pf1

La piruvato formiato liasa de Salmonella typhimurium se describe, entre otros, en la siguiente referencia: Wong et al.; Journal of Bacteriology 171(9): 4900-4905 (1989).

Las secuencias de ácidos nucleicos pueden recogerse de las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina (Bethesda, MD, EE.UU.), de la base de datos de

Secuencias de Nucleótidos de European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg, Alemania y Cambridge, Reino Unido) o de DNA Data Bank of Japan (DDBJ, Mishima, Japón).

Por motivos de una mejor claridad, la secuencia conocida referida al ORF yfiD se representa bajo SEQ ID NO. 3. La proteína codificada por este marco de lectura se representa como SEQ ID NO. 4.

5 Los marcos de lectura abiertos descritos en los pasajes especificados se pueden utilizar de acuerdo con la invención. Además de ello, se pueden utilizar alelos de los genes o marcos de lectura abiertos, que resultan de la degeneración del código genético o en virtud de mutaciones de sentido funcionalmente neutras. Se prefiere el uso de genes endógenos o de marcos de lectura abiertos endógenos.

10 La expresión 'genes endógenos' o 'secuencias de nucleótidos endógenas' se entiende que significa los genes o marcos de lectura abiertos o alelos o, para ser más exactos, secuencias de nucleótidos que están presentes en la población de una especie.

Alelos adecuados incluyen los que se pueden obtener mediante hibridación, en particular bajo condiciones rigurosas utilizando SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 7 o partes de las mismas, en particular, las regiones codificadoras o las secuencias complementarias a las mismas.

15 Instrucciones sobre la identificación de las secuencias de ADN por medio de hibridación se pueden encontrar por una persona experta en la técnica, entre otros, en el manual titulado "The DIG System Users Guide for Filter Hybridation", producido por Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar bajo condiciones rigurosas - es decir, sólo se forman híbridos en los que la sonda y la secuencia diana, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son al menos un 70% idénticos. Es conocido que la rigurosidad de la hibridación, incluidas las etapas de lavado, se ve influenciada o determinada al variar la composición del tampón, la temperatura y la concentración salina. La reacción de hibridación se lleva a cabo generalmente con una rigurosidad relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, Reino Unido, 1996).

25 Para la reacción de hibridación se puede emplear, por ejemplo, un tampón correspondiente a tampón 5x SSC a una temperatura de aproximadamente 50 °C - 68 °C. A este respecto, también se pueden hibridar sondas con polinucleótidos que exhiben menos de un 70% de identidad con la secuencia de la sonda. Híbridos de este tipo son menos estables y se separan mediante lavado bajo condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, reduciendo la concentración salina a 2x SSC y, opcionalmente, subsiguientemente a 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose a 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. Opcionalmente, es posible reducir la concentración salina a una concentración correspondiente a 0,2x SSC o a 0,1x SSC. Mediante el incremento escalonado de la temperatura de hibridación en pasos de aproximadamente 1 - 2 °C desde 50 °C a 68 °C, se pueden aislar fragmentos de polinucleótidos que, por ejemplo, poseen al menos un 70% o al menos un 80% o al menos un 90% a 95% o al menos un 96% a 99% de identidad con la secuencia de la sonda empleada. Instrucciones adicionales sobre la hibridación se pueden obtener en el comercio en forma de los denominados kits (p. ej. DIG Easy Hyb producido por Roche Diganostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de catálogo 1603558).

40 Con vistas a conseguir una intensificación, se puede aumentar la expresión de los genes o marcos de lectura abiertos o alelos, o se pueden intensificar las propiedades catalíticas o reguladoras (actividad) de las proteínas, por ejemplo. Ambas medidas pueden opcionalmente combinarse.

45 Con vistas a conseguir una sobre-expresión, se puede aumentar, por ejemplo, el número de copias de los genes o marcos de lectura abiertos correspondientes, o se puede mutar la región del promotor y de regulación o el sitio de unión al ribosoma, que está situado aguas arriba del gen estructural. Casetes de expresión que se incorporan aguas arriba del gen estructural actúan de una manera similar. Por medio de promotores inducibles, es adicionalmente posible elevar la expresión en el transcurso de la producción fermentativa de L-treonina. En virtud de medidas para prolongar la vida útil del ARNm, se mejora igualmente la expresión. Además de ello, al prevenir la degradación de la proteína enzimática, la actividad enzimática se potencia igualmente. Los genes o construcciones de genes pueden estar presentes en plásmidos que se replican de forma extra-cromosómica con un número diferente de copias o pueden estar integrados dentro del cromosoma y amplificados. Alternativamente, se puede obtener, adicionalmente, una sobre-expresión de los genes en cuestión cambiando la composición de los medios y mediante la gestión del cultivo.

Instrucciones sobre ello pueden encontrarse por parte de la persona experta en la técnica, entre otros, en Chang y Cohen (*Journal of Bacteriology* 134: 1141-1156 (1978)), en Hartley y 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)), en el documento WO98/04715, 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.

Se puede hacer uso de vectores de plásmidos capaces de replicarse en *Enterobacteriaceae* 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 (1998)) o derivados de pSC101 (Vocke y Bastia, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80(21): 6557-6561 (1983)). Una cepa transformada con un vector de plásmido se puede emplear en un procedimiento de acuerdo con la invención, en cuyo caso el vector del plásmido porta al menos el ORF yfiD y/o el gen pflB o secuencias de nucleótidos o alelos que codifican los productos génicos de los mismos.

Por el término “transformación” se entiende la absorción de un ácido nucleico aislado por parte de un huésped (microorganismo).

Igualmente, es posible transferir mutaciones que se refieren a la expresión de los genes o marcos de lectura abiertos respectivos en diversas cepas mediante intercambio de la secuencia (Hamilton et al.; *Journal of Bacteriology* 171: 4617-4622 (1989)).

Explicaciones detalladas relacionadas con los términos de genética y biología molecular se pueden encontrar en libros de texto conocidos sobre genética y biología molecular tales como, por ejemplo, el libro de texto de Birge (*Bacterial and Bacteriophage Genetics*, 4ª ed., Springer Verlag, Nueva York (EE.UU.), 2000) o el libro de texto de Berg, Tymoczko y Stryer (*Biochemistry*, 5ª ed., Freeman and Company, Nueva York (EE.UU.) 2002), o el libro de texto de Sambrook et al. (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (obra de 3 tomos), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE.UU.), 2001).

Además de ello, para la producción de L-treonina con cepas de la familia *Enterobacteriaceae* puede ser ventajoso, además de la intensificación del ORF yfiD y/o del gen pflB, intensificar una o más enzimas de la vía de biosíntesis de treonina conocida o enzimas del metabolismo anaplerótico o enzimas para la producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido o enzimas de la glicólisis o enzimas PTS o enzimas del metabolismo del azufre. Generalmente, se prefiere el uso de genes endógenos.

Por lo tanto, por ejemplo, simultáneamente se intensifican, en particular sobre-expresan uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende

- el operón thrABC que codifica aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa (documento US-A-4.278.765),
- el gen pyc de *Corynebacterium glutamicum* que codifica piruvato carboxilasa (documento WO 99/18228),
- el gen pps que codifica fosfoenolpiruvato sintasa (*Molecular and General Genetics* 231 (2): 332-336 (1992)),
- el gen ppc que codifica fosfoenolpiruvato carboxilasa (*Gene* 31:279-283 (1984)),
- los genes pntA y pntB que codifican transhidrogenasa (*European Journal of Biochemistry* 158: 647-653 (1986)),
- el gen rhtB que imparte resistencia a homoserina (documento EP-A-0 994 190),
- el gen mqo que codifica malato:quinona oxidoreductasa (documento WO 02/06459),
- el gen rhtC que imparte resistencia a treonina (documento EP-A-1 013 765),
- el gen thrE de *Corynebacterium glutamicum* que codifica la proteína de exportación de treonina (documento WO 01/92545),
- 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 (documento WO 03/004671),

ES 2 553 605 T3

- el gen *pgm* que codifica fosfoglucomutasa (WO 03/004598),
- el gen *fba* que codifica fructosa bifosfato aldolasa (documento WO 03/004664),
- el gen *ptsH* del operón *ptsHlcr* que codifica la proteína fosfohistidina hexosa fosfotransferasa del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
- 5 • el gen *ptsl* del operón *ptsHlcr* que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
- el gen *crr* del operón *ptsHlcr* que codifica el componente específico para glucosa IIA del sistema de fosfotransferasa PTS (documento WO 03/004674),
- el gen *ptsG* que codifica el componente específico para glucosa IIBC (documento WO 03/004670),
- 10 • el gen *lrp* que codifica el regulador del regulón de leucina (documento WO 03/004665),
- 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 intermediario central (Journal of Bacteriology 172:2642-2649 (1990)),
- 15 • el gen *mopB* que codifica la chaperona de 10 kDa (documento WO 03/004669), que también se conoce bajo la denominación 'groES',
- el gen *ahpC* del operón *ahpCF* que codifica la subunidad pequeña de alquil hidroperóxido reductasa (documento WO 03/004663),
- 20 • el gen *ahpF* del operón *ahpCF* que codifica la subunidad grande de alquil hidroperóxido reductasa (documento WO 03/004663),
- el gen *cysK* que codifica cisteína sintasa A (documento WO 03/006666),
- el gen *cysB* que codifica el regulador del regulón *cys* (documento WO 03/006666),
- el gen *cysJ* del operón *cysJIH* que codifica la flavoproteína de NADPH sulfito reductasa (documento WO 03/006666),
- 25 • el gen *cysl* del operón *cysJIH* que codifica la hemoproteína de NADPH sulfito reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen *cysH* del operón *cysJIH* que codifica la adenilil sulfato reductasa (documento WO 03/006666),
- el gen *phoB* del operón *phoBR* que codifica el regulador positivo *PhoB* del regulón *pho* (documento WO 03/008606),
- 30 • el gen *phoR* del operón *phoBR* que codifica la proteína sensor del regulón *pho* (documento WO 03/008606),
- el gen *phoE* que codifica la proteína E de la membrana celular externa (documento WO 03/008608),
- el gen *pykF* que codifica piruvato quinasa I que es estimulada por fructosa (documento WO 03/008609),
- el gen *pfkB* que codifica 6-fosfofructoquinasa II (documento WO 03/008610),
- 35 • el gen *malE* que codifica la proteína de unión periplásmica de transporte de maltosa (documento WO 03/008605),
- el gen *sodA* que codifica superóxido dismutasa (documento WO 03/008613),
- el gen *rseA* del operón *rseABC* que codifica una proteína de membrana con actividad anti- σ E (documento WO 03/008612),
- 40 • el gen *rseC* del operón *rseABC* que codifica un regulador global de los factores σ E (documento WO 03/008612),

ES 2 553 605 T3

- el gen *sucA* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa (documento WO 03/008614),
- el gen *sucB* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad E2 de dihidrolipoil trans-succinasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa (documento WO 03/008614),
- 5 • el gen *sucC* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad β de succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- el gen *sucD* del operón *sucABCD* que codifica la subunidad α de succinil-CoA sintetasa (documento WO 03/008615),
- el gen *adk* que codifica la adenilato quinasa (Nucleic Acids Research 13(19):7139-7151 (1985)),
- 10 • el gen *hdeA* que codifica una proteína periplásmica con función de tipo chaperonina (Journal of Bacteriology 175(23):7747-7748 (1993)),
- el gen *hdeB* que codifica una proteína periplásmica con función de tipo chaperonina (Journal of Bacteriology 175(23):7747-7748 (1993)),
- 15 • el gen *icd* que codifica la isocitrato deshidrogenasa (Journal of Biological Chemistry 262(22): 10422-10425 (1987)),
- el gen *mgIB* que codifica la proteína de transporte de unión a galactosa, periplásmica (Molecular and General Genetics 229(3):453-459 (1991)),
- el gen *lpd* que codifica dihidrolipoamida deshidrogenasa (European Journal of Biochemistry 135(3):519-527 (1983)),
- 20 • el gen *aceE* que codifica el componente E1 del complejo piruvato-deshidrogenasa (European Journal of Biochemistry 133(1):155-162 (1983)),
- el gen *aceF* que codifica el componente E2 del complejo piruvato-deshidrogenasa (European Journal of Biochemistry 133(3):481-489 (1983)),
- 25 • el gen *pepB* que codifica la aminopeptidasa B (Journal of Fermentation and Bioengineering 82: 392-397 (1996)),
- el gen *aldH* que codifica la aldehído deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.3) (Gene 99(1): 15-23 (1991)),
- el gen *bfr* que codifica la homoproteína de almacenamiento de hierro (bacterioferritina) (Journal of Bacteriology 171(7): 3940-3947 (1989)),
- el gen *udp* que codifica uridina fosforilasa (Nucleic Acids Research 17(16):6741 (1989)) y
- 30 • el gen *rseB* que codifica el regulador de la actividad del factor sigmaE (Molecular Microbiology 24 (2): 355-371 (1997)).

Además de ello, puede ser ventajoso para la producción de L-aminoácidos, en particular L-treonina, además de la intensificación del ORF *yfiD* y/o del gen *pflB*, atenuar, en particular eliminar o disminuir la expresión de uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende

- 35 • 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 Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.) (documento WO 02/29080),
- 40 • el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *ytfP* (Número de Acceso AAC77179 del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, EE.UU.), (documento WO 02/29080),
- el gen *pckA* que codifica la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (documento WO 02/29080),
- el gen *poxB* que codifica piruvato oxidasa (documento WO 02/36797),

- el gen aceA que codifica la enzima isocitrato liasa (documento WO 02/081722),
 - el gen dgsA que codifica el regulador DgsA del sistema de fosfotransferasa (documento WO 02/081721), que también se conoce bajo la denominación 'gen mlc',
 - 5 • el gen fruR que codifica el represor de fructosa (documento WO 02/081698), que también se conoce bajo la denominación 'gen cra',
 - el gen rpoS que codifica el factor sigma³⁸ (documento WO 01/05939), que también se conoce bajo la denominación 'gen katF',
 - el gen aspA que codifica la aspartato amonio liasa (documento WO 03/008603) y
 - el gen aceB que codifica malato sintasa A (documento WO 03/008604).
- 10 El término "atenuación" en este contexto describe la disminución o eliminación de la actividad intracelular o concentración de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo que es/son codificadas por el ADN correspondiente, utilizando, por ejemplo, un promotor débil o un gen o alelo que codifica una enzima o proteína correspondiente o el marco de lectura abierto o el gen y combinando opcionalmente estas medidas.
- 15 Mediante las medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce generalmente de 0 a 75%, 0 a 50%, 0 a 25%, 0 a 10% ó 0 a 5% de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje o, para ser más exactos, de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo inicial.
- Además de ello, para la producción de L-treonina puede ser ventajoso, además de la intensificación de los ORFs yfiD y/o del gen pflB, eliminar reacciones secundarias indeseables (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (comps.), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).
- 20 Además de ello, para la producción de L-treonina puede ser ventajoso, además de la intensificación de los ORFs yfiD y/o del gen pflB, eliminar reacciones secundarias indeseables (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (comps.), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).
- Los microorganismos producidos de acuerdo con la invención se pueden cultivar en el proceso por tandas, en el proceso por tandas alimentado o en el proceso por tandas alimentado repetido. Un resumen de métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).
- 25 El medio de cultivo a utilizar debe satisfacer las demandas de las cepas respectivas de una manera adecuada. Descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos están contenidos en el manual titulado "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981).
- 30 A modo de fuente de carbono, se puede hacer uso de azúcares e hidratos de carbono tales como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidón y, en circunstancias apropiadas, celulosa, aceites y grasas tales como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de copra, ésteres de 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 utilizar individualmente o en forma de una mezcla.
- 35 A modo de fuente de nitrógeno, se puede hacer uso de compuestos nitrogenados orgánicos tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz macerado, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno pueden utilizarse individualmente o en forma de una mezcla.
- 40 A modo de fuente de fósforo, se puede hacer uso de ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio, hidrógeno-fosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio. El medio de cultivo debe contener, además, sales de metales, tales como, por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Por último, además de las sustancias antes mencionadas, se pueden emplear sustancias reguladoras del crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Precursores adecuados se pueden añadir, además de ello, al medio de cultivo. Los materiales de alimentación establecidos se pueden añadir al cultivo en forma de una sola tanda o se pueden añadir durante el cultivo de manera adecuada.
- 45 La fermentación se lleva a cabo generalmente a un valor del pH de 5,5 a 9,0, en particular 6,0 a 8,0. Para los fines de controlar el pH del cultivo se emplean de manera adecuada compuestos de carácter básico tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o líquido amoniacal acuoso o compuestos de carácter ácido tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Con el fin de controlar el desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes tales como, por ejemplo, ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Con el fin de mantener la
- 50

estabilidad de los plásmidos pueden añadirse al medio, sustancias adecuadas de acción selectiva, por ejemplo antibióticos. Para mantener las condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, tales como aire, por ejemplo. La temperatura del cultivo cultura es normalmente alrededor de 25 °C a 45 °C y preferiblemente en torno a 30 °C hasta 40 °C. El cultivo se continúa hasta que se haya formado un máximo de L-aminoácidos o, para ser más exactos, de L-treonina. Este objetivo se logra normalmente en el espacio de 10 horas a 160 horas.

El análisis de los L-aminoácidos se puede llevar a cabo mediante cromatografía de intercambio de aniones con subsiguiente derivatización con ninhidrina tal como se describe en Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)), o puede tener lugar mediante HPLC de fase inversa tal como se describe en Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

El procedimiento de acuerdo con la invención sirve preferiblemente para la producción fermentativa de L-treonina.

La presente invención se elucidará con mayor detalle en lo que sigue sobre la base de realizaciones a modo de ejemplo.

Medios mínimos (M9) y medios completos (LB) que se utilizan para *Escherichia coli* se describen por J. H. Miller (A short course in bacterial genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento de ADN del plásmido de *Escherichia coli* y también todas las técnicas relacionadas con la restricción, ligamiento, tratamiento Klenow y tratamiento con fosfatasa alcalina se llevan a cabo de acuerdo con Sambrook et al. (Molecular Cloning – A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press. La transformación de *Escherichia coli* se lleva a cabo, a menos que se describa de otro modo, de acuerdo con Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175 (1989)).

La temperatura de incubación en el transcurso de la producción de cepas y transformantes es 37 °C.

Ejemplo 1

1. 1 Construcción del plásmido de expresión pTrc99AyiD

El marco de lectura abierto yfiD de *E. coli* K12 se amplifica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y también oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto yfiD en *E. coli* K12, MG1655 (número de acceso AE000344, Blattner et al. (Science 277: 1453-1474 (1997))), se sintetizan cebadores de la PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Los cebadores contienen secuencias para las enzimas de restricción que están marcadas mediante subrayado en la secuencia de nucleótidos representada más adelante. El cebador yfiD1 contiene el sitio de restricción para XbaI; el cebador yfiD2 contiene el sitio de restricción para HindIII.

yfiD1:

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

yfiD2:

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

El ADN cromosómico de *E. coli* K12 MG1655 empleado para la PCR se aísla de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 431 pb se puede amplificar con los cebadores específicos bajo condiciones de PCR estándares (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) con Vent-ADN-polimerasa (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania) (SEQ ID N° 3).

El producto de la PCR se restringe con las enzimas de restricción HindIII y XbaI y se examina en un gel de agarosa al 0,8% después de haberse purificado (kit de purificación, QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se escinde con las enzimas HindIII y XbaI, y se liga con el fragmento yfiD restringido. La cepa de *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) se transforma con la tanda de ligamiento, y células portadoras de plásmidos se seleccionan en agar LB al que se han añadido 50 µg/ml de ampicilina. La clonación con éxito se puede demostrar después del aislamiento del ADN del plásmido mediante escisión control con las enzimas HindIII/XbaI y HpaI. El plásmido se designa pTrc99AyiD (Figura 1).

1.2 Construcción del plásmido de expresión pTrc99ApfIB

El gen pflB de E. coli K12 se amplifica utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y también oligonucleótidos sintéticos. Partiendo de la secuencia de nucleótidos del gen pflB en E. coli K12, MG1655 (número de acceso AE000192, Blattner et al. (Science 277: 1453-1474 (1997))), se sintetizan cebadores de la PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Los cebadores contienen secuencias para las enzimas de restricción que están marcadas mediante subrayado en la secuencia de nucleótidos representada más adelante. El cebador pflB1 contiene el sitio de restricción para XbaI; el cebador pflB2 contiene el sitio de restricción para HindIII.

pflB1:

5' - CCACTCTAGAAGGTAGGTGTTACATGTC - 3' (SEQ ID No. 5)

pflB2:

5' - CGATTTTCAGTCAAAGCTTATTACATAG - 3' (SEQ ID No. 6)

El ADN cromosómico de E. coli K12 MG1655 empleado para la PCR se aísla de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN con un tamaño de aproximadamente 2325 pb se puede amplificar con los cebadores específicos bajo condiciones de PCR estándares (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications, Academic Press) con Vent-ADN-polimerasa (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania) (SEQ ID N° 7).

El producto de la PCR se restringe con las enzimas de restricción HindIII y XbaI y se examina en un gel de agarosa al 0,8% después de haberse purificado (kit de purificación, QIAGEN, Hilden, Alemania). El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se escinde con las enzimas HindIII y XbaI, y se liga con el fragmento pflB restringido. La cepa de E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, EE.UU.) se transforma con la tanda de ligamiento, y células portadoras de plásmidos se seleccionan en agar LB al que se han añadido 50 µg/ml de ampicilina. La clonación con éxito se puede demostrar después del aislamiento del ADN del plásmido mediante escisión control con las enzimas HindIII/XbaI y Paul. El plásmido se designa pTrc99ApfIB (Figura 2).

Ejemplo 2

2.1 Producción de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99AyfiD

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

La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99AyfiD descrito en el Ejemplo 1.1 y con el vector pTrc99A, y células portadoras de plásmidos se seleccionan en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. De este modo, surgen las cepas MG442/pTrc99AyfiD y MG442/pTrc99A. Colonias sencillas seleccionadas se multiplican subsiguientemente de manera adicional en medio mínimo que tiene la siguiente composición: 3,5 g/l de Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de NH₄Cl, 0,1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina se examina en cultivos en tandas de 10 ml, que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para este fin, 10 ml de medio de pre-cultivo que tiene la siguiente composición: 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, se inoculan e incuban durante 16 horas a 37 °C y a 180 rpm en una incubadora ESR fabricada por Kühner AG (Birsfelden, Suiza). 250 µl de una vez de este pre-cultivo 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 inicial se examina de la misma manera, no existiendo, sin embargo, adición alguna de ampicilina al medio. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (OD) de la suspensión de cultivo a una longitud de onda de medición de 660 nm con un fotómetro LP2W fabricado por Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania).

Subsiguientemente se determina la concentración de L-treonina que se ha formado en el sobrenadante del cultivo filtrado en condiciones estériles con un analizador de aminoácidos fabricado por Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Alemania), mediante cromatografía de intercambio de iones y reacción post-columna con detección de ninhidrina.

El resultado del experimento se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1

Cepa	DO (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	3,8	1,3
MG442/pTrc99A _{yfiD}	5,5	2,5

2.1 Producción de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99A_{pflB}

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

10 La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99A_{pflB} descrito en el Ejemplo 1.2 y con el vector pTrc99A, y células portadoras de plásmidos se seleccionan en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina. De este modo, surgen las cepas MG442/pTrc99A_{pflB} y MG442/pTrc99A. Colonias sencillas seleccionadas se multiplican subsiguientemente de manera adicional en medio mínimo que tiene la siguiente composición: 3,5 g/l de Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de NH₄Cl, 0,1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina se examina en cultivos en tandas de 10 ml, que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. Para este fin, 10 ml de medio de pre-cultivo que tiene la siguiente composición: 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, se inoculan e incuban durante 16 horas a 37 °C y a 180 rpm en una incubadora ESR fabricada por Kühner AG (Birsfelden, Suiza). 250 µl de una vez de este pre-cultivo 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 completar la inducción de la expresión del gen pflB, se añaden 100 mg/l de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) en tandas paralelas. La formación de L-treonina por parte de la cepa MG442 inicial se examina de la misma manera, no existiendo, sin embargo, adición alguna de ampicilina al medio. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (OD) de la suspensión de cultivo a una longitud de onda de medición de 660 nm con un fotómetro LP2W fabricado por Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania).

- 25 Subsiguientemente se determina la concentración de L-treonina que se ha formado en el sobrenadante del cultivo filtrado en condiciones estériles con un analizador de aminoácidos fabricado por Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Alemania), mediante cromatografía de intercambio de iones y reacción post-columna con detección de ninhidrina.

El resultado del experimento se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2

Cepa	Aditivos	DO (660 nm)	L-treonina g/l
MG442	-	5,6	1,4
MG442/pTrc99A	-	3,8	1,3
MG442/pTrc99A _{pflB}	-	5,6	1,9
MG442/pTrc99A _{pflB}	IPTG	5,2	2,2

30

Breve descripción de las Figuras:

Los datos de longitud han de interpretarse como datos aproximados. Las abreviaturas y designaciones que se utilizan tienen el siguiente significado:

- Amp: gen de resistencia a ampicilina
- 35 • lacI: gen para la proteína represora del promotor trc
- P_{trc}: región del promotor trc, inducible por IPTG

ES 2 553 605 T3

- yfiD: región codificadora del marco de lectura abierto yfiD
- pflB: región codificadora del gen pflB
- 5S: región de ARNr de 5S
- rrnBT: región del terminador de ARNr

5 Las abreviaturas para las enzimas de restricción tienen el siguiente significado:

- HindIII: endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae* R_c
- HpaI: endonucleasa de restricción de *Haemophilus parainfluenzae*
- Paul: endonucleasa de restricción de *Paracoccus alcaliphilus*
- XbaI: endonucleasa de restricción de *Xanthomonas campestris*

10

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Degussa AG
- <120> Procedimiento para la producción de L-aminoácidos utilizando cepas de la familia Enterobacteriaceae
- <130> 020489 BT
- 5 <140> 8
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 30
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia sintética
- <220>
- <221> Cebador
- <222> (1)...(30)
- <223> yfiD1
- 15 <220>
- <221> Sitio de restricción
- <222> (9)...(14)
- <223> Sitio XbaI
- <400> 1
- 20 **gaacaaatct agaaattaag ccggggaggg** **30**
- <210> 2
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia sintética
- 25 <220>
- <221> Cebador
- <222> (1)...(24)
- <223> yfiD2
- 30 <220>
- <221> Sitio de restricción
- <222> (8)...(13)
- <223> Sitio HindIII
- <400> 2
- gctacttaag ctttacaggc tttc** **24**
- 35 <210> 3
- <211> 431
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli
- 40 <220>
- <221> Producto de PCR yfiD

ES 2 553 605 T3

<222> (1)...(431)
<223>

<220>

<221> CDS

5 <222> (36)...(419)

<223> marco de lectura abierto yfiD

<400> 3

```

gaacaaatct agaaattaag ccggggaggc atcac atg att aca ggt atc cag      53
                               Met Ile Thr Gly Ile Gln
                               1           5

att act aaa gcc gct aac gac gat ctg ctg aac tct ttc tgg ctg ctg      101
Ile Thr Lys Ala Ala Asn Asp Asp Leu Leu Asn Ser Phe Trp Leu Leu
          10                15                20

gac agc gaa aaa ggc gaa gcg cgt tgc atc gtt gca aaa gca ggt tat      149
Asp Ser Glu Lys Gly Glu Ala Arg Cys Ile Val Ala Lys Ala Gly Tyr
          25                30                35

gca gaa gat gaa gtg gtt gca gta agc aaa ctg ggt gac att gaa tac      197
Ala Glu Asp Glu Val Val Ala Val Ser Lys Leu Gly Asp Ile Glu Tyr
          40                45                50

cgt gaa gtt cca gta gaa gtg aaa cca gaa gtt cgc gtt gaa ggt ggt      245
Arg Glu Val Pro Val Glu Val Lys Pro Glu Val Arg Val Glu Gly Gly
          55                60                65                70

caa cac ctg aac gtt aac gtt ctg cgt cgc gaa act ctg gaa gat gca      293
Gln His Leu Asn Val Asn Val Leu Arg Arg Glu Thr Leu Glu Asp Ala
          75                80                85

gtt aag cat ccg gaa aaa tat ccg cag ctg acc atc cgt gta tcc ggt      341
Val Lys His Pro Glu Lys Tyr Pro Gln Leu Thr Ile Arg Val Ser Gly
          90                95                100

tat gca gtt cgc ttt aac tct ctg act ccg gaa cag cag cgc gac gtt      389
Tyr Ala Val Arg Phe Asn Ser Leu Thr Pro Glu Gln Gln Arg Asp Val
          105                110                115

atc gct cgt acc ttt act gaa agc ctg taa agcttaagta gc      431
Ile Ala Arg Thr Phe Thr Glu Ser Leu
          120                125
    
```

<210> 4

10 <211> 127

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

```

Met Ile Thr Gly Ile Gln Ile Thr Lys Ala Ala Asn Asp Asp Leu Leu
1           5                10                15
    
```

15

ES 2 553 605 T3

Asn Ser Phe Trp Leu Leu Asp Ser Glu Lys Gly Glu Ala Arg Cys Ile
 20 25 30
 Val Ala Lys Ala Gly Tyr Ala Glu Asp Glu Val Val Ala Val Ser Lys
 35 40 45
 Leu Gly Asp Ile Glu Tyr Arg Glu Val Pro Val Glu Val Lys Pro Glu
 50 55 60
 Val Arg Val Glu Gly Gly Gln His Leu Asn Val Asn Val Leu Arg Arg
 65 70 75 80
 Glu Thr Leu Glu Asp Ala Val Lys His Pro Glu Lys Tyr Pro Gln Leu
 85 90 95
 Thr Ile Arg Val Ser Gly Tyr Ala Val Arg Phe Asn Ser Leu Thr Pro
 100 105 110
 Glu Gln Gln Arg Asp Val Ile Ala Arg Thr Phe Thr Glu Ser Leu
 115 120 125

5 <210> 5
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia sintética

<220>
 <221> Cebador
 <222> (1)...(28)
 <223> pflB1

10 <220>
 <221> Sitio de restricción
 <222> (5)...(10)
 <223> Sitio XbaI

<400> 5

15 ccactctaga aggtaggtgt tacatgtc

28

<210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia sintética

20 <220>
 <221> Cebador
 <222> (1)...(27)
 <223> pflB2

25 <220>
 <221> Sitio de restricción
 <222> (13)...(18)
 <223> Sitio HindIII

<400> 6

cgatttcagt caaagcttat tacatag

27

30

ES 2 553 605 T3

<210> 7
 <211> 2325
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5 <220>
 <221> Producto de PCR pflB
 <222> (1)...(2325)
 <223>

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (24)...(2306)
 <223> Región codificadora de pflB

<400> 7

```

ccactctaga aggtaggtgt tac atg tcc gag ctt aat gaa aag tta gcc aca      53
                Met Ser Glu Leu Asn Glu Lys Leu Ala Thr
                1                    5                      10

gcc tgg gaa ggt ttt acc aaa ggt gac tgg cag aat gaa gta aac gtc      101
Ala Trp Glu Gly Phe Thr Lys Gly Asp Trp Gln Asn Glu Val Asn Val
                15                    20                      25

cgt gac ttc att cag aaa aac tac act ccg tac gag ggt gac gag tcc      149
Arg Asp Phe Ile Gln Lys Asn Tyr Thr Pro Tyr Glu Gly Asp Glu Ser
                30                    35                      40

ttc ctg gct ggc gct act gaa gcg acc acc acc ctg tgg gac aaa gta      197
Phe Leu Ala Gly Ala Thr Glu Ala Thr Thr Thr Leu Trp Asp Lys Val
                45                    50                      55

atg gaa ggc gtt aaa ctg gaa aac cgc act cac gcg cca gtt gac ttt      245
Met Glu Gly Val Lys Leu Glu Asn Arg Thr His Ala Pro Val Asp Phe
                60                    65                      70

gac acc gct gtt gct tcc acc atc acc tct cac gac gct ggc tac atc      293
Asp Thr Ala Val Ala Ser Thr Ile Thr Ser His Asp Ala Gly Tyr Ile
                75                    80                      85                      90

aac aag cag ctt gag aaa atc gtt ggt ctg cag act gaa gct ccg ctg      341
Asn Lys Gln Leu Glu Lys Ile Val Gly Leu Gln Thr Glu Ala Pro Leu
                95                    100                      105

aaa cgt gct ctt atc ccg ttc ggt ggt atc aaa atg atc gaa ggt tcc      389
Lys Arg Ala Leu Ile Pro Phe Gly Gly Ile Lys Met Ile Glu Gly Ser
                110                   115                      120

tgc aaa gcg tac aac cgc gaa ctg gat ccg atg atc aaa aaa atc ttc      437
Cys Lys Ala Tyr Asn Arg Glu Leu Asp Pro Met Ile Lys Lys Ile Phe
                125                   130                      135

act gaa tac cgt aaa act cac aac cag ggc gtg ttc gac gtt tac act      485
Thr Glu Tyr Arg Lys Thr His Asn Gln Gly Val Phe Asp Val Tyr Thr
                140                   145                      150

ccg gac atc ctg cgt tgc cgt aaa tct ggt gtt ctg acc ggt ctg cca      533
Pro Asp Ile Leu Arg Cys Arg Lys Ser Gly Val Leu Thr Gly Leu Pro
                155                   160                      165                      170

gat gca tat ggc cgt ggc cgt atc atc ggt gac tac cgt cgc gtt gcg      581
Asp Ala Tyr Gly Arg Gly Arg Ile Ile Gly Asp Tyr Arg Arg Val Ala
    
```

ES 2 553 605 T3

175					180					185						
ctg	tac	ggt	atc	gac	tac	ctg	atg	aaa	gac	aaa	ctg	gca	cag	ttc	act	629
Leu	Tyr	Gly	Ile	Asp	Tyr	Leu	Met	Lys	Asp	Lys	Leu	Ala	Gln	Phe	Thr	
		190						195					200			
tct	ctg	cag	gct	gat	ctg	gaa	aac	ggc	gta	aac	ctg	gaa	cag	act	atc	677
Ser	Leu	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn	Gly	Val	Asn	Leu	Glu	Gln	Thr	Ile	
		205					210					215				
cgt	ctg	cgc	gaa	gaa	atc	gct	gaa	cag	cac	cgc	gct	ctg	ggt	cag	atg	725
Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Ile	Ala	Glu	Gln	His	Arg	Ala	Leu	Gly	Gln	Met	
	220					225					230					
aaa	gaa	atg	gct	gcg	aaa	tac	ggc	tac	gac	atc	tct	ggt	ccg	gct	acc	773
Lys	Glu	Met	Ala	Ala	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser	Gly	Pro	Ala	Thr	
235					240				245						250	
aac	gct	cag	gaa	gct	atc	cag	tgg	act	tac	ttc	ggc	tac	ctg	gct	gct	821
Asn	Ala	Gln	Glu	Ala	Ile	Gln	Trp	Thr	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ala	
				255				260						265		
ggt	aag	tct	cag	aac	ggt	gct	gca	atg	tcc	ttc	ggt	cgt	acc	tcc	acc	869
Val	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	Ala	Ala	Met	Ser	Phe	Gly	Arg	Thr	Ser	Thr	
			270					275					280			
ttc	ctg	gat	gtg	tac	atc	gaa	cgt	gac	ctg	aaa	gct	ggc	aag	atc	acc	917
Phe	Leu	Asp	Val	Tyr	Ile	Glu	Arg	Asp	Leu	Lys	Ala	Gly	Lys	Ile	Thr	
		285					290					295				
gaa	caa	gaa	gcg	cag	gaa	atg	ggt	gac	cac	ctg	gtc	atg	aaa	ctg	cgt	965
Glu	Gln	Glu	Ala	Gln	Glu	Met	Val	Asp	His	Leu	Val	Met	Lys	Leu	Arg	
	300					305					310					
atg	ggt	cgc	ttc	ctg	cgt	act	ccg	gaa	tac	gat	gaa	ctg	ttc	tct	ggc	1013
Met	Val	Arg	Phe	Leu	Arg	Thr	Pro	Glu	Tyr	Asp	Glu	Leu	Phe	Ser	Gly	
315					320				325						330	
gac	ccg	atc	tgg	gca	acc	gaa	tct	atc	ggg	ggt	atg	ggc	ctc	gac	ggt	1061
Asp	Pro	Ile	Trp	Ala	Thr	Glu	Ser	Ile	Gly	Gly	Met	Gly	Leu	Asp	Gly	
				335				340						345		
cgt	acc	ctg	ggt	acc	aaa	aac	agc	ttc	cgt	ttc	ctg	aac	acc	ctg	tac	1109
Arg	Thr	Leu	Val	Thr	Lys	Asn	Ser	Phe	Arg	Phe	Leu	Asn	Thr	Leu	Tyr	
			350					355					360			
acc	atg	ggt	ccg	tct	ccg	gaa	ccg	aac	atg	acc	att	ctg	tgg	tct	gaa	1157
Thr	Met	Gly	Pro	Ser	Pro	Glu	Pro	Asn	Met	Thr	Ile	Leu	Trp	Ser	Glu	
			365				370					375				
aaa	ctg	ccg	ctg	aac	ttc	aag	aaa	ttc	gcc	gct	aaa	gtg	tcc	atc	gac	1205
Lys	Leu	Pro	Leu	Asn	Phe	Lys	Lys	Phe	Ala	Ala	Lys	Val	Ser	Ile	Asp	
	380					385					390					
acc	tct	tct	ctg	cag	tat	gag	aac	gat	gac	ctg	atg	cgt	ccg	gac	ttc	1253
Thr	Ser	Ser	Leu	Gln	Tyr	Glu	Asn	Asp	Asp	Leu	Met	Arg	Pro	Asp	Phe	
	395				400				405						410	
aac	aac	gat	gac	tac	gct	att	gct	tgc	tgc	gta	agc	ccg	atg	atc	ggt	1301
Asn	Asn	Asp	Asp	Tyr	Ala	Ile	Ala	Cys	Cys	Val	Ser	Pro	Met	Ile	Val	
				415				420						425		
ggt	aaa	caa	atg	cag	ttc	ttc	ggt	gcg	cgt	gca	aac	ctg	gcg	aaa	acc	1349
Gly	Lys	Gln	Met	Gln	Phe	Phe	Gly	Ala	Arg	Ala	Asn	Leu	Ala	Lys	Thr	
			430					435					440			

ES 2 553 605 T3

atg ctg tac gca atc aac ggc ggc gtt gac gaa aaa ctg aaa atg cag Met Leu Tyr Ala Ile Asn Gly Gly Val Asp Glu Lys Leu Lys Met Gln 445 450 455	1397
ggt ggt ccg aag tct gaa ccg atc aaa ggc gat gtc ctg aac tat gat Val Gly Pro Lys Ser Glu Pro Ile Lys Gly Asp Val Leu Asn Tyr Asp 460 465 470	1445
gaa gtg atg gag cgc atg gat cac ttc atg gac tgg ctg gct aaa cag Glu Val Met Glu Arg Met Asp His Phe Met Asp Trp Leu Ala Lys Gln 475 480 485 490	1493
tac atc act gca ctg aac atc atc cac tac atg cac gac aag tac agc Tyr Ile Thr Ala Leu Asn Ile Ile His Tyr Met His Asp Lys Tyr Ser 495 500 505	1541
tac gaa gcc tct ctg atg gcg ctg cac gac cgt gac gtt atc cgc acc Tyr Glu Ala Ser Leu Met Ala Leu His Asp Arg Asp Val Ile Arg Thr 510 515 520	1589
atg gcg tgt ggt atc gct ggt ctg tcc gtt gct gct gac tcc ctg tct Met Ala Cys Gly Ile Ala Gly Leu Ser Val Ala Ala Asp Ser Leu Ser 525 530 535	1637
gca atc aaa tat gcg aaa gtt aaa ccg att cgt gac gaa gac ggt ctg Ala Ile Lys Tyr Ala Lys Val Lys Pro Ile Arg Asp Glu Asp Gly Leu 540 545 550	1685
gct atc gac ttc gaa atc gaa ggc gaa tac ccg cag ttt ggt aac aat Ala Ile Asp Phe Glu Ile Glu Gly Glu Tyr Pro Gln Phe Gly Asn Asn 555 560 565 570	1733
gat ccg cgt gta gat gac ctg gct gtt gac ctg gta gaa cgt ttc atg Asp Pro Arg Val Asp Asp Leu Ala Val Asp Leu Val Glu Arg Phe Met 575 580 585	1781
aag aaa att cag aaa ctg cac acc tac cgt gac gct atc ccg act cag Lys Lys Ile Gln Lys Leu His Thr Tyr Arg Asp Ala Ile Pro Thr Gln 590 595 600	1829
tct gtt ctg acc atc act tct aac gtt gtg tat ggt aag aaa acg ggt Ser Val Leu Thr Ile Thr Ser Asn Val Val Tyr Gly Lys Lys Thr Gly 605 610 615	1877
aac acc cca gac ggt cgt cgt gct ggc gcg ccg ttc gga ccg ggt gct Asn Thr Pro Asp Gly Arg Arg Ala Gly Ala Pro Phe Gly Pro Gly Ala 620 625 630	1925
aac ccg atg cac ggt cgt gac cag aaa ggt gca gta gcc tct ctg act Asn Pro Met His Gly Arg Asp Gln Lys Gly Ala Val Ala Ser Leu Thr 635 640 645 650	1973
tcc gtt gct aaa ctg ccg ttt gct tac gct aaa gat ggt atc tcc tac Ser Val Ala Lys Leu Pro Phe Ala Tyr Ala Lys Asp Gly Ile Ser Tyr 655 660 665	2021
acc ttc tct atc gtt ccg aac gca ctg ggt aaa gac gac gaa gtt cgt Thr Phe Ser Ile Val Pro Asn Ala Leu Gly Lys Asp Asp Glu Val Arg 670 675 680	2069
aag acc aac ctg gct ggt ctg atg gat ggt tac ttc cac cac gaa gca Lys Thr Asn Leu Ala Gly Leu Met Asp Gly Tyr Phe His His Glu Ala 685 690 695	2117

ES 2 553 605 T3

tcc atc gaa ggt ggt cag cac ctg aac gtt aac gtg atg aac cgt gaa 2165
 Ser Ile Glu Gly Gly Gln His Leu Asn Val Asn Val Met Asn Arg Glu
 700 705 710

atg ctg ctc gac gcg atg gaa aac ccg gaa aaa tat ccg cag ctg acc 2213
 Met Leu Leu Asp Ala Met Glu Asn Pro Glu Lys Tyr Pro Gln Leu Thr
 715 720 725 730

atc cgt gta tct ggc tac gca gta cgt ttc aac tcg ctg act aaa gaa 2261
 Ile Arg Val Ser Gly Tyr Ala Val Arg Phe Asn Ser Leu Thr Lys Glu
 735 740 745

cag cag cag gac gtt att act cgt acc ttc act caa tct atg taa 2306
 Gln Gln Gln Asp Val Ile Thr Arg Thr Phe Thr Gln Ser Met
 750 755 760

taagctttga ctgaaatcg 2325

<210> 8
 <211> 760
 <212> PRT
 5 <213> Escherichia coli

<400> 8

Met Ser Glu Leu Asn Glu Lys Leu Ala Thr Ala Trp Glu Gly Phe Thr
 1 5 10 15

Lys Gly Asp Trp Gln Asn Glu Val Asn Val Arg Asp Phe Ile Gln Lys
 20 25 30

Asn Tyr Thr Pro Tyr Glu Gly Asp Glu Ser Phe Leu Ala Gly Ala Thr
 35 40 45

Glu Ala Thr Thr Thr Leu Trp Asp Lys Val Met Glu Gly Val Lys Leu
 50 55 60

Glu Asn Arg Thr His Ala Pro Val Asp Phe Asp Thr Ala Val Ala Ser
 65 70 75 80

Thr Ile Thr Ser His Asp Ala Gly Tyr Ile Asn Lys Gln Leu Glu Lys
 85 90 95

Ile Val Gly Leu Gln Thr Glu Ala Pro Leu Lys Arg Ala Leu Ile Pro
 100 105 110

Phe Gly Gly Ile Lys Met Ile Glu Gly Ser Cys Lys Ala Tyr Asn Arg
 115 120 125

Glu Leu Asp Pro Met Ile Lys Lys Ile Phe Thr Glu Tyr Arg Lys Thr
 130 135 140

His Asn Gln Gly Val Phe Asp Val Tyr Thr Pro Asp Ile Leu Arg Cys
 145 150 155 160

Arg Lys Ser Gly Val Leu Thr Gly Leu Pro Asp Ala Tyr Gly Arg Gly
 165 170 175

Arg Ile Ile Gly Asp Tyr Arg Arg Val Ala Leu Tyr Gly Ile Asp Tyr
 180 185 190

Leu Met Lys Asp Lys Leu Ala Gln Phe Thr Ser Leu Gln Ala Asp Leu
 195 200 205

Glu Asn Gly Val Asn Leu Glu Gln Thr Ile Arg Leu Arg Glu Glu Ile

ES 2 553 605 T3

210		215		220
Ala Glu Gln His Arg Ala Leu Gly Gln Met Lys Glu Met Ala Ala Lys 225 230 235 240				
Tyr Gly Tyr Asp Ile Ser Gly Pro Ala Thr Asn Ala Gln Glu Ala Ile 245 250 255				
Gln Trp Thr Tyr Phe Gly Tyr Leu Ala Ala Val Lys Ser Gln Asn Gly 260 265 270				
Ala Ala Met Ser Phe Gly Arg Thr Ser Thr Phe Leu Asp Val Tyr Ile 275 280 285				
Glu Arg Asp Leu Lys Ala Gly Lys Ile Thr Glu Gln Glu Ala Gln Glu 290 295 300				
Met Val Asp His Leu Val Met Lys Leu Arg Met Val Arg Phe Leu Arg 305 310 315 320				
Thr Pro Glu Tyr Asp Glu Leu Phe Ser Gly Asp Pro Ile Trp Ala Thr 325 330 335				
Glu Ser Ile Gly Gly Met Gly Leu Asp Gly Arg Thr Leu Val Thr Lys 340 345 350				
Asn Ser Phe Arg Phe Leu Asn Thr Leu Tyr Thr Met Gly Pro Ser Pro 355 360 365				
Glu Pro Asn Met Thr Ile Leu Trp Ser Glu Lys Leu Pro Leu Asn Phe 370 375 380				
Lys Lys Phe Ala Ala Lys Val Ser Ile Asp Thr Ser Ser Leu Gln Tyr 385 390 395 400				
Glu Asn Asp Asp Leu Met Arg Pro Asp Phe Asn Asn Asp Asp Tyr Ala 405 410 415				
Ile Ala Cys Cys Val Ser Pro Met Ile Val Gly Lys Gln Met Gln Phe 420 425 430				
Phe Gly Ala Arg Ala Asn Leu Ala Lys Thr Met Leu Tyr Ala Ile Asn 435 440 445				
Gly Gly Val Asp Glu Lys Leu Lys Met Gln Val Gly Pro Lys Ser Glu 450 455 460				
Pro Ile Lys Gly Asp Val Leu Asn Tyr Asp Glu Val Met Glu Arg Met 465 470 475 480				
Asp His Phe Met Asp Trp Leu Ala Lys Gln Tyr Ile Thr Ala Leu Asn 485 490 495				
Ile Ile His Tyr Met His Asp Lys Tyr Ser Tyr Glu Ala Ser Leu Met 500 505 510				
Ala Leu His Asp Arg Asp Val Ile Arg Thr Met Ala Cys Gly Ile Ala 515 520 525				
Gly Leu Ser Val Ala Ala Asp Ser Leu Ser Ala Ile Lys Tyr Ala Lys 530 535 540				
Val Lys Pro Ile Arg Asp Glu Asp Gly Leu Ala Ile Asp Phe Glu Ile 545 550 555 560				

ES 2 553 605 T3

Glu Gly Glu Tyr Pro Gln Phe Gly Asn Asn Asp Pro Arg Val Asp Asp
 565 570 575
 Leu Ala Val Asp Leu Val Glu Arg Phe Met Lys Lys Ile Gln Lys Leu
 580 585 590
 His Thr Tyr Arg Asp Ala Ile Pro Thr Gln Ser Val Leu Thr Ile Thr
 595 600 605
 Ser Asn Val Val Tyr Gly Lys Lys Thr Gly Asn Thr Pro Asp Gly Arg
 610 615 620
 Arg Ala Gly Ala Pro Phe Gly Pro Gly Ala Asn Pro Met His Gly Arg
 625 630 635 640
 Asp Gln Lys Gly Ala Val Ala Ser Leu Thr Ser Val Ala Lys Leu Pro
 645 650 655
 Phe Ala Tyr Ala Lys Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Phe Ser Ile Val Pro
 660 665 670
 Asn Ala Leu Gly Lys Asp Asp Glu Val Arg Lys Thr Asn Leu Ala Gly
 675 680 685
 Leu Met Asp Gly Tyr Phe His His Glu Ala Ser Ile Glu Gly Gly Gln
 690 695 700
 His Leu Asn Val Asn Val Met Asn Arg Glu Met Leu Leu Asp Ala Met
 705 710 715 720
 Glu Asn Pro Glu Lys Tyr Pro Gln Leu Thr Ile Arg Val Ser Gly Tyr
 725 730 735
 Ala Val Arg Phe Asn Ser Leu Thr Lys Glu Gln Gln Gln Asp Val Ile
 740 745 750
 Thr Arg Thr Phe Thr Gln Ser Met
 755 760

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de L-treonina mediante fermentación de microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae, en el que
- 5 a) en los microorganismos que ya producen L-treonina se sobre-expresan el ORF yfiD y/o el gen pflB o las secuencias de nucleótidos que codifican los productos génicos, y dichos microorganismos se cultivan en un medio en condiciones en las que la L-treonina está enriquecida en el medio o en las células, y
- b) la L-treonina se aísla, con lo que opcionalmente constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad o en porciones permanecen en el producto aislado o se separan por
- 10 completo.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se emplean microorganismos recombinantes que son generados por la transformación de un microorganismo de la familia Enterobacteriaceae con un vector, conteniendo dicho vector el ORF yfiD y/o el gen pflB.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el o los números de copias del gen/genes y/u ORF en los microorganismos recombinantes se incrementa/incrementan en al menos 1.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el incremento en el número de copias del ORF yfiD y/o el gen pflB en al menos 1 se consigue mediante integración del gen en el cromosoma del microorganismo.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el incremento en el número de copias del ORF yfiD y/o el gen pflB en al menos 1 se consigue mediante un vector de replicación extracromosómico.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que con vistas a lograr la sobre-expresión
- a) se muta la región del promotor y de regulación o el sitio de unión al ribosoma aguas arriba del ORF yfiD y/o el gen pflB, o
- b) se incorporan casetes de expresión o promotores aguas arriba del ORF yfiD y/o del gen pflB.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se hace uso de un ORF yfiD y/o de un gen pflB que está bajo el control del promotor.
- 25 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se emplean los microorganismos se seleccionan del género Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia.
9. Procedimiento para la producción de L-treonina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se fermentan los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en el que, además, simultáneamente se intensifican, en particular sobre-expresan uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende:
- 30 9.1 el operón thrABC que codifica aspartato quinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa,
- 9.2 el gen pyc que codifica piruvato carboxilasa,
- 9.3 el gen pps que codifica fosfoenolpiruvato sintasa,
- 35 9.4 el gen ppc que codifica fosfoenolpiruvato carboxilasa,
- 9.5 los genes pntA y pntB que codifican transhidrogenasa,
- 9.6 el gen rhtB que imparte resistencia a homoserina,
- 9.7 el gen mqo que codifica malato:quinona oxidoreductasa,
- 9.8 el gen rhtC que imparte resistencia a treonina,
- 40 9.9 el gen thrE que codifica la proteína de exportación de treonina,
- 9.10 el gen gdhA que codifica glutamato deshidrogenasa,

ES 2 553 605 T3

- 9.11 el gen *hns* que codifica la proteína de unión a ADN HLP-II,
- 9.12 el gen *pgm* que codifica fosfoglucomutasa,
- 9.13 el gen *fbp* que codifica fructosa bifosfato aldolasa,
- 9.14 el gen *ptsH* que codifica la proteína fosfohistidina hexosa fosfotransferasa,
- 5 9.15 el gen *ptsI* que codifica la enzima I del sistema de fosfotransferasa,
- 9.16 el gen *crr* que codifica el componente específico para glucosa IIA,
- 9.17 el gen *ptsG* que codifica el componente específico para glucosa IIBC,
- 9.18 el gen *lrp* que codifica el regulador del regulón de leucina,
- 9.19 el gen *csrA* que codifica el regulador global Csr,
- 10 9.20 el gen *fadR* que codifica el regulador del regulón *fad*,
- 9.21 el gen *iclR* que codifica el regulador del metabolismo intermediario central,
- 9.22 el gen *mopB* que codifica la chaperona de 10 kDa,
- 9.23 el gen *ahpC* que codifica la subunidad pequeña de alquil hidroperóxido reductasa,
- 9.24 el gen *ahpF* que codifica la subunidad grande de alquil hidroperóxido reductasa,
- 15 9.25 el gen *cysK* que codifica cisteína sintasa A,
- 9.26 el gen *cysB* que codifica el regulador del regulón *cys*,
- 9.27 el gen *cysJ* que codifica la flavoproteína de NADPH sulfito reductasa,
- 9.28 el gen *cysI* que codifica la hemoproteína de NADPH sulfito reductasa,
- 9.29 el gen *cysH* que codifica la adenilil sulfato reductasa,
- 20 9.30 el gen *phoB* que codifica el regulador positivo PhoB del regulón *pho*,
- 9.31 el gen *phoR* que codifica la proteína sensor del regulón *pho*,
- 9.32 el gen *phoE* que codifica la proteína E de la membrana celular externa,
- 9.33 el gen *pykF* que codifica piruvato quinasa I que es estimulada por fructosa,
- 9.34 el gen *pfkB* que codifica 6-fosfofructoquinasa II,
- 25 9.35 el gen *malE* que codifica la proteína de unión periplásmica de transporte de maltosa,
- 9.36 el gen *sodA* que codifica superóxido dismutasa,
- 9.37 el gen *rseA* que codifica una proteína de membrana con actividad anti-sigmaE,
- 9.38 el gen *rseC* que codifica un regulador global del factor sigmaE,
- 9.39 el gen *sucA* que codifica la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 30 9.40 el gen *sucB* que codifica la subunidad E2 de dihidrolipoil trans-succinasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
- 9.41 el gen *sucC* que codifica la subunidad β de succinil-CoA sintetasa,
- 9.42 el gen *sucD* que codifica la subunidad α de succinil-CoA sintetasa,
- 9.43 el gen *adk* que codifica la adenilato quinasa,
- 35 9.44 el gen *hdeA* que codifica una proteína periplásmica con función de tipo chaperonina,

- 9.45 el gen hdeB que codifica una proteína periplásmica con función de tipo chaperonina,
- 9.46 el gen icd que codifica la isocitrato deshidrogenasa,
- 9.47 el gen mgIB que codifica la proteína de transporte de unión a galactosa, periplásmica,
- 9.48 el gen lpd que codifica dihidrolipoamida deshidrogenasa,
- 5 9.49 el gen aceE que codifica el componente E1 del complejo piruvato-deshidrogenasa,
- 9.50 el gen aceF que codifica el componente E2 del complejo piruvato-deshidrogenasa,
- 9.51 el gen pepB que codifica la aminopeptidasa B,
- 9.52 el gen aldH que codifica la aldehído deshidrogenasa,
- 9.53 el gen bfr que codifica la homoproteína de almacenamiento de hierro,
- 10 9.54 el gen udp que codifica uridina fosforilasa y
- 9.55 el gen rseB que codifica el regulador de la actividad del factor sigmaE.

10. Procedimiento para la producción de L-treonina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se fermentan los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en el que, además, simultáneamente se atenua/atenúan, en particular eliminan, o se disminuye la expresión de los mismos, de uno o más de los genes seleccionados del grupo que comprende:

- 15 10.1 el gen tdh que codifica treonina deshidrogenasa,
- 10.2 el gen mdh que codifica malato deshidrogenasa,
- 10.3 el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yjfA,
- 10.4 el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) ytfP,
- 20 10.5 el gen pckA que codifica la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa,
- 10.6 el gen poxB que codifica piruvato oxidasa,
- 10.7 el gen aceA que codifica isocitrato liasa,
- 10.8 el gen dgsA que codifica el regulador DgsA del sistema de fosfotransferasa,
- 10.9 el gen fruR que codifica el represor de fructosa,
- 25 10.10 el gen rpoS que codifica el factor sigma38,
- 10.11 el gen aspA que codifica la aspartato amonio liasa,
- 10.12 el gen aceB que codifica malato sintasa A.

Figura 1: Mapa del vector pTrc99AyfiD

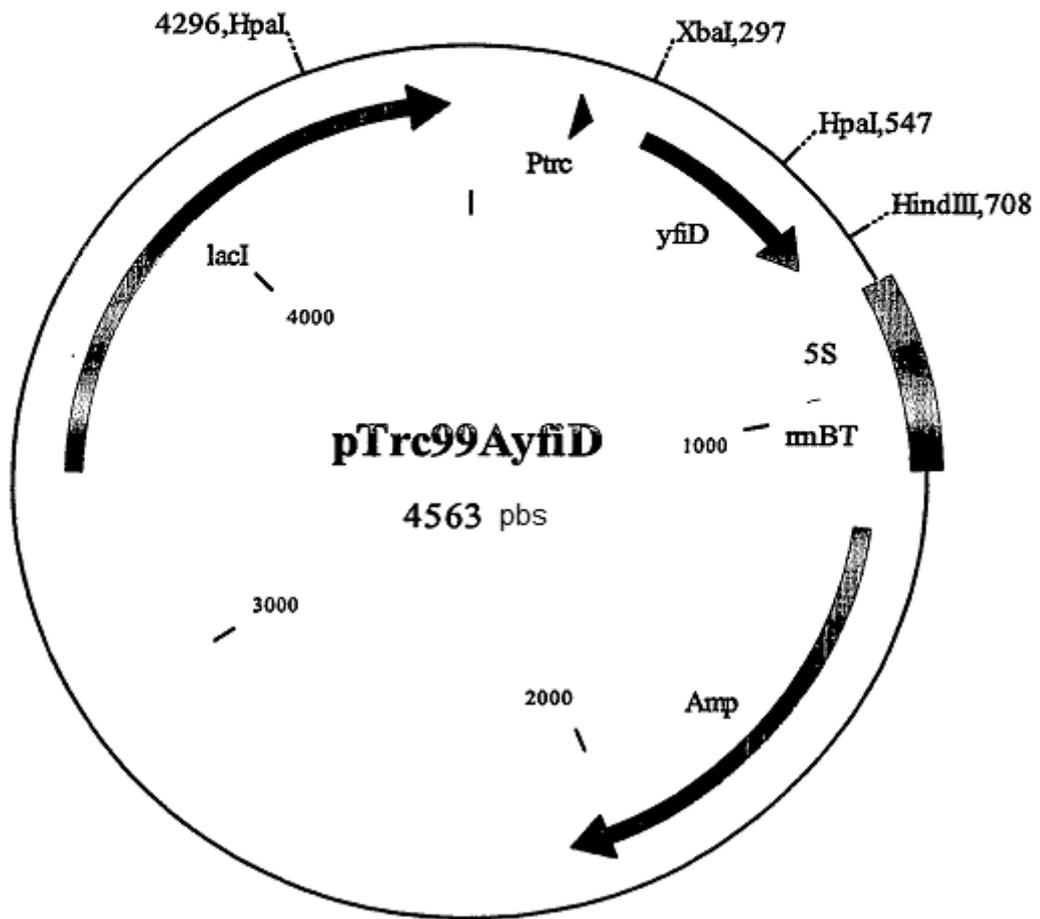


Figura 2: Mapa del vector pTrc99Apf1B

