

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 352**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/08** (2006.01)

**C12R 1/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2004 PCT/EP2004/014279**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2005 WO05064001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2004 E 04803898 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 1697531**

54 Título: **Procedimiento para preparar L-aminoácidos usando cepas de la familia Enterobacteriaceae**

30 Prioridad:

**24.12.2003 DE 10361192**

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

**24.10.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RIEPING, MECHTHILD**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 587 352 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 preparar L-aminoácidos usando cepas de la familia Enterobacteriaceae.

**Campo de la invención**

5 Esta invención se refiere a un procedimiento para preparar L-aminoácidos, en particular L-treonina, usando microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae, en los que se sobreexpresa el marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) denominado yodA y a estos microorganismos.

**Técnica anterior**

Los L-aminoácidos, en particular L-treonina, se usan en medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y, muy en particular, en nutrición animal.

10 Se sabe que los L-aminoácidos se preparan por fermentación de cepas de la Enterobacteriaceae, en particular Escherichia coli (E. coli) y Serratia marcescens. Debido a la gran importancia, se hacen constantemente esfuerzos para mejorar los métodos de preparación. Las mejoras metodológicas se pueden referir a las mediciones de fermentación de una naturaleza técnica, tal como agitación o suministro con oxígeno, o a la composición del medio nutriente, tal como la concentración de azúcar durante la fermentación o al tratamiento final en forma de producto,  
15 por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico, o a las características intrínsecas de realización del propio microorganismo.

Se usan métodos para mutagénesis, selección y elección de mutante para mejorar las características de realización de estos microorganismos. Esto hace posible obtener cepas que sean resistentes a antimetabolitos, tales como el ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivalérico (AHV, por sus siglas en inglés) análogo de treonina, o auxotróficas para metabolitos que son de importancia regulatoria y producen L-aminoácidos tales como L-treonina.  
20

Desde hace años, los métodos de la tecnología de ADN recombinante también se han usado para mejorar cepas productoras de L-aminoácidos de la familia Enterobacteriaceae, por multiplicación de genes de biosíntesis de aminoácidos individuales e investigando el efecto que esto tiene sobre la producción. Una información exhaustiva sobre la biología celular y la biología molecular de Escherichia coli y Salmonella se puede encontrar en Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2ª edición, ASM Press, Washington, D. C., USA, (1.996).  
25

**Objeto de la invención**

Los propios autores han fijado el objeto de proporcionar nuevas medidas para mejorar la preparación fermentativa de L-aminoácidos, en particular L-treonina.

**30 Sumario de la invención**

La invención se refiere a microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae que contienen un ORF de yodA sobreexpresado, que codifica un polipéptido que se refiere que es una proteína de unión a metal putativa y que produce L-aminoácidos, en particular L-treonina, de una manera mejorada.

35 Los microorganismos que no son recombinantes para el ORF de yodA y que no contienen ORF de yodA potenciado, se usan en cada caso como el punto de partida para la comparación.

Estos microorganismos incluyen, en particular, microorganismos de la familia Enterobacteriaceae en la que se potencia un polinucleótido, que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es al menos 95%, preferiblemente al menos 98% o al menos 99%, en particular preferiblemente 99,5% y, muy en particular preferiblemente, 100%, idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo SEC ID N° 4 y SEC ID N° 6.  
40

Se da preferencia a las secuencias de aminoácidos que son idénticas a las de SEC ID N° 4 y SEC ID N° 6.

Dichos microorganismos contienen polinucleótidos sobreexpresados seleccionados del grupo:

a) polinucleótido con la secuencia de nucleótidos SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5;

45 b) polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que corresponde a SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5 dentro de los límites de la degeneración del código genético;

c) secuencia de polinucleótidos con una secuencia que se hibrida, en condiciones rigurosas, con la secuencia que es complementaria a la secuencia SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5;

d) polinucleótido con una secuencia SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5 que contiene mutantes de sentido funcionalmente neutro,

codificando los polinucleótidos una proteína de unión a metal putativa.

5 La invención también se refiere a un procedimiento para preparar de manera fermentativa L-aminoácidos, en particular L-treonina, usando microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae que ya producen L-aminoácidos y en los que se sobreexpresa al menos el marco abierto de lectura (ORF) denominado yodA, o las secuencias de nucleótidos que codifican su producto génico.

Se da preferencia a usar los microorganismos descritos.

#### Descripción detallada de la invención

10 La mención, en lo que sigue, de L-aminoácidos o aminoácidos significa uno o más aminoácidos, incluyendo sus sales, seleccionados del grupo: 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 da preferencia particular a L-treonina.

15 En relación a esto, el término “potenciación” describe un aumento en la actividad intracelular o la concentración de una o más enzimas o proteínas, que se codifican por el correspondiente ADN, en un microorganismo, cuyo aumento se consigue, por ejemplo, aumentando el número de copias del gen o los genes, o del ORF o los ORF, por al menos una (1) copia, por unión de manera funcional de un activador fuerte al gen, o usando un gen o alelo u ORF que codifica una correspondiente enzima o proteína con una alta actividad, o combinando, donde sea apropiado, estas medidas.

20 Un segmento de una secuencia de nucleótidos que codifica, o puede codificar, una proteína o polipéptido o ácido ribonucleico a la que la técnica anterior no puede asignar ninguna función se describe como que es un marco abierto de lectura (ORF). Después de que se haya asignado una función al segmento de la secuencia de nucleótidos en cuestión, el segmento se refiere en general como que es un gen. En general, se entiende que los alelos son formas alternativas de un gen determinado. Las formas se caracterizan por diferencias en sus secuencias de nucleótidos.

25 En general, la proteína codificada por una secuencia de nucleótidos, es decir, un ORF, un gen o un alelo, o el ácido ribonucleico codificado, se describe como que es un producto génico.

30 En general, las medidas de potenciación, en particular sobreexpresión, aumentan la actividad o la concentración de la correspondiente proteína por al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, a lo sumo hasta 1.000% o 2.000%, basado en la de la proteína natural o en la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo o cepa precursora que no es recombinante para la correspondiente enzima o proteína. Un microorganismo o cepa precursora no recombinante se entiende que es el microorganismo sobre el cual se implementan las medidas según la invención.

La invención se refiere a un procedimiento para preparar L-aminoácidos por fermentación de microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae, cuyo procedimiento se caracteriza por que:

35 a) los microorganismos como se define en las reivindicaciones 1-14, se cultivan en un medio en condiciones en las que el L-aminoácido deseado está enriquecido en el medio o en las células y

b) el L-aminoácido deseado se aísla con, en el caso de que sea apropiado, constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa, en su totalidad o en porciones ( $\geq 0$  a 100%), quedando en el producto aislado o siendo eliminado completamente.

40 Los microorganismos, que son recombinantes, que contienen marco abierto de lectura (ORF) sobreexpresado denominado yodA y que son asimismo parte de la materia de la presente invención, pueden producir L-aminoácidos a partir de: glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasas, en el caso de que sea apropiado almidón y en el caso de que sea apropiado celulosa, o a partir de glicerol y etanol. Los microorganismos son representativos de la familia Enterobacteriaceae, seleccionados de los géneros Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia. Se prefieren los géneros Escherichia y Serratia. Se tienen que mencionar las especies Escherichia coli y Serratia marcescens en particular, en el caso del género Escherichia y, respectivamente, en el caso del género Serratia.

45 En general, se producen microorganismos recombinantes por transformación, transducción o conjugación, o una combinación de estos métodos, con un vector que contiene el ORF deseado, el gen deseado, un alelo de este ORF o gen o partes de los mismos, y/o un activador que potencie la expresión del ORF o gen. Este activador puede ser el activador que se ha producido, como resultado de potenciar la mutación, de la secuencia reguladora endógena situada aguas arriba del gen u ORF, o puede haber sido fusionado un activador eficaz al gen u ORF.

Son ejemplos de cepas adecuadas, en particular productoras de L-treonina, del género *Escherichia*, en particular de la especie *Escherichia coli*:

- <i>Escherichia coli</i> H4581	(Patente Europea EP 0 301 572)
- <i>Escherichia coli</i> KY10935	(Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61 (11): 1.877-1.882 (1.997))
- <i>Escherichia coli</i> VNIIGenetika MG442	(Patente de EE.UU. A-4278 765)
- <i>Escherichia coli</i> VNIIGenetika M1	(Patente de EE.UU. A-4.321.325)
- <i>Escherichia coli</i> VNIIGenetika 472T23	(Patente de EE.UU. A-5.631.157)
- <i>Escherichia coli</i> BKIIM B-3996	(Patente de EE.UU. A-5.175.107)
- <i>Escherichia coli</i> kat 13	(Patente Internacional WO 98/04715)
- <i>Escherichia coli</i> KCCM-10132	(Patente Internacional WO 00/09660)

5 Ejemplos de cepas productoras de L-treonina adecuadas del género *Serratia*, en particular de la especie *Serratia marcescens*, son:

- *Serratia marcescens* HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38 (6): 1.045-1.051 (1.979))
- *Serratia marcescens* TLr156 (Gene 57 (2-3): 151-158 (1.987))
- *Serratia marcescens* T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37 (3): 255-265 (1.992))

10 Las cepas productoras de L-treonina de la familia Enterobacteriaceae poseen preferiblemente, entre otros, una o más de las características genéticas o fenotípicas seleccionadas del grupo:

15 resistencia a ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxivalérico, resistencia a tialisina, resistencia a etionina, resistencia a  $\alpha$ -metilserina, resistencia a ácido diaminosuccínico, resistencia a ácido  $\alpha$ -aminobutírico, resistencia a borrelidina, resistencia a ácido ciclopentanocarboxílico, resistencia a rifampicina, resistencia a análogos de valina tales como hidroxamato de valina, resistencia a análogos de purina, tales como 6-dimetilaminopurina, requerimiento para L-metionina, en el caso de que sea apropiado el requerimiento parcial y compensable para L-isoleucina, requerimiento para ácido meso-diaminopimélico, auxotrofia con respecto a dipéptidos que contienen treonina, resistencia a L-treonina, resistencia a refinato de treonina, resistencia a L-homoserina, resistencia a L-lisina, resistencia a L-metionina, resistencia a ácido L-glutámico, resistencia a L-aspartato, resistencia a L-leucina, resistencia a L-fenilalanina, resistencia a L-serina, resistencia a L-cisteína, resistencia a L-valina, sensibilidad a fluoropiruvato, deshidrogenasa treonina defectuosa, en el caso de que sea apropiado capacidad para utilizar sacarosa, potenciación del operón de treonina, potenciación de la homoserina deshidrogenasa l-aspartato cinasa I, preferiblemente de la forma resistente a la retroalimentación, potenciación de la homoserina cinasa, potenciación de la treonina sintasa, potenciación de aspartato cinasa, en el caso de que sea apropiado de la forma resistente a la retroalimentación, potenciación de aspartato semialdehído deshidrogenasa, potenciación de fosfoenolpiruvato carboxilasa, en el caso de que sea apropiado de la forma resistente a retroalimentación, potenciación de la fosfoenolpiruvato sintasa, potenciación de transhidrogenasa, potenciación del producto génico RhtB, potenciación del producto génico RhtC, potenciación del producto génico YfiK, potenciación de una piruvato carboxilasa y atenuación de la formación de ácido acético.

30 Se ha encontrado que, después de que se haya o se hayan sobreexpresado el gen de *yodA* o marco abierto de lectura (ORF), o sus alelos, los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae producen L-aminoácidos, en particular L-treonina, de una manera mejorada.

35 Las secuencias de nucleótidos de los genes o marcos abiertos de lectura (los ORF) de *Escherichia coli* pertenecen a la técnica anterior y se pueden obtener de la secuencia de genoma de *Escherichia coli* publicada por Blattner et al. (Science 277: 1.453-1.462 (1.997)). Se sabe que las enzimas que son endógenas para el huésped (metionina aminopeptidasa) pueden escindir el aminoácido N-terminal metionina.

## ES 2 587 352 T3

Las secuencias de nucleótidos para el ORF de yodA son conocidas asimismo a partir de *Shigella flexneri*, que también pertenece a la familia Enterobacteriaceae.

Se describe el ORF de yodA de *Escherichia coli* K12, entre otros, por los siguientes datos:

Denominación:	marco abierto de lectura
Función:	referida como que es una proteína de unión a metal putativa; expresión aumentada en relación a cadmio y tensión de peróxido de hidrógeno
Descripción:	el marco abierto de lectura de yodA codifica una proteína de 24,8 KD; el punto isoeléctrico es 5,9; estando localizado de manera cromosómica, está presente, por ejemplo en el caso de <i>Escherichia coli</i> K12 MG1655, en la región intergénica entre el marco abierto de lectura b1972, que codifica una proteína de membrana putativa y el ORF de yodB, que codifica un citocromo b putativo
Referencias:	Blattner et al., <i>Science</i> 5; 277 (5.331): 1.453-1.474 (1.997).
	Puskarova et al., <i>Microbiology</i> 148 (PT 12): 3.801-3.811 (2.002),
	David et al., <i>Acta Crystallographica Section D. Biological Crystallography</i> 58 (PT 7): 1.243-1.245 (2.002),
	David et al., <i>The Journal of Biological Chemistry</i> 278 (44): 43.728-43.735 (2.003)
Nº Acceso:	AE000288
Nombre del gen alternativo:	b1973

- 5 Las secuencias de ácidos nucleicos se pueden obtener de las bases de datos que pertenecen al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) de la Biblioteca Nacional de Medicina (Bethesda, MD, USA), de la base de datos de secuencias de nucleótidos que pertenece a los Laboratorios Europeos de Biología Molecular (EMBL, Heidelberg, Alemania y Cambridge, RU) o de la base de datos de ADN japonesa (DDBJ, Mishima, Japón).
- 10 Para mayor claridad, se proporciona la secuencia de nucleótidos conocida del ORF de yodA de *Escherichia coli* en la SEC ID Nº 3 y la secuencia conocida para yaaU-ORF de *Shigella flexneri* (AE015219) en la SEC ID Nº 5. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas codificadas por estos marcos de lectura se representan como SEC ID Nº 4 y, respectivamente, SEC ID Nº 6.
- 15 Los marcos abiertos de lectura descritos en el texto proporcionado se pueden usar según la invención. Es posible además usar alelos de los genes o marcos abiertos de lectura que resultan de la degeneración del código genético o como resultado de mutaciones de sentido funcionalmente neutro. Se prefiere el uso de genes endógenos o marcos abiertos de lectura endógenos.
- “Genes endógenos” o “secuencias de nucleótidos endógenos” se entiende que son los genes o marcos abiertos de lectura o alelos o secuencias de nucleótidos que están presentes en la población de una especie.
- 20 Se describe que los alelos adecuados del ORF de yodA que contienen mutaciones de sentido funcionalmente neutras incluyen, entre otros, los que conducen a, a lo sumo 20 o a lo sumo 10, preferiblemente a, a lo sumo 5 o a, a lo sumo 3, muy en particular preferiblemente a, a lo sumo 2 o a, a lo sumo una, sustitución de aminoácidos conservadora en la proteína que codifican.
- 25 En el caso de los aminoácidos aromáticos, se dice que las sustituciones son conservadoras cuando se sustituyen entre sí fenilalanina, triptófano y tirosina. En el caso de los aminoácidos hidrófobos, se dice que las sustituciones son conservadoras cuando se sustituyen entre sí leucina, isoleucina y valina. En el caso de los aminoácidos polares, se dice que las sustituciones son conservadoras cuando se sustituyen entre sí glutamina y asparagina. En el caso de los aminoácidos básicos, se dice que las sustituciones son conservadoras cuando se sustituyen entre sí arginina,

lisina e histidina. En el caso de los aminoácidos ácidos, se dice que las sustituciones son conservadoras cuando se sustituyen entre sí ácido aspártico y ácido glutámico. En el caso de los aminoácidos que contienen grupo hidroxilo, se dice que las sustituciones son conservadoras cuando se sustituyen entre sí serina y treonina.

5 También se describe que de la misma manera, también es posible usar las secuencias de nucleótidos que codifican variantes de dichas proteínas que contienen adicionalmente, como el N terminal o C terminal, una extensión o truncamiento por al menos un (1) aminoácido. Esta extensión o truncamiento asciende a no más de 50, 40, 30, 20, 10, 5, 3 ó 2 aminoácidos o restos de aminoácido.

10 Los alelos adecuados también incluyen los que codifican proteínas en las que al menos un (1) aminoácido ha sido insertado o suprimido. El número máximo de tales cambios, denominados los indel, puede afectar a 2, 3, 5, 10 ó 20, en ningún caso, sin embargo, más de 30, aminoácidos.

Los alelos adecuados además incluyen aquéllos que se pueden obtener por hibridación, en particular en condiciones rigurosas, usando la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5, o partes de las mismas, en particular las regiones codificadoras, o las secuencias que son complementarias a las mismas.

15 El experto puede encontrar instrucciones para identificar secuencias de ADN mediante hibridación en, entre otros, el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de la compañía Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1.993) y en Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1.991)). La hibridación tiene lugar en condiciones rigurosas; esto es, los únicos híbridos que se tienen que formar son aquéllos en los que la sonda y la secuencia diana, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son al menos 80% idénticos. Se sabe que la exigencia de la hibridación, incluyendo las etapas de lavado, está influenciada o determinada, por variación de la composición tampón, la temperatura y la concentración de sal. La reacción de hibridación se realiza en general con una rigurosidad que es relativamente baja cuando se compara con la de las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, RU, 1.996).

25 Por ejemplo, se puede usar un tampón que corresponde a tampón 5x SSC, a una temperatura de aprox. 50°C-68°C, para la reacción de hibridación. En estas condiciones, las sondas también se pueden hibridar con polinucleótidos que presenten menos de 80% de identidad con la secuencia de la sonda. Estos últimos híbridos son menos estables y se retiran por lavado en condiciones rigurosas. Esto se puede conseguir, por ejemplo, disminuyendo la concentración de sal hasta 2x SSC y, cuando sea apropiado, con posterioridad a 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1.995), ajustándose la temperatura a aprox. 50°C-68°C, aprox. 52°C-68°C, aprox. 54°C-68°C, aprox. 56°C-68°C, aprox. 58°C-68°C, aprox. 60°C-68°C, 30 aprox. 62°C-68°C, aprox. 64°C-68°C, o aprox. 66°C-68°C. Se prefieren los intervalos de temperatura de aprox. 64°C-68°C o aprox. 66°C-68°C. Es posible, cuando sea apropiado, disminuir la concentración de sal hasta una concentración que corresponda a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Los fragmentos de polinucleótidos que poseen, por ejemplo, al menos 80% o al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, de identidad con la secuencia de la sonda que se emplea, o con las secuencias de nucleótidos representadas en la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5, se pueden aislar aumentando la temperatura de hibridación escalonadamente de 50°C a 68°C en etapas de aprox. 1-2°C. Se pueden obtener comercialmente más instrucciones para la hibridación en la forma de estuches (por ejemplo, DIG Easy Hyb de la compañía Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° Catálogo 16035558). Las secuencias de nucleótidos que se obtienen así codifican polipéptidos que poseen al menos 90%, en particular al menos 95%, 40 preferiblemente al menos 98% o al menos 99%, muy en particular preferiblemente 99,5%, de identidad con las secuencias de aminoácidos representadas en la SEC ID N° 4 o SEC ID N° 6.

Para conseguir una potenciación, es posible, por ejemplo, aumentar la expresión de los genes o marcos abiertos de lectura o alelos. También se describe aumentar las propiedades catalíticas de la proteína. Ambas medidas se pueden combinar, cuando sea apropiado.

45 Para conseguir sobreexpresión, es posible, por ejemplo, aumentar el número de copias de los correspondientes genes o marcos abiertos de lectura o mutar el precursor y la región reguladora o el sitio de unión de ribosomas que se sitúa aguas arriba del gen estructural. Las casetes de expresión que se incorporan aguas arriba del gen estructural actúan de la misma manera. Incorporando activadores inducibles, es posible adicionalmente aumentar la expresión durante el transcurso de la producción fermentativa de L-aminoácido, en particular L-treonina; también puede ser ventajoso usar, para la expresión de los genes, activadores que permitan obtener una expresión de los genes cronológica diferente. La expresión se mejora asimismo por medidas para prolongar la duración de la vida del ARNm. La actividad enzimática se potencia también además evitando que se descomponga la proteína enzimática. Los ORF, genes o construcciones de genes pueden estar presentes en plásmidos con diferentes números de copias o estar integrados y multiplicados en el cromosoma. Como una alternativa, también es posible conseguir 55 sobreexpresión de los genes afectados por modificación de la composición del medio y el comportamiento del cultivo.

Los métodos para conseguir la sobreexpresión se describen adecuadamente en la técnica anterior, por ejemplo, en Makrides et al. (Microbiological Reviews 60 (3), 512-538 (1.996)). Usar vectores aumenta el número de copias por al menos una (1) copia. Los vectores usados pueden ser plásmidos, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.538.873. Los vectores usados pueden ser asimismo fagos, por ejemplo, el fago Mu, como se describe en la Patente Europea EP 0 332 448, o el fago lambda ( $\lambda$ ). Se puede conseguir también un aumento en el número de copias por incorporación de una copia adicional a otro sitio en el cromosoma, por ejemplo, en el sitio att del fago  $\lambda$  (Yu y Court, Gene 223, 77-81 (1.998)). La patente de EE.UU. 5.939.307 indica que fue posible aumentar la expresión por incorporación de casetes de expresión o activadores, tales como el activador de tac, el activador de trp, el activador de lpp, o el activador P<sub>L</sub> o activador de P<sub>R</sub> del fago  $\lambda$ , por ejemplo, aguas arriba del operón de treonina cromosómico. Es posible usar los activadores del fago T7, los activadores de engranaje o el activador de nar de la misma manera. Los casetes de expresión o activadores de esta naturaleza también pueden ser usados para sobreexpresar genes ligados a plásmido, como se describe en la patente europea EP 0 593 792. Usar el alelo lacI<sup>Q</sup> hace posible, a su vez, controlar la expresión de los genes ligados a plásmido (Glascock y Weickert, Gene 223, 221-231 (1.998)). Es posible además que las actividades de los activadores se aumenten modificando sus secuencias mediante el uso de inserción o inserciones y/o supresión o supresiones para efectuar una o más sustituciones de nucleótidos. Se puede conseguir una expresión de genes cronológica diferente, por ejemplo, usando el activador fis dependiente de la fase de crecimiento, como se describe en Walquer et al. (Journal of Bacteriology 181: 1.269-80 (1.999)).

El experto en la materia puede encontrar instrucciones generales con respecto a esto en, entre otros, Chang y Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1.141-1.156 (1.978)), Hartley y Gregori (Gene 13: 347-353 (1.981)), Amann y Brosius (Gene 40: 183-190 (1.985)), de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1.983)), LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1.993)), Patente de EE.UU. PCT/US97/13359, Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1.991)), Quandt y Klipp (Gene 80: 161-169 (1.989)), Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4.617-4.622 (1.989)) y Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1.998)) y en libros de texto conocidos que tratan de genética y biología molecular.

Es posible usar vectores de plásmidos que se puedan replicar en Enterobacteriaceae, tales como vectores de clonación procedentes de pACYC184 (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1.991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1.988)) o derivados de pSC101 (Vocke y Bastia; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80 (21): 6.557-6.561 (1.983)). En un procedimiento de acuerdo con la invención, es posible usar una cepa transformada de vector de plásmido, soportando el vector de plásmido al menos una secuencia de nucleótidos o alelo que codifica el ORF de yodA o su producto génico.

El término "transformación" se entiende que significa la aceptación de un ácido nucleico aislado por un huésped (microorganismo).

Es posible asimismo usar intercambio de secuencias (Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4.617-4.622 (1.989)), conjugación o transducción para transferir mutaciones, que afectan a la expresión de los respectivos genes o marcos abiertos de lectura, en diferentes cepas.

Explicaciones más detalladas con respecto a los conceptos de genética y biología molecular se pueden encontrar en libros de texto que tratan de genética y biología molecular, tales como el libro de texto por Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4ª ed., Springer Verlag, Nueva York (USA), 2.000) o el libro de texto por Berg, Tymoczko y Stryer (Biochemistry, 5ª ed., Freeman y Company, Nueva York (USA), 2.002) o el manual de Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, (Conjunto de 3 Volúmenes), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2.001).

Cuando se usan cepas de la familia Enterobacteriaceae para producir L-aminoácidos, en particular L-treonina, también puede ser ventajoso, además de sobreexpresar el marco abierto de lectura de yodA, para potenciar una o más enzimas de la ruta de biosíntesis de treonina conocida o enzimas del metabolismo anaplerótico o enzimas para producir nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido o enzimas de glicolisis, o enzimas PTS, o enzimas de metabolismo del azufre. Se da preferencia en general a usar genes endógenos.

Así, es posible, por ejemplo, potenciar de manera simultánea, en particular sobreexpresar, uno o más de los genes seleccionados del grupo:

- al menos un gen del operón thrABC codificador de la aspartato cinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina cinasa y treonina sintasa (Patente de EE.UU. A-4.278.765),
- el gen pyc codificador de piruvato carboxilasa Corynebacterium glutamicum (Patente Internacional WO 99/18228),
- el gen pps codificador de la fosfoenolpiruvato sintasa (Molecular and General Genetics 231 (2): 332-336 (1.992)),

- el gen ppc codificador de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (Patente Internacional WO 02/064808),
- los genes pntA y pntB codificadores de las subunidades de la piridina transhidrogenasa (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1.986)),
- 5     • el gen rhtB codificador de la proteína mediadora de la resistencia a homoserina (Patente Europea EP-A-0 994 190),
- el gen rhtC codificador de la proteína mediadora de la resistencia a treonina (Patente Europea EP-A-1 013 765),
- el gen thrE de *Corynebacterium glutamicum* codificador de la proteína portadora de exportación de treonina (Patente Internacional WO 01/92545),
- 10    • el gen gdhA codificador de glutamato deshidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5.257-5.266 (1.983); Gene 23: 199-209 (1.983)),
- el gen pgm codificador de la fosfoglucomutasa (Patente Internacional WO 03/004598),
- el gen fba codificador de la fructosa bifosfato aldolasa (Patente Internacional WO 03/004664),
- 15    • el gen ptsH de operón ptsHlcr codificador de la proteína fosfohistidina hexosa fosfotransferasa del sistema PTS de la fosfotransferasa (Patente Internacional WO 03/004674),
- el gen ptsI del operón ptsHlcr codificador de la enzima I del sistema PTS de la fosfotransferasa (Patente Internacional WO 03/004674),
- el gen crr del operón ptsHlcr codificador del componente IIA específico de la glucosa del sistema PTS de la fosfotransferasa (Patente Internacional WO 03/004674),
- 20    • el gen ptsG codificador del componente IIBC específico de la glucosa (Patente Internacional WO 03/004670),
- el gen lrp codificador del regulador del regulón leucina (Patente Internacional WO 03/004665),
- el gen fadR codificador del regulador del regulón fad (Patente Internacional WO 03/038106),
- 25    • el gen iclR codificador del regulador del metabolismo intermediario central (Patente Internacional WO 03/038106),
- el gen ahpC del operón ahpCF codificador de la subunidad pequeña de la alquilhidroperóxido reductasa (Patente Internacional WO 03/004663),
- el gen ahpF del operón ahpCF codificador de la subunidad grande de la alquilhidroperóxido reductasa (Patente Internacional WO 03/004663),
- 30    • el gen cysK codificador de la cisteína sintasa A (Patente Internacional WO 03/006666),
- el gen cysB codificador del regulador de regulón cys (Patente Internacional WO 03/006666),
- el gen cysJ del operón cysJIH codificador de la flavoproteína sulfito reductasa de NADPH (Patente Internacional WO 03/006666),
- 35    • el gen cysI del operón cysJIH codificador de la hemoproteína sulfito reductasa de NADPH (Patente Internacional WO 03/006666),
- el gen cysH del operón cysJIH codificador de la adenilil sulfato reductasa (Patente Internacional WO 03/006666),
- el gen rseA del operón rseABC codificador de una proteína de membrana que posee actividad anti-sigmaE (Patente Internacional WO 03/008612),
- 40    • el gen rseC del operón rseABC codificador de un regulador global del factor SigmaE (Patente Internacional WO 03/008612),

- el gen *sucA* del operón *sucABCD* codificador de la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa (Patente Internacional WO 03/008614),
- el gen *sucB* del operón *sucABCD* codificador de la subunidad E2 de dihidrolipoil transsuccinasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa (Patente Internacional WO 03/008614),
- 5 • el gen *sucC* del operón *suc ABCD* codificador de la subunidad  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa (Patente Internacional WO 03/008615),
- el gen *sucD* del operón *sucABCD* codificador de la subunidad  $\alpha$  de la succinil-CoA sintetasa (Patente Internacional WO 03/008615),
- 10 • el gen *aceE* codificador del componente E1 del complejo piruvato deshidrogenasa (Patente Internacional WO 03/076635),
- el gen *aceF* codificador del componente E2 del complejo piruvato deshidrogenasa (Patente Internacional WO 03/076635),
- el gen *rseB* codificador del regulador de la actividad del factor SigmaE (Molecular Microbiology 24 (2): 355-371 (1.997)),
- 15 • el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) de *yaaU* de *Escherichia coli* (Número de Acceso AE005181 del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, USA, (Patente Alemana DE10361268.8)).

Para el fin de producir L-aminoácidos, en particular L-treonina, también puede ser ventajoso, además de sobreexpresar el marco abierto de lectura de *yodA*, para atenuar, en particular eliminar o reducir, la expresión de uno o más de los genes seleccionados del grupo:

- el gen *tdh* codificador de la treonina deshidrogenasa (Journal of Bacteriology 169: 4.716-4.721 (1.987)),
- el gen *mdh* codificador de la malato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1.987)),
- 25 • el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) de *yjfA* de *Escherichia coli* (Número de Acceso AAC77180 del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, USA, (Patente Internacional WO 02/29080)),
- el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) *ytfP* de *Escherichia coli* (Número de Acceso AAC77179 del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD, USA, (Patente Internacional WO 02/29080)),
- 30 • el gen *pckA* codificador de la enzima fosfoenolpiruvato carboxinasa (Patente Internacional WO 02/29080),
- el gen *poxB* codificador de la piruvato oxidasa (Patente Internacional WO 02/36797),
- el gen *dgsA* (Patente Internacional WO 02/081721), que también se conoce con la denominación gen *mlc*, codificador del regulador de DgsA del sistema de la fosfotransferasa,
- 35 • el gen *fruR* codificador de represor de la fructosa (Patente Internacional WO 02/081698), que también se conoce con la denominación gen *cra*,
- el gen *rpoS* codificador de factor Sigma<sup>38</sup> (Patente Internacional WO 01/05939), que también se conoce con la denominación gen *katF*, y
- el gen *aspA* codificador de la aspartato amonio liasa (Patente Internacional WO 03/008603).

40 Con relación a esto, el término "atenuación" describe la reducción o eliminación de la actividad intracelular o la concentración de una o más enzimas o proteínas, que están codificadas por el correspondiente ADN, en un microorganismo, haciéndose uso, por ejemplo, de un activador que es más débil que en el microorganismo o cepa precursora que no es recombinante para la correspondiente enzima o proteína, o de un gen o alelo que codifica una correspondiente enzima o proteína con una actividad menor, o la correspondiente enzima o proteína, o el marco abierto de lectura o el gen, que está inactivado, y, cuando sea apropiado, combinándose estas mediciones.

Las mediciones de atenuación en general disminuyen la actividad o concentración de la correspondiente proteína hasta de 0 a 75%, de 0 a 50%, de 0 a 25%, de 0 a 10%, o de 0 a 5%, de la actividad o concentración de la proteína natural o de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo o cepa precursora que sea para la correspondiente enzima o proteína. El microorganismo o cepa precursora no recombinante se entiende que es el microorganismo sobre el cual se implementan las mediciones según la invención.

Para conseguir una atenuación, es posible, por ejemplo, que se reduzca o elimine la expresión de los genes o marcos abiertos de lectura o las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas. Ambas mediciones se pueden combinar, cuando sea apropiado.

La expresión génica se puede reducir mediante la realización del cultivo de una manera adecuada, mediante modificación genética (mutación) de las estructuras de las señales para la expresión de los genes o bien mediante tecnología de ARN antisentido. Los ejemplos de estructuras de señal para expresión de los genes son genes represores, genes activadores, operadores, activadores, atenuadores, sitios de unión a ribosomas, el codón de iniciación y los terminadores. El experto en la materia puede, por ejemplo, encontrar información con respecto a esto, entre otros, en Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58: 191-195 (1.998)), Carrier y Keasling (*Biotechnology Progress* 15: 58-64 (1.999)), Franch y Gerdes (*Current Opinion in Microbiology* 3: 159-164 (2.000)) y libros de texto conocidos que tratan de genética y biología molecular, tales como el libro de texto por Knippers ("*Molekulare Genetik [Molecular Genetics]*", 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1.995) o ese por Winnacker ("*Gene und Klone [Genes y Clones]*", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1.990).

Las mutaciones que conducen a un cambio o reducción en las propiedades catalíticas de las proteínas enzimáticas son conocidas de la técnica anterior. Son ejemplos que se pueden mencionar los estudios por Qiu y Goodman (*Journal of Biological Chemistry* 272: 8.611-8.617 (1.997)), Yano et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5.511-5.515 (1.998)), Wente y Schachmann (*Journal of Biological Chemistry* 266: 20.833-20.839 (1.991)). Se pueden obtener informes completos de libros de texto conocidos que tratan de genética y biología molecular, tales como ese por Hagemann ("*Allgemeine Genetik [General genetics]*", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1.986).

Las mutaciones que se pueden considerar son transiciones, transversiones, inserciones y supresiones de al menos un (1) par de bases o nucleótido. Dependiendo del efecto que la sustitución de aminoácidos producida por la mutación presenta sobre la actividad enzimática, se hace referencia a mutaciones con cambio de sentido o a mutaciones sin sentido. La mutación con cambio de sentido conduce a la sustitución de un aminoácido determinado en una proteína con otro aminoácido, siendo la sustitución del aminoácido, en particular, una sustitución de aminoácidos no conservadora. Esta sustitución reduce la capacidad funcional o la actividad de la proteína y la reduce hasta un valor de 0 a 75%, de 0 a 50%, de 0 a 25%, de 0 a 10% o de 0 a 5%. La mutación sin sentido conduce a que se forme un codón de detención en la región codificadora del gen y, como resultado, a que se termine prematuramente la traducción. Las inserciones o supresiones de al menos un par de bases en un gen conducen a mutaciones desplazadas del marco, que a su vez dan como resultado que se incorporen aminoácidos incorrectos o a que se termine prematuramente la traducción. Si la mutación da como resultado que se forme un codón de detención en la región codificadora, esto conduce entonces asimismo a se termine la traducción prematuramente. Las supresiones de al menos uno (1) o más codones conduce también típicamente a la pérdida completa de la actividad enzimática.

Las instrucciones para generar estas mutaciones pertenecen a la técnica anterior y se pueden obtener a partir de libros de texto conocidos que tratan de genética y biología molecular, tales como el libro de texto por Knippers ("*Molekulare Genetik [Molecular genetics]*", 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1.995), ese por Winnacker ("*Gene und Klone [Genes and clones]*", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1.990) o ese por Hagemann ("*Allgemeine Genetik [General genetics]*", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1.986).

Se pueden incorporar mutaciones adecuadas en los genes en cepas adecuadas mediante sustitución de genes o alelos.

Un método común es el método descrito por Hamilton et al. (*Journal of Bacteriology* 171: 4.617-4.622 (1.989)), de sustitución génica usando pMAK705 derivado de pSC101 de replicación condicional. También se pueden usar otros métodos descritos en la técnica anterior, tales como el de Martínez-Morales et al. (*Journal of Bacteriology* 181: 7.143-7.148 (1.999)) o el de Boyd et al. (*Journal of Bacteriology* 182: 842-847 (2.000)).

Es posible asimismo transferir mutaciones en los genes respectivos o mutaciones que afecten a la expresión de los respectivos genes o marcos abiertos de lectura en diferentes cepas mediante conjugación o transducción.

Para el fin de producir L-aminoácidos, en particular L-treonina, también puede ser ventajoso, además sobreexpresar el marco abierto de lectura de yodA, para eliminar reacciones secundarias no deseables (Nakayama: "*Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms*", en: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londres, RU, 1.982).

Los microorganismos que se han preparado según la invención se pueden cultivar en un procedimiento discontinuo, en un procedimiento de lote alimentado, en un procedimiento de lote alimentado repetido o en un procedimiento continuo (Patente Alemana DE102004028859.3 o Patente de EE.UU. 5.763.230). Un sumario de métodos de cultivo conocidos se proporciona en el libro de texto por Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Bioprocess technology 1. Introduction to bioprocess technology] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1.991)) o en el libro de texto por Storhas (Bioreaktoren und periferer Einrichtungen [Bioreactors and peripheral installations] (Vieweg Verlag, Braunschweig/ Wiesbaden, 1.994)).

El medio de cultivo que se tiene que usar debe satisfacer adecuadamente los requerimientos de las cepas determinadas. El manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la Sociedad Americana para la Bacteriología (Washington D.C., USA, 1.981) contiene descripciones de medios de cultivos para diferentes microorganismos.

Los azúcares y carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasas, almidón y, donde sea apropiado, celulosa, aceites y grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de nuez de coco, ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como glicerol y etanol y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, se pueden usar como la fuente de carbono. Estas sustancias se pueden usar individualmente o como una mezcla.

Los compuestos que contienen nitrógeno, orgánicos, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración del maíz, 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, se pueden usar como la fuente de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno se pueden usar individualmente o como mezclas.

El ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato de dipotasio o las correspondientes sales que contienen sodio, se pueden usar como la fuente de fósforo. Además, el medio de cultivo tiene que contener sales de metal, tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que se requieren para el crecimiento. Finalmente, es posible usar sustancias que activen el crecimiento esencial, tales como aminoácidos y vitaminas, además de las sustancias ya mencionadas. Además, se pueden añadir precursores adecuados al medio de cultivo. Se pueden añadir sustancias de adición ya mencionadas al cultivo en la forma de una mezcla de una sola vez o alimentadas, de una manera adecuada, como proceda el cultivo.

En general, la fermentación se lleva a cabo a un pH de 5,5 a 9,0, en particular de 6,0 a 8,0. Los compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o agua amoniacal, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se usan, de una manera adecuada, para controlar el pH del cultivo. Los antiespumantes, tales como ésteres de poliglicol y ácido graso, se pueden usar para controlar la formación de espuma. Se pueden añadir sustancias adecuadas con una acción selectiva, por ejemplo, antibióticos, al medio para mantener la estabilidad de los plásmidos. Se introduce oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, tales como aire, en el cultivo para mantener las condiciones aerobias. La temperatura del cultivo es normalmente de 25°C a 45°C y preferiblemente de 30°C a 40°C. El cultivo se continúa hasta que se ha formado un máximo de L-aminoácidos o L-treonina. Este objetivo normalmente se consigue en 10 a 160 horas.

Se pueden analizar L-aminoácidos mediante cromatografía de intercambio aniónico seguido por derivatización de ninhidrina, como se describe en Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1.190-1.206 (1.958)); de otro modo, se pueden analizar por HPLC de fase inversa como se describe en Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1.167-1.174 (1.979)).

El procedimiento según la invención se usa para preparar de manera fermentativa L-aminoácidos, tales como L-treonina, L-iso-leucina, L-valina, L-metionina, L-homoserina, L-triptófano y L-lisina, en particular L-treonina.

Se ha depositado el siguiente microorganismo en el Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen [German collection of Microorganisms and cell cultures] (DSMZ, Braunschweig, Alemania) según el Tratado de Budapest:

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

La presente invención se clarifica a continuación con la ayuda de los ejemplos de implementación.

El medio mínimo (M9) y completo (LB) para Escherichia coli que se usa se describe por J. H. Miller (A short course in bacterial genetics (1.992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento de ADN de plásmido de Escherichia coli y todas las técnicas para restricción, ligadura y tratamiento con fosfatasa Klenow y fosfatasa de álcali, se realizan de acuerdo con Sambrook et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1.989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). A menos que se describa de otro modo, se transforma Escherichia coli según Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2.172-2.175 (1.989)).

La temperatura de incubación cuando se preparan cepas y transformantes es 37°C.

#### Ejemplo 1

Construcción del plásmido de expresión pTrc99AyodA.

5 Se multiplica el marco abierto de lectura de yodA de E. coli K12 usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y oligonucleótidos sintéticos. Se sintetizan cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) sobre la base de la secuencia de nucleótidos del marco abierto de lectura de yodA en E. coli K12 MG1655 (Número de Acceso AE000288, Blattner et al. (Science 277: 1.453-1.474 (1.997)). Los cebadores contienen secuencias para enzimas de restricción, marcándose estas secuencias por subrayado en las secuencias de nucleótidos que se representan a continuación. El cebador yodA\_5' contiene el sitio de escisión de restricción para NcoI, mientras el cebador yodA\_3' contiene ese para HincII.

yodA\_5´

5´ - GGTCCATGGCGATTTCGTCTTTACAAACTGG-3´ (SEC ID N° 1)

yodA\_3´

5´ - GGAATCCGTTATTGGTTAACTC - 3´ (SEC ID N° 2)

15 El ADN cromosómico de E. coli K12 MG1655 que se emplea para el PCR se aísla, según las instrucciones del fabricante, usando "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Los cebadores específicos pueden multiplicar un fragmento de ADN de aprox. 830 pb de tamaño (SEC ID N° 3) en condiciones PCR estándar (Innis et al. (1.990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) usando polimerasa de ADN Pfu (Promega Corporation, Madison, USA).

20 El producto PCR está ligado, según las instrucciones del fabricante, al vector pCR-Blunt II-TOPO (estuche de clonación Zero Blunt TOPO, Invitrogen, Groningen, Países Bajos), según las instrucciones del fabricante y lo último se transforma en la cepa de E. coli TOP10. Las células hospedadoras de plásmido se seleccionan de agar LB al que se ha añadido kanamicina a una concentración de 50 µg/ml. Después de que se ha aislado el ADN de plásmido, se escinde el vector con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV y, después de haber sido comprobado siendo separado en un gel de agarosa al 0,8%, se denomina pCRBluntyodA.

25 El vector pCRBluntyodA se restringe después con las enzimas de restricción NcoI y HincII y el fragmento de yodA se aísla usando un estuche de extracción de gel QIAquick (QIAGEN, Hilden, Alemania) después de que se haya separado en un gel de agarosa al 0,8%. El vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) se escinde con las enzimas NcoI y SmaI y se liga al fragmento de yodA aislado. La cepa de E. coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, La Jolla, USA) se transforma con la mezcla de ligadura y se seleccionan las células hospedadoras de plásmido sobre agar LB al que se ha añadido ampicilina a una concentración de 50 µg/ml. Después de que se haya aislado el ADN de plásmido, el hecho de que la clonación haya tenido éxito se puede demostrar llevando a cabo una escisión de control con la enzima EcoRV.

30 El plásmido se denomina pTrc99AyodA (Figura 1).

#### Ejemplo 2

Preparación de L-treonina usando la cepa MG442/pTrc99AyodA.

35 La cepa MG442 de E. coli productora de L-treonina se describe en la solicitud de patente de EE.UU. A-4.278.765 y se ha depositado en la colección nacional rusa de microorganismos industriales (VKPM, Moscú, Rusia) como CMIM B-1628 y en el Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen [German collection of microorganisms and cell cultures] (DSMZ, Braunschweig, Alemania), según el Tratado de Budapest, como DSM 16574.

40 La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99AyodA, como se describe en el ejemplo 1 y con el vector pTrc99A y las células hospedadoras de plásmido se seleccionan en agar LB que contiene 50 µg de ampicilina/ml. Esto da como resultado las cepas MG442/pTrc99AyodA y MG442/pTrc99A. Las colonias individuales seleccionadas se propagan después más sobre medio mínimo con la siguiente composición: 3,5 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O/l, 1,5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/l, 1 g de NH<sub>4</sub>Cl/l, 0,1 g de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O/l, 2 g de glucosa/l, 20 g de agar/l y 50 mg de ampicilina/l.

45 La formación de L-treonina se examina en cultivos de lotes de 10 ml que están contenidos en matraces Erlenmeier de 100 ml. Para esto, se inoculan y se incuban 10 ml de medio de cultivo preliminar de la siguiente composición: 2 g de extracto de levadura/l, 10 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/l, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O/l, 15 g de CaCO<sub>3</sub>/l, 20 g de

5 glucosa/l y 50 mg de ampicilina/l, a 37°C y 19 rad/s (180 rpm) durante 16 horas, en una incubadora ESR suministrada por Kühner AG (Birsfelden, Suiza). En cada caso, se inoculan 250 µl de este cultivo preliminar en 10 ml de medio de producción (25 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/l, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/l, 1 g de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O/l, 0,03 g de FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O/l, 0,018 g de MnSO<sub>4</sub>\*1H<sub>2</sub>O/l, 30 g de CaCO<sub>3</sub>/l, 20 g de glucosa/l y 50 mg de ampicilina/l) y el medio último se incuba a 37°C durante 48 horas. Se examina la formación de L-treonina por la cepa precursora MG442 de la misma manera, pero sin que se añada ampicilina al medio. Después de la incubación, se determina la densidad óptica (DO) de la suspensión de cultivo, a una longitud de onda de la medición de 660 nm, usando un fotómetro Dr. Lange LP2W (Düsseldorf, Alemania).

10 Se determina después la concentración de L-treonina que se ha formado, en el sobrenadante de cultivo, que se ha esterilizado por filtración, mediante cromatografía de intercambio iónico usando un analizador de aminoácidos Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Alemania) y reacción postcolumna implicando detección con ninhidrina.

El resultado del experimento se muestra 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/pTrc99AyodA	4,7	2,1

15 **Breve descripción de la Figura:**

Se tiene que considerar que los valores de longitud son aproximados. Las abreviaturas y los términos empleados tienen los siguientes significados:

- Amp: gen de resistencia a ampicilina
- lacI: gen para la proteína represora del activador de trc
- 20 • Ptrc: región activadora de trc, inducible con IPTG
- yodA: región codificadora del marco abierto de lectura de yodA
- 5S: región de ARNr 5S
- rrnBT: región terminadora de ARNr

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

- 25 • EcoRI: endonucleasa de restricción de Escherichia coli RY13
- EcoRV: endonucleasa de restricción de Escherichia coli B946
- HincII: endonucleasa de restricción de Haemophilus influenzae R<sub>c</sub>
- NcoI: endonucleasa de restricción de Rhodococcus sp. ATCC 19070

30

**Listado de secuencias**

<110> Degussa AG  
 ,

<120> Procedimiento para preparar L-aminoácidos usando cepas de la familia Enterobacteriaceae.

<130> 020319 BT

<160> 6

<170> PatentIn Version 3.2

<210> 1  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(30)  
 <223> yodA\_5'

<220>  
 <221> Sitio de escisión de restricción  
 <222> (4)..(9)  
 <223> NcoI

<400> 1  
 ggtccatggc gattcgtctt taaaaactgg 30

<210> 2  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> Cebador  
 <222> (1)..(22)  
 <223> yodA\_3'

<220>  
 <221> Restriction cleavage site  
 <222> (15)..(20)  
 <223> HincII

<400> 2  
 ggaatccggtt attggttaac tc 22

<210> 3  
 <211> 823  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

<220>  
 <221> yodA  
 <222> (1)..(823)

ES 2 587 352 T3

```

<223> producto PCR yodA
<220>
<221> CDS
<222> (6)..(656)
<223> yodA (b1973)-orf

<400> 3
ggtcc atg gcg att cgt ctt tac aaa ctg gct gtt gct tta ggt gtc ttt      50
      Met Ala Ile Arg Leu Tyr Lys Leu Ala Val Ala Leu Gly Val Phe
        1             5             10             15

att gtt agc gct cct gcc ttt tcg cat ggt cat cac tca cac ggc aaa      98
Ile Val Ser Ala Pro Ala Phe Ser His Gly His His Ser His Gly Lys
              20             25             30

ccc tta aca gag gtc gaa caa aaa gct gct aat ggt gtt ttt gat gat      146
Pro Leu Thr Glu Val Glu Gln Lys Ala Ala Asn Gly Val Phe Asp Asp
              35             40             45

gcc aat gta caa aac cga acg ctc agt gac tgg gat gga gtc tgg caa      194
Ala Asn Val Gln Asn Arg Thr Leu Ser Asp Trp Asp Gly Val Trp Gln
              50             55             60

tcc gtt tat cct tta ctg caa agt ggc aaa ctt gac ccc gtc ttt cag      242
Ser Val Tyr Pro Leu Leu Gln Ser Gly Lys Leu Asp Pro Val Phe Gln
              65             70             75

aag aaa gcg gat gca gat aaa act aaa aca ttt gct gaa att aaa gat      290
Lys Lys Ala Asp Ala Asp Lys Thr Lys Thr Phe Ala Glu Ile Lys Asp
              80             85             90             95

tat tat cac aaa ggt tat gca aca gat atc gag atg att ggc att gag      338
Tyr Tyr His Lys Gly Tyr Ala Thr Asp Ile Glu Met Ile Gly Ile Glu
              100            105            110

gac ggc att gtt gaa ttc cat aga aat aat gaa aca aca tcg tgt aaa      386
Asp Gly Ile Val Glu Phe His Arg Asn Asn Glu Thr Thr Ser Cys Lys
              115            120            125

tat gat tac gat gga tac aaa ata ctc acc tat aaa tca ggc aag aaa      434
Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Lys Ile Leu Thr Tyr Lys Ser Gly Lys Lys
              130            135            140

ggc gtt cgt tac tta ttc gaa tgt aaa gat cct gaa agc aaa gcc cct      482
Gly Val Arg Tyr Leu Phe Glu Cys Lys Asp Pro Glu Ser Lys Ala Pro
              145            150            155

aaa tat ata caa ttt agc gat cat ata att gca cca cga aaa tca tct      530
Lys Tyr Ile Gln Phe Ser Asp His Ile Ile Ala Pro Arg Lys Ser Ser
              160            165            170            175

cat ttt cac att ttt atg ggt aat gat tca cag caa tct tta tta aat      578
His Phe His Ile Phe Met Gly Asn Asp Ser Gln Gln Ser Leu Leu Asn
              180            185            190

gaa atg gaa aac tgg cca acg tat tat cca tat cag ttg agt agc gaa      626
Glu Met Glu Asn Trp Pro Thr Tyr Tyr Pro Tyr Gln Leu Ser Ser Glu
              195            200            205

gaa gtg gtc gag gaa atg atg tct cat tga gtattctcat gataacgcct      676
Glu Val Val Glu Glu Met Met Ser His
              210            215

cgatgccgct ttagtaagtt atcataactg ccaactgggcc atccacaaac gccactgaac      736

```

gcaagctagc tacagacacg ctcatcacta tgacgtgtct gtatattaat aagctaaccc 796  
gcattgagtt aaccaataac ggattcc 823

<210> 4  
<211> 216  
<212> PRT  
<213> Escherichia coli

<400> 4  
Met Ala Ile Arg Leu Tyr Lys Leu Ala Val Ala Leu Gly Val Phe Ile  
1 5 10 15  
Val Ser Ala Pro Ala Phe Ser His Gly His His Ser His Gly Lys Pro  
20 25 30  
Leu Thr Glu Val Glu Gln Lys Ala Ala Asn Gly Val Phe Asp Asp Ala  
35 40 45  
Asn Val Gln Asn Arg Thr Leu Ser Asp Trp Asp Gly Val Trp Gln Ser  
50 55 60  
Val Tyr Pro Leu Leu Gln Ser Gly Lys Leu Asp Pro Val Phe Gln Lys  
65 70 75 80  
Lys Ala Asp Ala Asp Lys Thr Lys Thr Phe Ala Glu Ile Lys Asp Tyr  
85 90 95  
Tyr His Lys Gly Tyr Ala Thr Asp Ile Glu Met Ile Gly Ile Glu Asp  
100 105 110  
Gly Ile Val Glu Phe His Arg Asn Asn Glu Thr Thr Ser Cys Lys Tyr  
115 120 125  
Asp Tyr Asp Gly Tyr Lys Ile Leu Thr Tyr Lys Ser Gly Lys Lys Gly  
130 135 140  
Val Arg Tyr Leu Phe Glu Cys Lys Asp Pro Glu Ser Lys Ala Pro Lys  
145 150 155 160  
Tyr Ile Gln Phe Ser Asp His Ile Ile Ala Pro Arg Lys Ser Ser His  
165 170 175  
Phe His Ile Phe Met Gly Asn Asp Ser Gln Gln Ser Leu Leu Asn Glu  
180 185 190  
Met Glu Asn Trp Pro Thr Tyr Tyr Pro Tyr Gln Leu Ser Ser Glu Glu  
195 200 205  
Val Val Glu Glu Met Met Ser His  
210 215

<210> 5  
<211> 651  
<212> ADN  
<213> Shigella flexneri

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(651)  
<223> región codificadora yodA

<400> 5

ES 2 587 352 T3

ttg gcg att cgt ctt cat aaa ctg gct gtt gct tta ggt gtc ttt att	48
Met Ala Ile Arg Leu His Lys Leu Ala Val Ala Leu Gly Val Phe Ile	
1 5 10 15	
gtt agc gct cct gcc ttt tcg cat ggt cat cat tct cat ggc aaa ccc	96
Val Ser Ala Pro Ala Phe Ser His Gly His His Ser His Gly Lys Pro	
20 25 30	
tta aca gag gtc gaa caa aaa gct gct aat ggt gtt ttt gat gat acc	144
Leu Thr Glu Val Glu Gln Lys Ala Ala Asn Gly Val Phe Asp Asp Thr	
35 40 45	
aat gta caa aac cga acg ctc agt gac tgg gat gga gtc tgg caa tcc	192
Asn Val Gln Asn Arg Thr Leu Ser Asp Trp Asp Gly Val Trp Gln Ser	
50 55 60	
gtt tac cct tta ctg caa agt ggc aaa ctt gat ccc gtc ttt cag aag	240
Val Tyr Pro Leu Leu Gln Ser Gly Lys Leu Asp Pro Val Phe Gln Lys	
65 70 75 80	
aaa gcg gat gca gat aaa acc aaa aca ttt gct gaa att aaa gat tat	288
Lys Ala Asp Ala Asp Lys Thr Lys Thr Phe Ala Glu Ile Lys Asp Tyr	
85 90 95	
tat cgc aaa ggt tat ccg aca gat atc gaa atg att ggc att gag gac	336
Tyr Arg Lys Gly Tyr Pro Thr Asp Ile Glu Met Ile Gly Ile Glu Asp	
100 105 110	
ggc att gtc gaa ttc cat aga aat aat gaa aca aca tcc tgt aaa tat	384
Gly Ile Val Glu Phe His Arg Asn Asn Glu Thr Thr Ser Cys Lys Tyr	
115 120 125	
gat tac gat gga tac aaa ata ctc acc tat aaa tca ggc aag aaa ggc	432
Asp Tyr Asp Gly Tyr Lys Ile Leu Thr Tyr Lys Ser Gly Lys Lys Gly	
130 135 140	
gtt cgt tac tta ttc gaa tgt aaa gat cct gaa agc aaa gcc cct aaa	480
Val Arg Tyr Leu Phe Glu Cys Lys Asp Pro Glu Ser Lys Ala Pro Lys	
145 150 155 160	
tat ata caa ttt agc gat cat ata att gca cca cga aaa tca tct cat	528
Tyr Ile Gln Phe Ser Asp His Ile Ile Ala Pro Arg Lys Ser Ser His	
165 170 175	
ttt cac att ttt atg ggt aat gat tcc cag caa tct tta ttg aat gaa	576
Phe His Ile Phe Met Gly Asn Asp Ser Gln Gln Ser Leu Leu Asn Glu	
180 185 190	
atg gaa aac tgg cca acg tat tat ccc tat cag ttg agt agc gaa gaa	624
Met Glu Asn Trp Pro Thr Tyr Tyr Pro Tyr Gln Leu Ser Ser Glu Glu	
195 200 205	
gtg gtc gag gag atg atg tct cat tga	651
Val Val Glu Glu Met Met Ser His	
210 215	
<210> 6	
<211> 216	
<212> PRT	
<213> <i>Shigella flexneri</i>	
<400> 6	
Met Ala Ile Arg Leu His Lys Leu Ala Val Ala Leu Gly Val Phe Ile	
1 5 10 15	

ES 2 587 352 T3

Val Ser Ala Pro Ala Phe Ser His Gly His His Ser His Gly Lys Pro  
 20 25 30  
 Leu Thr Glu Val Glu Gln Lys Ala Ala Asn Gly Val Phe Asp Asp Thr  
 35 40 45  
 Asn Val Gln Asn Arg Thr Leu Ser Asp Trp Asp Gly Val Trp Gln Ser  
 50 55 60  
 Val Tyr Pro Leu Leu Gln Ser Gly Lys Leu Asp Pro Val Phe Gln Lys  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Asp Ala Asp Lys Thr Lys Thr Phe Ala Glu Ile Lys Asp Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Arg Lys Gly Tyr Pro Thr Asp Ile Glu Met Ile Gly Ile Glu Asp  
 100 105 110  
 Gly Ile Val Glu Phe His Arg Asn Asn Glu Thr Thr Ser Cys Lys Tyr  
 115 120 125  
 Asp Tyr Asp Gly Tyr Lys Ile Leu Thr Tyr Lys Ser Gly Lys Lys Gly  
 130 135 140  
 Val Arg Tyr Leu Phe Glu Cys Lys Asp Pro Glu Ser Lys Ala Pro Lys  
 145 150 155 160  
 Tyr Ile Gln Phe Ser Asp His Ile Ile Ala Pro Arg Lys Ser Ser His  
 165 170 175  
 Phe His Ile Phe Met Gly Asn Asp Ser Gln Gln Ser Leu Leu Asn Glu  
 180 185 190  
 Met Glu Asn Trp Pro Thr Tyr Tyr Pro Tyr Gln Leu Ser Ser Glu Glu  
 195 200 205  
 Val Val Glu Glu Met Met Ser His  
 210 215

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo recombinante de la familia Enterobacteriaceae que ya produce L-aminoácidos y que contiene un ORF de yodA sobreexpresado y que produce L-aminoácidos de una manera mejorada en comparación con los microorganismos que no son recombinantes para el ORF de yodA y que no contienen ningún ORF de yodA potenciado.
2. Un microorganismo de la familia Enterobacteriaceae según la reivindicación 1, en el que se sobreexpresa un polinucleótido que corresponde al ORF de yodA y que codifica un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es al menos 90% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N° 4 y SEC ID N° 6.
- 10 3. Un microorganismo según la reivindicación 2, en el que el polinucleótido sobreexpresado que corresponde al ORF de yodA se selecciona del grupo:
- a) polinucleótido con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5;
- b) polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que corresponde a la SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5 en los límites de la degeneración del código genético;
- 15 c) secuencia de polinucleótidos con una secuencia que se hibrida, en condiciones rigurosas, con la secuencia que es complementaria a la secuencia SEC ID N° 3 o SEC ID N° 5.
4. Un microorganismo según la reivindicación 2, en el que el polipéptido posee una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a una de las secuencias seleccionadas del grupo SEC ID N° 4 y SEC ID N° 6.
5. Un microorganismo según la reivindicación 2, en el que el polipéptido presenta la secuencia de aminoácidos que es idéntica a la de la SEC ID N° 4 o SEC ID N° 6.
- 20 6. Un microorganismo según las reivindicaciones 2 a 5, en el que se prepara por transformación, transducción o conjugación o una combinación de estos métodos, con un vector que contiene el ORF de yodA, o un alelo de este ORF de yodA y/o un activador, que potencia la expresión del ORF de yodA o el alelo de este ORF de yodA.
7. Un microorganismo según la reivindicación 1 ó 6, en el que el número de copias del ORF de yodA, o de los alelos, aumenta por al menos 1.
- 25 8. Un microorganismo según la reivindicación 7, en el que el aumento del número de copias del ORF de yodA por al menos 1 se produce por integración del ORF o los alelos en el cromosoma del microorganismo.
9. Un microorganismo según la reivindicación 7, en el que se consigue el aumento en el número de copias del ORF de yodA por al menos 1 por medio de un vector de replicación de manera extracromosómica.
10. Un microorganismo según la reivindicación 1 ó 2, en el que para conseguir la sobreexpresión,
- 30 a) el activador y la región reguladora o el sitio de unión a ribosomas aguas arriba del ORF de yodA, es mutado o
- b) se incorporan casetes o activadores de expresión aguas arriba del ORF de yodA.
11. Un microorganismo según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ORF de yodA está bajo el control de un activador que potencia la expresión del gen.
- 35 12. Un microorganismo según las reivindicaciones 1 a 11, en el que la sobreexpresión del ORF de yodA aumenta la concentración o actividad del producto génico (proteína) de yodA por al menos 10%, basado en la actividad o concentración del producto génico en el microorganismo o cepa precursora que no es recombinante para el ORF de yodA.
- 40 13. Un microorganismo según la reivindicación 1 a 12, en el que el microorganismo se selecciona de los géneros Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia.
14. Un microorganismo según las reivindicaciones 1 a 13, en el que produce L-treonina.
15. Un procedimiento para preparar L-aminoácidos por fermentación de microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae, en el que:
- 45 a) se cultivan microorganismos recombinantes según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en un medio en condiciones en las que el L-aminoácido deseado está enriquecido en el medio o en las células y

b) el L-aminoácido deseado se aísla con, cuando sea apropiado, constituyentes del caldo de fermentación y/o la biomasa, en su totalidad o en porciones ( $\geq 0$  a 100%), quedando en el producto aislado o siendo eliminado completamente.

- 5 16. El procedimiento según la reivindicación 15, en el que, para el fin de preparar L-treonina, se fermentan microorganismos de la familia Enterobacteriaceae en el que uno o más de los genes seleccionados del grupo:
- 16.1 al menos un gen del operón thrABC que codifica aspartato cinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina cinasa y treonina sintasa,
  - 16.2 el gen pyc codificador de piruvato carboxilasa *Corynebacterium glutamicum*,
  - 16.3 el gen pps codificador de la fosfoenolpiruvato sintasa,
  - 10 16.4 el gen ppc codificador de la fosfoenolpiruvato carboxilasa,
  - 16.5 los genes pntA y pntB codificadores de las subunidades de la piridina transhidrogenasa,
  - 16.6 el gen rhtB codificador de la proteína mediadora de la resistencia a homoserina,
  - 16.7 el gen rhtC codificador de la proteína mediadora de la resistencia a treonina,
  - 15 16.8 el gen thrE de *Corynebacterium glutamicum* codificador de la proteína portadora de exportación de treonina,
  - 16.9 el gen gdhA codificador de glutamato deshidrogenasa,
  - 16.10 el gen pgm codificador de la fosfoglucomutasa,
  - 16.11 el gen fba codificador de la fructosa bifosfato aldolasa,
  - 16.12 el gen ptsH codificador de la proteína fosfohistidina hexosa fosfotransferasa,
  - 20 16.13 el gen ptsI codificador de la enzima I del sistema de la fosfotransferasa,
  - 16.14 el gen crr codificador del componente IIA específico de glucosa,
  - 16.15 el gen ptsG codificador del componente IIBC específico de glucosa,
  - 16.16 el gen lrp codificador del regulador de regulón leucina,
  - 16.17 el gen fadR codificador del regulador de regulón fad,
  - 25 16.18 el gen iclR codificador del regulador del metabolismo intermediario central,
  - 16.19 el gen ahpC codificador de la subunidad pequeña de la alquilhidroperóxido reductasa,
  - 16.20 el gen ahpF codificador de la subunidad grande de la alquilhidroperóxido reductasa,
  - 16.21 el gen cysK codificador de la cisteína sintasa A,
  - 16.22 el gen cysB codificador del regulador de regulón cys,
  - 30 16.23 el gen cysJ codificador de la flavoproteína sulfito reductasa de NADPH,
  - 16.24 el gen cysI codificador de la hemoproteína sulfito reductasa de NADPH,
  - 16.25 el gen cysH codificador de la adenilil sulfato reductasa,
  - 16.26 el gen rseA codificador de una proteína de membrana que posee actividad anti- $\sigma$ E,
  - 16.27 el gen rseC codificador de un regulador global del factor  $\sigma$ E,
  - 35 16.28 el gen sucA codificador de la subunidad descarboxilasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
  - 16.29 el gen sucB codificador de la subunidad E2 de dihidrolipoil transsuccinasa de 2-cetoglutarato deshidrogenasa,
  - 16.30 el gen sucC codificador de la subunidad  $\beta$  de la succinil-CoA sintetasa,

- 16.31 el gen *sucD* codificador de la subunidad  $\alpha$  de la succinil-CoA sintetasa,  
16.32 el gen *aceE* codificador del componente E1 del complejo piruvato deshidrogenasa,  
16.33 el gen *aceF* codificador del componente E2 del complejo piruvato deshidrogenasa,  
16.34 el gen *rseB* codificador del regulador de la actividad del factor SigmaE y  
5 16.35 el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) de *yaaU* de *Escherichia coli*,  
se sobreexpresa o sobreexpresan adicionalmente al mismo tiempo.

17. El procedimiento según las reivindicaciones 15 ó 16, en el que, para el fin de preparar L-treonina, se fermentan microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en el que uno o más de los genes seleccionados del grupo:

- 17.1 el gen *tdh* codificador de la treonina deshidrogenasa,  
10 17.2 el gen *mdh* codificador de la malato deshidrogenasa,  
17.3 el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) de *yjfA* de *Escherichia coli*,  
17.4 el producto génico del marco abierto de lectura (ORF) *ytfP* de *Escherichia coli*,  
17.5 el gen *pckA* codificador de la fosfoenolpiruvato carboxinasar,  
17.6 el gen *poxB* codificador de la piruvato oxidasa,  
15 17.7 el gen *dgsA* codificador del regulador de DgsA del sistema de la fosfotransferasa,  
17.8 el gen *fruR* codificador de represor de la fructosa,  
17.9 el gen *rpoS* codificador de factor Sigma<sup>38</sup> y  
17.10 el gen *aspA* codificador de la aspartato amonio liasa,

se atenúa o atenúan adicionalmente, en particular se eliminan, o se reduce su expresión, al mismo tiempo.

- 20 18. El procedimiento según las reivindicaciones 15 a 17, en el que se preparan L-aminoácidos seleccionados del grupo: L-asparagina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteina, 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.

19. El procedimiento según la reivindicación 18, en el que se preparan L-aminoácidos seleccionados del grupo: L-isoleucina, L-valina, L-metionina, L-homoserina, L-triptófano y L-lisina.

25

Figura 1: Mapa del vector pTrc99AyodA.

