

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 997**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

C12P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2013 PCT/EP2013/051529**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13120685**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2013 E 13701624 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2814945**

54 Título: **Una célula con actividad de ppGppasa reducida**

30 Prioridad:

17.02.2012 EP 12156052

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

11.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SCHNEIDER, FRANK y
GERTH, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 645 997 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

Una célula con actividad de ppGppasa reducida

La presente invención se refiere a una célula de *E. coli* que está genéticamente modificada en su forma no mutada de tal forma que tiene una actividad de ppGppasa reducida con respecto a su forma no mutante y produce en exceso preferentemente un aminoácido esencial, incluso más preferentemente un aminoácido esencial derivado de serina, lo más preferentemente metionina o triptófano, y a un método de preparación de un aminoácido esencial del mismo derivado de serina, que comprende las etapas de a) cultivar la célula según el primer aspecto de la presente invención o según cualquiera de sus realizaciones, y b) opcionalmente: purificar el aminoácido.

Los L-aminoácidos que contienen azufre y aromáticos son de gran importancia económica. La L-cisteína se usa como aditivo alimentario, como sustancia de partida para compuestos activos farmacológicos (por ejemplo, N-acetilcisteína) y para cosméticos. Los aminoácidos L-metionina y L-triptófano desempeñan una función muy importante en la nutrición animal. Pertenecen a los aminoácidos esenciales que no pueden ser producidos por biosíntesis en el metabolismo de los vertebrados. En la cría de animales debe, por consiguiente, garantizarse que sean tomadas cantidades suficientes del aminoácido particular con el pienso. Sin embargo, como la L-metionina, por ejemplo, está frecuentemente presente en plantas para piensos convencionales (tales como soja o cereales) en cantidades que son demasiado bajas para garantizar la nutrición óptima del animal, particularmente para cerdos y aves de corral, es ventajoso añadir metionina como aditivo al pienso animal. La D-metionina puede ser convertida en L-metionina biológicamente activa por los vertebrados. Un racemato de D- y L-metionina es, por tanto, normalmente añadido al pienso animal. En animales, la L-homocisteína puede convertirse por transmetilación y así sustituir a la L-metionina.

En el estado de la técnica, aminoácidos tales como la metionina se preparan por síntesis química. Esto implica primero hacer reaccionar acroleína y metilmercaptano para dar 3-metilpropionaldehído, que a su vez con cianuro, amoníaco y monóxido de carbono produce hidantoína. La última puede finalmente hidrolizarse para dar el racemato, una mezcla equimolar de los dos estereoisómeros, D- y L-metionina. Como solo la forma L constituye la forma biológicamente activa de la molécula, la forma D presente en el pienso debe primero convertirse metabólicamente por desaminación y transaminación en la forma L activa.

A diferencia de la metionina, la mayoría de los otros aminoácidos naturales proteínogénicos, tales como –triptófano, por ejemplo, se preparan sobre todo por fermentación de microorganismos, aprovechando el hecho de que los microorganismos tienen vías biosintéticas apropiadas para sintetizar los aminoácidos naturales. Además, muchos procesos de fermentación logran costes de producción muy favorables con reactantes económicos tales como glucosa y sales minerales, y además administran la forma biológicamente activa del aminoácido particular.

Los aminoácidos de este tipo son conocidos por ser producidos por fermentación de cepas de *Enterobacteriaceae*, en particular *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*. Debido a la gran importancia, constantemente está siendo realizado trabajo para mejorar los procesos de preparación. Mejoras a los procesos pueden referirse a las medidas de fermentación, tales como agitación y suministro de oxígeno, por ejemplo, o la composición de medios nutritivos, por ejemplo selección del azúcar usado y la concentración de azúcar durante la fermentación, o al tratamiento final hasta la forma de producto, por ejemplo por cromatografía de intercambio iónico, o a las propiedades de salida intrínsecas del propio microorganismo.

Vías biosintéticas de aminoácidos se someten a control metabólico estricto en cepas no mutantes, que garantiza que los aminoácidos se producen solo hasta el grado del propio requisito de la célula. Un requisito previo importante para los eficientes procesos de producción es, por tanto, la disponibilidad de microorganismos adecuados que, a diferencia de los organismos no mutantes, tiene un resultado de producción drásticamente elevado superior a sus propios requisitos (producción en exceso) para la preparación del aminoácido deseado.

Tales microorganismos que producen en exceso aminoácidos pueden ser generados por procesos de mutación/selección convencionales y/o por modernas técnicas recombinantes específicas (ingeniería metabólica). El último caso implica identificar en primer lugar genes o alelos que efectúan una producción en exceso de aminoácidos por su modificación, activación o inactivación. Entonces se usan técnicas de biología molecular para introducir estos genes/alelos en una cepa de microorganismo o inactivarlos, para optimizar la producción en exceso. Sin embargo, frecuentemente solo la combinación de varias medidas diferentes produce una producción ciertamente eficiente. Dichos genes o alelos pueden codificar enzimas, factores de transcripción, transportadores y otros polipéptidos, cofactores o polipéptidos sintetizadores de cofactores, o componentes capaces de influir en la síntesis del aminoácido de interés. En una realización preferida, el término "componentes", como se entiende en el presente documento, significa una subunidad de un polipéptido tal que influye en la síntesis del aminoácido de interés, subunidad que, aunque más pequeña que el sistema completo codificado por el gen u operón, por ejemplo una subunidad o un dominio de un polipéptido, es funcional con respecto a la tarea del sistema completo.

La L-metionina deriva de aspartato y serina. En *E. coli* se introduce azufre a modo de L-cisteína (mediante cistationina como producto intermedio) en L-metionina por trans-sulfuración. El grupo CH₃ de L-metionina se origina del metabolismo de C1 y se transfiere a L-homocisteína por metionina sintasas MetE o MetH (revisión: Greene RC

(1996) en Neidhardt FC et al. (eds) "Escherichia coli and Salmonella", 2ª edición, pp 542-560). Cepas y procesos para la producción fermentativa de L-metionina se han descrito para *E. coli*, por ejemplo, en los documentos WO2006/001616 o WO2009/043803.

5 La vía metabólica de shikimato para sintetizar, entre otros, corismato, enterobactina, menaquinona, tetrahidrofolato, ubiquinona y los aminoácidos aromáticos está asimismo estrechamente regulada. La biosíntesis aromática en *E. coli* está regulada ya sea al nivel genético por la atenuación y represión, como por inhibición de la retroalimentación de enzimas (Frost y Draths, Annual review of microbiology, 49:557-79 (1995); Pittard, Genes to Cells 1(8):717-25 (1996)). Esta vía hace coincidir la producción de metabolitos aromáticos exactamente con los requisitos de la célula. La vía de ácido shikímico se regula sobre todo controlando la reacción inicial que se cataliza por tres isoenzimas diferentes de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa (DAHP sintasa, codificada por los genes *aroF*, *aroG* y *aroH*). El producto génico *AroG* constituye el 80 % de la actividad total de todas las DAHP sintasas en *E. coli* (Tribe et al., Journal of Bacteriology 127(3): 1085-1097 (1976); Pittard, Genes to Cells 1(8):717-25 (1996)); *AroG* es el 95 % inhibido por el aminoácido aromático L-fenilalanina. Al nivel genético, el regulador de *TyrR*, en presencia de fenilalanina y triptófano, reprime la transcripción de *aroG* (Baseggio et al., Journal of Bacteriology 172(5):2547-57 (1990); Davies et al., Gene 33(3):323-31 (1985)). Las solicitudes EP 1 270 721 y EP 2 147 972 describen el efecto beneficioso de emplear un alelo de *aroG* en la producción y preparación de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-triptófano usando cepas del género *Escherichia*.

20 El documento EP 2 204 441 A1 enseña que un aumento del nivel de (p)ppGpp en células bacterianas conduce a una disminución de la síntesis de ARN estable y un aumento de la expresión de algunos genes relevantes para la síntesis de aminoácidos y que la atenuación de la actividad de PSII, es decir, del producto génico completo del gen *spoT*, conduce a una mejora de la síntesis de genes heterólogos por éstos.

25 Gentry y Cashel (D.R. Gentry y M. Cashel, Molecular Microbiology (1996) 19(6), 1373-1384) enseñan esencialmente que el producto génico de *spoT* contiene una región distinta que es responsable de la actividad de ppGppasa y una región distinta, pero de solapamiento, que es responsable de la actividad de PSII (es decir, (p)ppGpp sintetasa) de este producto génico.

30 En vista de lo anterior, el objeto en el que se basa la presente invención es proporcionar una célula que mejore, con respecto a las células descritas en el estado de la técnica, los métodos de preparación de una célula tal y los métodos de uso de una célula tal para producir en exceso metionina o triptófano, refiriéndose dicha mejora a factores tales como la concentración intracelular obtenida del aminoácido producido en exceso, el rendimiento del aminoácido producido en exceso después del procesamiento del cultivo, las propiedades de crecimiento de la célula y el tiempo y número de etapas de método requeridas para producir en exceso y procesar dicho aminoácido, y los recursos requeridos por el proceso, por ejemplo con respecto a tiempo, energía y cantidad de cepas y reactantes usados.

35 Este objeto se logra por una célula de *E. coli* que ya produce en exceso metionina o triptófano, y en la que la actividad de al menos una ppGppasa del grupo que comprende - las secuencias de aminoácidos - SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6 se reduce como resultado de dicha ppGppasa que tiene las siguientes modificaciones: está presente una inserción de dos aminoácidos, His y Asn, entre Asp84 y Met85.

40 En una realización adicional, el problema se resuelve por una célula de *E. coli*, que ya produce en exceso metionina o triptófano, en la que la actividad de la ppGppasa según SEQ ID NO:2 se reduce como resultado de dicha ppGppasa que tiene las siguientes modificaciones: está presente una inserción de los dos aminoácidos His y Asn entre Asp84 y Met85 y preferentemente tiene al menos una modificación del grupo que comprende sustituciones, preferentemente sustituciones no conservativas, en los aminoácidos Gln9, Thr13, Tyr63, Arg109, Gln225,

45 Cys245, Val248, Asn268, Ser270, Met280, His344, Pro436, Asn501, Gln505, His543, Ala546, Ser547, Ile548, His555, Gly556, His557, Pro559, Lys619, Thr621, Ala622, Thr627, Thr651, Ala669, Ala675, Thr698 y una inserción entre Glu343 y His344.

La ppGppasa de la célula de *E. coli* según la presente invención puede tener además al menos una modificación del grupo que tiene las siguientes sustituciones o sustituciones de aminoácidos homólogos al aminoácido que va a ser sustituido por los mismos aminoácidos:

- 50 1.) sustitución de Gln9 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile y Val, preferentemente Leu,
- 2.) sustitución de Thr13 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Gln y Asn, preferentemente Arg o Asn,
- 3.) sustitución de Tyr63 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg y His, preferentemente His,

ES 2 645 997 T3

- 4.) sustitución de Arg109 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln y Asn, preferentemente Gln,
- 5.) sustitución de Gln225 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Thr, preferentemente Thr,
- 5 6.) sustitución de Cys245 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile y Val, preferentemente Leu,
- 7.) sustitución de Val248 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg y His, preferentemente His,
- 10 8.) sustitución de Asn268 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg y His, preferentemente L-His o Lys,
- 9.) sustitución de Ser270 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Leu, Ile y Val, preferentemente Ala o Val,
- 10.) sustitución de Met280 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr y Ala, preferentemente Ala,
- 15 11.) inserción de los aminoácidos Lys y Glu entre los aminoácidos Glu343 y His344,
- 12.) sustitución de His344 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln y Asn, preferentemente Gln,
- 13.) sustitución de Pro436 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Thr, preferentemente Ser,
- 20 14.) sustitución de Asn501 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Thr, preferentemente L-alanina,
- 15.) sustitución de Gln505 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Ser, Ala y Thr, preferentemente Pro o Ala,
- 25 16.) sustitución de His543 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, preferentemente Gln,
- 17.) sustitución de Ala546 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, preferentemente Gln,
- 18.) sustitución de Ser547 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Leu, Ile y Val, preferentemente Ala o Val,
- 30 19.) sustitución de Ile548 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, preferentemente Asn,
- 20.) sustitución de His555 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile y Val, preferentemente Val,
- 21.) sustitución de Gly556 por Lys, Arg y His, preferentemente Arg,
- 35 22.) sustitución de His557 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, preferentemente Gln,
- 23.) sustitución de Pro559 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Thr, preferentemente Ala,
- 40 24.) sustitución de Lys619 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln, preferentemente Gln,
- 25.) sustitución de Thr621 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile y Val, preferentemente Ile,
- 26.) sustitución de Ala622 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, preferentemente Asp,
- 45 27.) sustitución de Thr627 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala y Gly, preferentemente Ala,

28.) sustitución de Thr651 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp, preferentemente Glu,

29.) sustitución de Ala669 y/o Ala675 por Thr,

5 30.) sustitución de Thr698 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln y Asn, preferentemente Asn.

La célula de *E. coli* según la presente invención preferentemente expresa en exceso, con respecto a su forma no mutante, al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de las siguientes enzimas:

- 1) sistema de transporte de tiosulfato/sulfato CysPUWA (EC 3.6.3.25),
- 2) 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato reductasa CysH (EC 1.8.4.8),
- 10 3) sulfito reductasa CysJI (EC 1.8.1.2),
- 4) cisteína sintasa A CysK (EC 2.5.1.47),
- 5) cisteína sintasa B CysM (EC 2.5.1.47),
- 6) serina acetiltransferasa CysE (EC 2.3.1.30),
- 7) sistema de escisión de glicina GcvTHP-Lpd (EC 2.1.2.10, EC 1.4.4.2, EC 1.8.1.4),
- 15 8) lipoil sintasa LipA (EC 2.8.1.8),
- 9) lipoil-proteína ligasa LipB (EC 2.3.1.181),
- 10) fosfoglicerato deshidrogenasa serA (EC 1.1.1.95),
- 11) 3-fosfoserina fosfatasa SerB (EC 3.1.3.3),
- 12) 3-fosfoserina/fosfohidroxitreonina aminotransferasa SerC (EC 2.6.1.52),
- 20 13) serina hidroximetiltransferasa GlyA (EC 2.1.2.1),
- 14) aspartocinasa I y homoserina deshidrogenasa I ThrA (EC 2.7.2.4, EC 1.1.1.3),
- 15) aspartato cinasa LysC (EC 2.7.2.4),
- 16) homoserina deshidrogenasa Hom (EC 1.1.1.3),
- 17) homoserina O-acetiltransferasa MetX (EC 2.3.1.31),
- 25 18) homoserina O-succiniltransferasa MetA (EC 2.3.1.46),
- 19) cistationina gamma-sintasa MetB (EC 2.5.1.48),
- 20) β C-S liasa AecD (EC 4.4.1.8, también denominada beta-liasa),
- 21) cistationina beta-liasa MetC (EC 4.4.1.8),
- 22) homocisteína S-metiltransferasa independiente de B12 MetE (EC 2.1.1.14),
- 30 23) homocisteína S-metiltransferasa dependiente de B12 MetH (EC 2.1.1.13),
- 24) metilentetrahidrofolato reductasa MetF (EC 1.5.1.20),
- 25) exportador de L-metionina BrnFE de *Corynebacterium glutamicum*,
- 26) exportador de valina YgaZH de *Escherichia coli*, preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b2682, b2683 o variantes de los mismos,
- 35 27) supuesto transportador YjeH de *Escherichia coli*, preferentemente uno representado por el código de base de datos b4141 o variantes de los mismos,
- 28) piridina nucleótido transhidrogenasa PntAB (EC 1.6.1.2),
- 29) O-succinilhomoserina sulfhidrilasa MetZ (EC 2.5.1.48),
- 30) fosfoenolpiruvato carboxilasa Pyc (EC 4.1.1.31),

31) tiosulfato sulfurtransferasa RDL2 (EC 2.8.1.1),

32) tiosulfato-tiol sulfurtransferasa (EC 2.8.1.3),

33) tiosulfato-ditiol sulfurtransferasa (EC 2.8.1.5).

5 La célula de *E. coli* según la presente invención expresa preferentemente en una escala reducida, con respecto a su forma no mutante, al menos un ácido nucleico que codifica cualquiera de las siguientes enzimas:

1) regulador transcripcional de la biosíntesis de L-metionina (MetJ), preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b3938, ECK3930 o variantes de los mismos,

2) glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi, EC 5.3.1.9), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b4025, ECK4017 o variantes de los mismos,

10 3) homoserina cinasa (ThrB, EC 2.7.1.39), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b0003, ECK0003 o variantes de los mismos,

4) S-adenosilmetionina sintasa (MetK, EC 2.5.1.6), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b2942, ECK2937 o variantes de los mismos,

15 5) dihidrodipicolinato sintasa (DapA, EC 4.2.1.52), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b2478, ECK2474 o variantes de los mismos,

6) fosfoeno/piruvato carboxicinas (Pck, EC 4.1.1.49), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b3403, ECK3390 o variantes de los mismos,

7) formiltetrahidrofolato hidrolasa (PurU, EC 3.5.1.10), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b1232, ECK1227 o variantes de los mismos,

20 8) piruvato cinasa II (PykA, EC 2.7.1.40), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b1854, ECK1855 o variantes de los mismos,

9) piruvato cinasa I (PykF, EC 2.7.1.40), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b1676, ECK1672 o variantes de los mismos,

25 10) subunidad de transportador de L-metionina (MetQNI), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b0197, ECK0197 o variantes de los mismos,

11) subunidad de transportador de L-metionina (MetQNI), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b0198, ECK0198 o variantes de los mismos,

12) subunidad de transportador de L-metionina (MetQNI), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b0199, ECK0199 o variantes de los mismos,

30 13) desoxicitidina 5'-trifosfato desaminasa (Dcd, EC 3.5.4.13), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b2065, ECK2059 o variantes de los mismos,

14) supuesta N-aciltransferasa (YncA), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b1448, ECK1442 o variantes de los mismos,

35 15) ARNp regulador FnrS, preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b4699, ECK4511 o variantes de los mismos,

16) factor sigma RpoS, preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b2741, ECK2736 o variantes de los mismos.

La célula de *E. coli* según la presente invención preferentemente expresa en exceso, con respecto a su forma no mutante, al menos una secuencia de ácidos nucleicos de las siguientes enzimas:

40 1) antranilato sintasa (trpDE, EC 4.1.3.27), antranilato fosforribosil-transferasa (trpD, EC 2.4.2.18), fosforribosilantranilato isomerasa (trpC, EC 5.3.1.24), indol-3-glicerol-fosfato sintasa (trpC, EC 4.1.1.48) y triptófano sintasa (trpAB, EC 4.1.2.8 y 4.2.1.122),

2) fosfoglicerato deshidrogenasa serA (EC 1.1.1.95),

3) 3-fosfoserina fosfatasa SerB (EC 3.1.3.3),

45 4) 3-fosfoserina/fosfohidroxitreonina aminotransferasa SerC (EC 2.6.1.52),

- 5) DHAP sintasa sensible a L-tirosina (aroF, EC 2.5.1.54),
 6) DHAP sintasa resistente a retroalimentación de L-fenilalanina (aroG, EC 2.5.1.54),
 7) DHAP sintasa sensible a L-triptófano (aroH, EC 2.5.1.54),
 8) fosfoenolpiruvato sintasa ppsA (EC 2.7.9.2),
 5 9) fosfoenolpiruvato carboxinasa pck (EC 4.1.1.49),
 10) transcetolasa A tktA (EC 2.2.1.1),
 11) transcetolasa B tktB (EC 2.2.1.1),
 12) producto génico del marco de lectura abierto (ORF) de *E. coli* yddG, preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b1473, ECK1467 o variantes de los mismos.
- 10 La célula de *E. coli* según la presente invención preferentemente expresa en una escala reducida, con respecto a su forma no mutante, al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de las siguientes enzimas:
- 1) triptofanasa (tnaA, EC 4.1.99.1),
 2) represor del operón de trp (trpR), preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b4393, ECK4385 o variantes de los mismos,
 15 3) corismato mutasa T o pefenato deshidrogenasa (tyrA, EC 1.3.1.12),
 4) corismato mutasa P o pefenato deshidrogenasa (pheA, EC 4.2.1.51),
 5) proteína de transporte específica de triptófano mtr, preferentemente una representado por los códigos de base de datos b3161, ECK3149 o variantes de los mismos,
 20 6) triptófano permeasa (tnaB), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b3709, ECK3702 o variantes de los mismos,
 7) transportador para aminoácidos aromáticos (aroP), preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b0112, ECK0111 o variantes de los mismos,
 8) L-serina desaminasa (sdaA, EC 4.3.1.17),
 9) glucosa-6-fosfato isomerasa (pgi, EC 5.3.1.9),
 25 10) tirosina aminotransferasa (thrB), preferentemente una representada por los códigos de base de datos b4054, ECK4046 o variantes de los mismos,
 11) represor del regulón de glp (glpR), preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b3423, ECK3409 o variantes de los mismos,
 30 12) factor sigma RpoS (rpoS), preferentemente uno representado por los códigos de base de datos b2741, ECK2736 o variantes de los mismos.

El problema tratado por la presente invención se resuelve además por un método de preparación de metionina o triptófano, que comprende la etapa de cultivar una célula de *E. coli* que ya produce en exceso metionina, o triptófano, y está genéticamente modificada en su forma no mutante de tal forma que tiene una actividad de ppGppasa reducida con respecto a su forma no mutante y en la que la célula de *E. coli* tiene una actividad de (p)ppGpp-sintetasa que es esencialmente invariable con respecto a su forma no mutante, en la que dicha ppGppasa está seleccionada preferentemente del grupo que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6, está reducida como resultado de dicha ppGppasa que tiene al menos la siguiente modificación: está presente una inserción de los dos aminoácidos His y Asn entre Asp84 y Met85 con purificación opcional del aminoácido.

40 Los inventores de la presente invención han encontrado que el rendimiento de producción de una célula que produce en exceso metionina o triptófano es sorprendentemente elevado por una situación en la que dicha célula tiene una actividad de ppGppasa reducida con respecto a su forma no mutante. Sorprendentemente, esto es el caso particularmente si la actividad de (p)ppGpp-sintetasa de la célula es esencialmente invariable con respecto a su forma no mutante.

45 Una propiedad esencial de la célula según la invención es la de estar genéticamente modificada en su forma no mutante de tal forma que tiene una actividad de ppGppasa reducida con respecto a su forma no mutante. En una realización preferida, el término "actividad de ppGppasa", como se usa en el presente documento, significa la

actividad enzimática de una guanosina-3',5'-bis(difosfato) 3'-difosfatasa (EC 3.1.7.2), es decir, la capacidad para catalizar la rotura de guanosina-3',5'-bis(difosfato) (=ppGpp) para dar GDP y pirofosfato. En una realización preferida, el término "ppGppasa", como se usa en el presente documento, significa una enzima que tiene actividad de ppGppasa, enzima que puede tener actividad de ppGppasa sola o una pluralidad de actividades, que incluye actividad de ppGppasa. ppGpp se produce con la acción de una guanosina-5'-trifosfato, 3'-difosfato pirofosfatasa (EC 3.6.1.40), a partir de guanosina-3'-difosfato 5'-trifosfato (=pppGpp), un compuesto que a su vez se produce por GTP difosfocinasas (EC 2.7.6.5, frecuentemente abreviada PSI y PSII en la bibliografía) a partir de ATP y GTP. En una realización preferida, el término "actividad de (p)ppGpp-sintetasa" comprende la capacidad, como se usa en el presente documento, de producir al menos uno, preferentemente ambos, de los dos compuestos pppGpp y ppGpp, preferentemente con hidrólisis de ATP. El estado de la técnica describe numerosas ppGppasas y genes que codifican ppGppasas, por ejemplo en Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)) y en bases de datos, por ejemplo NC_003197 (REGIÓN: 3934070-3936181), NC_009832 (REGIÓN: (5391421-5393532), NC_007613, NC_004741, NC_013971 y NC_009648. En una realización preferida, la expresión que una célula que está genéticamente modificada en su forma no mutante de tal forma que tiene una actividad de ppGppasa reducida con respecto a su forma no mutante y "produce en exceso metionina o triptófano", como se usa en el presente documento, significa que la cepa de partida en la que se basa la célula ya produce un aumento de la cantidad del aminoácido relevante en comparación con su cepa no mutante original, incluso antes e independientemente de la reducción en la actividad de ppGppasa.

Un experto en la materia puede determinar la actividad de una enzima, por ejemplo de una ppGppasa o una (p)ppGpp sintetasa, basándose en ensayos de actividad, como aquellos que han descrito conjuntamente con métodos de evaluación de experto e interpretación de los parámetros cinéticos obtenidos con tales determinaciones en el estado de la técnica, por ejemplo Cornish-Bowden, Fundamentals of Enzym Kinetics, Portland Press Limited, 1995. El estado de la técnica describe además ensayos específicos para determinar la actividad de (p)ppGpp sintetasas (Mechold et al., 1996, J. Bact. 178, 1401-1411) y ppGppasa (Gallant et al., 1970, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 397). Brevemente, esto implica marcar las células que tienen la actividad que va a determinarse con nucleótidos radiomarcados, privarlas con respecto a isoleucina añadiendo 400 µg/ml de valina, seguido de extraer el conjunto de nucleótidos de la célula después de 15 minutos de inhibición de valina en ácido fórmico 0,66 N y posterior fraccionamiento de pppGpp, ppGpp, pppG y pppA por medio de cromatografía de capa fina en placas de PEI-celulosa en dihidrogenofosfato de potasio 1,5 M y visualización usando autorradiografía. En una realización preferida, "una célula que está genéticamente modificada en su forma no mutante de tal forma que tiene una actividad de ppGppasa reducida con respecto a su forma no mutante" significa que una célula tal bajo condiciones comparables tiene menos actividad de ppGppasa, medida a modo del número de moléculas de ppGpp hidrolizadas por unidad tiempo, que una célula no mutante, es decir, en el orden de preferencia creciente, inferior al 70, 60, 40, 20, 10 o 5 % de la actividad de una célula no mutante. En una realización preferida adicional, "una célula que tiene una actividad de (p)ppGpp-sintetasa que es esencialmente invariable con respecto a su forma no mutante" significa que dicha célula en condiciones comparables tiene al menos el 90, 95, 99, 101, 105, 110 % de actividad de una célula no mutante, medida a modo del número de moléculas de (p)ppGpp sintetizadas por unidad de tiempo. En una realización particularmente preferida, la célula es una cepa de *E. coli*, cuya actividad de ppGppasa de la secuencia SEQ ID NO. 2 o una variante se reduce, mientras que la actividad de la (p)ppGpp sintetasa de dicha célula es esencialmente invariable.

La introducción de mutaciones específicas en macromoléculas biológicas, a tanto niveles de ácido nucleico como de aminoácido, es hoy en día parte de los métodos convencionales rutinariamente usados de biología molecular, microbiología y bioquímica. Por ejemplo, pueden usarse métodos de mutagénesis dirigida al sitio que usan oligonucleótidos mutagénicos (T. A. Brown: Gentechnologie für Einsteiger [Ingeniería genética para principiantes], Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1993) o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como se describe en el manual por Gait: Oligonucleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) o por Newton y Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994). Para manipular las mutaciones, puede usarse, por ejemplo, el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick Change de Stratagene (Ámsterdam, Los Países bajos). El usar estos métodos implica amplificar la secuencia de partida, por ejemplo una secuencia codificante de ppGppasa descrita en el estado de la técnica, con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN total aislado de una cepa no mutante, clonación de dicha secuencia en vectores plasmídicos adecuados y luego someter el ADN al proceso de mutagénesis. Por medio de "GeneSOEing" (Gene Splicing by Overlap Extension, Horton, Molecular Biotechnology 3: 93-98 (1995)), las mutaciones puntuales pueden incluso obtenerse por PCR. También puede usarse una síntesis génica *de novo* (por ejemplo, por GENEART AG, Regensburg, Alemania) de las secuencias de nucleótidos para producir mutaciones en el gen *spoT*. Las mutaciones generadas pueden determinarse y comprobarse por secuenciación de ADN, por ejemplo por el método de Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 74 (12): 5463-5467, 1977). Los alelos generados pueden incorporarse en el cromosoma de cepas apropiadas, por ejemplo por transformación y el método de sustitución génica o de alelos.

Un método habitual, descrito por Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171, 4617 - 4622 (1989)), es el método de sustitución génica con la ayuda de un derivado de pSC101 condicionalmente replicante pMAK705 o con pKO3 (Link et al., Journal of Bacteriology 179: 6228-6237). Asimismo, pueden utilizarse otros métodos descritos en el estado de la técnica, por ejemplo aquellos de Martínez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 1999, 7143-7148 (1999)) o aquellos de Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182, 842-847 (2000)).

Otro método habitual consiste en incorporar mediante secuencias flanqueantes homólogas cortas un fragmento de ADN generado por PCR o síntesis génica directamente en el cromosoma con la ayuda de recombinasa Lambda Red, o llevar a cabo una sustitución (Proc. Natl. Acad. Sci. 97(12), 6640-6645 (2000); Nature Genetics 20, 123 - 128, 1998).

5 Es asimismo posible transferir, por conjugación o transducción, los alelos generados en diversas cepas.

Aunque es técnicamente factible introducir en macromoléculas biológicas numerosos nucleótidos o aminoácidos artificiales que no se producen naturalmente en secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, por ejemplo en el transcurso de una síntesis química completa o alterando el aparato de traducción celular, la presente invención, en una realización preferida, solo proporciona L-aminoácidos proteinogénicos para sustituciones para sustituir uno o más de un aminoácido originalmente presente en el polipéptido particular. En una realización preferida, el término aminoácido "proteinogénico" significa cualquier aminoácido de todas las formas L de los aminoácidos alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En una realización preferida, el término aminoácido "homólogo" de un aminoácido en la secuencia no mutante de un polipéptido, como se usa en el presente documento, significa un aminoácido que se identifica en una secuencia de aminoácidos diferente, que está relacionada con la secuencia no mutante con respecto a la estructura primaria, sin embargo, basándose en un alineamiento de las dos secuencias como que es el aminoácido correspondiente al aminoácido en la secuencia no mutante o que ocupa su posición correspondiente en la secuencia de aminoácidos relacionada. Se han descrito métodos de realización de un alineamiento de dos o más secuencias de aminoácidos en el estado de la técnica, por ejemplo en Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3ª edición, y comprenden el uso de paquetes de software tales como Clustal W (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22, 4637-4680, 1994) o MAFFT (Kato et al., Genome Information, 16(1), 22-33, 2005). Por ejemplo, Arg26 en el polipéptido codificado por el gen Pax6 humano es homólogo a Arg59 del gen de *Drosophila* eyeless, véase Lesk (2008), p. 36.

Los métodos genéticos de preparación de los mutantes según la invención también comprenden, además de los métodos de ingeniería genética, métodos genéticos tradicionales tales como métodos de mutagénesis *in vivo* usando poblaciones de células de cepas de *Enterobacteriaceae* y mutágenos tales como, por ejemplo, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), metanosulfonato de etilo (EMS), 5-bromouracilo o luz ultravioleta. Los métodos de mutagénesis se describen, por ejemplo, en Manual of Methods for General Bacteriology (Gerhard et al. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 1981) o en Tosaka et al. (Agricultural and Biological Chemistry 42(4), 745-752 (1978)) o en Konicek et al. (Folia Microbiologica 33, 337-343 (1988)). Reacciones de mutagénesis típicas usando MNNG comprenden concentraciones de 50 a 500 mg/l o incluso concentraciones más altas de hasta no más de 1 g/l, y un periodo de incubación de 1 a 30 minutos a pH 5,5 a 7,5. En estas condiciones, el número de células viables se reduce una proporción de aprox. del 50 % al 90 % o aprox. 50 % al 99 % o aprox. 50 % al 99,9 % o más.

Se eliminan mutantes o células de la población de células mutagenizadas y se propagan. En una etapa adicional, se investiga preferentemente su capacidad para secretar aminoácidos, preferentemente metionina o triptófano, en un cultivo discontinuo usando un medio nutritivo adecuado. En el caso de usos de sistemas robóticos adecuados como se describe, por ejemplo, en Zimmermann et al. (VDI Berichte No. 1841, VDI-Verlag, Dusseldorf, Alemania 2004, 439-443) o Zimmermann (Chemie Ingenieur Technik 77 (4), 426-428 (2005)), pueden investigarse numerosos mutantes en un corto tiempo. En general, se investigan no más de 3000, no más de 10.000, no más de 30.000 o incluso no más de 60.000 mutantes, cuando corresponda también más. De esta forma se identifican mutantes que, en comparación con la cepa parental o cepa de partida no mutagenizada, presentan elevada secreción de aminoácidos en el medio nutritivo o en el interior de la célula. Éstos incluyen, por ejemplo, mutantes cuya secreción de aminoácidos se aumenta al menos el 0,5 %.

Entonces se prepara o aísla ADN de los mutantes, y el polinucleótido correspondiente se sintetiza con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa usando pares de cebadores que permiten la amplificación del gen *spoT* o del alelo *spoT* según la invención o de las mutaciones según la invención. El ADN se aísla preferentemente de mutantes que secretan aminoácidos a un grado elevado.

En una realización preferida, el término "gen", como se usa en el presente documento, significa una sección en el ácido desoxirribonucleico (ADN), que contiene la información sobre la producción (transcripción) de principalmente un ácido ribonucleico (ARN), conteniendo el último la información sobre la producción (traducción) de una proteína (polipéptido), en este caso un polipéptido que tiene la actividad de una (p)ppGpp sintetasa II. El hecho de que un gen o un polinucleótido contenga la información sobre la producción de una proteína también se denomina codificación de una proteína o polipéptido por el gen o por el ARN. Expresión génica indica la biosíntesis de ARN y proteínas a partir de la información genética contenida en ADN y genes. Se entiende que genes endógenos o polinucleótidos significa los marcos de lectura abiertos (ORF), genes o alelos o sus polinucleótidos presentes en la población de una especie. Los términos "gen" y "ORF" (marco de lectura abierto) se usan sinónimamente en la presente invención.

En una realización preferida, el término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, significa un polirribonucleótido y polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado, siendo el término polinucleótido usado sinónimamente e indistintamente con el término "ácido nucleico".

En una realización preferida, el término "polipéptido", como se usa en el presente documento, significa péptidos o proteínas que incluyen dos o más aminoácidos conectados mediante enlaces peptídicos. Los términos polipéptido y proteína se usan sinónimamente. Las proteínas son uno de los elementos estructurales básicos de todas las células. No solo dan estructura a la célula, sino que también son las "máquinas" moleculares que transportan sustancias, catalizan reacciones químicas y reconocen agentes de señalización.

preferentemente, la forma L del aminoácido. En una realización preferida, la célula según la invención o el método según la invención se emplean para preparar un aminoácido esencial y/o derivado de serina y/o aromático. En una realización preferida, el término aminoácido "esencial" significa un aminoácido que no puede ser producido independientemente por un eucariota superior, preferentemente un eucariota superior de sangre caliente, incluso más preferentemente un ave o mamífero. En una realización más preferida, esto también incluye aminoácidos que el organismo puede producir por sí mismo, pero solo si se internaliza en un precursor adecuado, lo más preferentemente otro aminoácido, con la comida. En una realización preferida, el término "un aminoácido derivado de serina", como se usa en el presente documento, significa un aminoácido que se produce mediante una vía biosintética que comprende al menos una reacción que consume serina como reactante, incluyendo dicha vía biosintética preferentemente solo aquellas reacciones que contribuyen directamente a la tarea de la estructura del aminoácido que va a producirse, pero no reacciones que regeneran simplemente cofactores.

La célula según la invención o la célula producida o empleada en un método según la invención puede ser una célula de numerosos organismos que puede emplearse en biotecnología. En una realización preferida, es una célula procariota o eucariota inferior. En una realización preferida, el término "célula eucariota inferior", como se usa en el presente documento, significa una célula eucariota unicelular, preferentemente una célula de levadura. Ejemplos de células eucariotas inferiores incluyen levaduras de los géneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Candida*, *Picchia* y *Yarrowia*. En otra realización preferida, la célula es una célula procariota, más preferentemente una bacteria Gram-negativa, incluso más preferentemente una célula seleccionada del grupo de géneros que comprende *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*, incluso más preferentemente una célula del género *Escherichia*, y lo más preferentemente *E. coli*. En una realización preferida, es una célula aislada mantenida a modo de un cultivo puro. Una realización adicional hace uso de una mezcla de cultivos. En una realización más preferida, la célula es una bacteria de la cepa EMC1_spoT1849, véase el Ejemplo 4.

La célula según la invención para preparar al menos un aminoácido está preferentemente intacta, con actividad metabólica no alterada. Sin embargo, la enseñanza según la invención también puede implementarse usando células parcialmente lisadas y parcialmente purificadas cuyo metabolismo es todavía capaz de producir el (los) aminoácido(s) de interés. Si se da preferencia particular según la invención a aquellas células de *E. coli* que producen metionina o triptófano en una elevada cantidad de aminoácido particular con respecto a su forma no mutante tomada de la naturaleza, incluso antes de la modificación genética que causa una actividad de ppGppasa reducida, es decir, en forma de la cepa de partida correspondiente. En una realización preferida, el término "cepa de partida", usada indistintamente con el término "cepa parental", como se usa en el presente documento, significa la cepa de microorganismo en la que se llevan a cabo medidas de aumento de la productividad de uno o más aminoácidos, péptidos o proteínas, o medidas de aumento de la actividad de una o más enzimas, por ejemplo una medida que produce la expresión en exceso. Una cepa de partida puede ser una cepa no mutante, pero también una cepa previamente modificada, por ejemplo una cepa que produce en exceso de al menos un L-aminoácido, que puede usarse como cepa productora.

El estado de la técnica ha desvelado numerosas cepas que producen en exceso aminoácidos relevantes y también medidas y modificaciones por las que puede lograrse tal producción en exceso. En una realización preferida, la cepa de *E. coli* que secreta o que produce L-metionina tiene preferentemente actividad enzimática de aspartato cinasa (EC 2.7.2.4) potenciada, siendo preferidos alelos resistentes a la retroalimentación. En *E. coli* hay tres aspartato cinasas diferentes, codificadas por los genes *thrA*, *metL* y *lysC*. En otra realización preferida, la biosíntesis de L-metionina aumenta debido a la atenuación o delección de la proteína reguladora MetJ que está codificada por el gen *metJ*. MetJ es el principal represor de la biosíntesis de L-metionina en *E. coli*.

En una realización preferida adicional, la cepa de partida de la célula deriva de una cepa del grupo que comprende MG1655 de *Escherichia coli*, W3110 de *Escherichia coli*, DH5 α de *Escherichia coli*, DH10B de *Escherichia coli*, BW2952 de *Escherichia coli*, REL606 de *Escherichia coli*.

Todos los números de acceso y códigos de acceso usados para citar secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del estado de la técnica en la presente solicitud son números de acceso y códigos de acceso de la base de datos BioCyc de ISR, CA, EE.UU., en la versión disponible en línea el 1 de diciembre de 2011.

En una realización preferida adicional, la célula deriva de la cepa productora de *E. coli* que produce en exceso metionina MG1655 Δ metJ metA*11 Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Δ pykF Δ pykA Ptrc09-gcvTHP Δ purU Ptrc36-ARNmst17-metF que comprende los plásmidos de producción pME101-thrA*1-cysE-Pgap-metA*11 y pCC1 BAC-serB-glyA-serA-serC (documento WO2009/043803).

En una realización preferida adicional, la célula deriva de la cepa productora de *E. coli* que produce en exceso metionina MG1655 Δ metJ Ptrc-metH Ptrc-metF PtrcF-cysPUWAM PtrcF-cysJIH Ptrc09-gcvTHP que comprende el

plásmido de producción pME101-thrA*1-cysE-Pgap-metA*11. Esta cepa puede ser clonada por varias transducciones P1 y tratamiento, como se describen en la solicitud WO2009/043803. La cepa se basa en la cepa no mutante de *E. coli* K12 MG1655. Las siguientes modificaciones se introdujeron en el genoma de esta cepa: delección del gen para el represor de la biosíntesis de L-metionina, *metJ*; inserción del promotor *trc* fuerte en la dirección 5' del gen *methH* que codifica la metionina sintasa dependiente de cobalamina; inserción del promotor *trc* fuerte en la dirección 5' del gen *metF* que codifica 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa; inserción del promotor *trc* fuerte en la dirección 5' del operón *cysPUWAM*, codificando *cysPUWA* un transportador de la captación de sulfato/tiosulfato y codificando *cysM* la cisteína sintasa B; inserción del promotor *trc* fuerte en la dirección 5' del operón *cysJIH*, codificando *cysJI* sulfito reductasa y codificando *cysH* 3'-fosfo-adenilil-sulfato reductasa; inserción del promotor *trc09* fuerte en la dirección 5' del operón *gcvTHP*, codificando *gcvT*, *gcvH* y *gcvP* tres componentes del sistema de escisión de glicina.

La clonación del plásmido de producción de *E. coli* pME101-thrA*1-cysE-Pgap-metA*11 se describe en las solicitudes WO2007/077041 y WO2009/043803. Es un plásmido de baja copia basado en el vector pCL1920 (Lerner, C.G. e Inouye, M., Nucl. Acids Res. (1990) 18:4631 [PMID: 2201955]). El plásmido vacío, pME101, aloja el gen *lacI^f* que codifica un alelo fuertemente expresado del represor *lac*. El gen *thrA*1* se clonó en la dirección 3' de un promotor *trc* fuerte que puede ser reprimido por el represor *Lac*. Codifica un variante resistente a la retroalimentación de la aspartato cinasa / homoserina deshidrogenasa de *E. coli* ThrA. El gen *cysE*, que incluye su promotor natural, está localizado en la dirección 3' del mismo, en la misma orientación. Codifica la serina acetiltransferasa de *E. coli*. Después de la dirección 3' de *cysE* está el promotor de *gapA* de *E. coli* fuerte que controla la expresión del gen *metA*11*. *metA*11* codifica una variante resistente a la retroalimentación de la homoserina O-succiniltransferasa de *E. coli*.

Ejemplos de otros microorganismos secretores y productores de L-metionina que pueden mencionarse son las siguientes cepas: TF4076BJF *metA#10* + *metYX(Lm)* de *E. coli* (documento WO2008/127240); W3110ΔJ/pKP451 de *E. coli* (documento EP 1 445 310 B1, página 7, ejemplo 4); WΔthrBCΔmetJmetK32 pMWPthmetA4Δ5Δ9 de *E. coli* (Yoshihiro Usuda y Osamu Kurahashi, 2005, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 71, No. 6, p. 3228-3234); y W3110/pHC34 (documento WO01/27307 página 13, Ejemplo 3). Ejemplos adicionales de diversos microorganismos adecuados se describen en Gomes et al. (Enzyme and Microbial Technology 37, 2005, 3-18).

El estado de la técnica también describe cepas que producen en exceso triptófano y también medidas y modificaciones por las que la producción en exceso de este aminoácido puede lograrse, por ejemplo JP4735/pMU3028 de *E. coli* (documento US5.756.345), JP6015/pMU91 de *E. coli* (documento US5.756.345), SV164(pGH5) de *E. coli* (documento WO94/08031), AGX17(pGX44) de *E. coli* (NRRL B-12263) (documento US4.371.614), AGX6(pGX50)aroP de *E. coli* (NRRL B-12264) (documento US4.371.614), AGX17/pGX50,pACKG4-pps de *E. coli* (documento WO97/08333), ATCC 31743 de *E. coli* (CA1182409), C534/pD2310,pDM136 de *E. coli* (ATCC 39795) (documento WO87/01130), JB102/p5LRPS2 de *E. coli* (documento US5.939.295).

En una realización preferida, las cepas que producen en exceso L-triptófano de la familia *Enterobacteriaceae* tienen una o más de una característica fenotípica genética seleccionada del grupo que comprende resistencia a 5-metil-DL-triptófano, resistencia a 5-fluorotriptófano, resistencia a 4-metil-DL-triptófano, resistencia a 6-metil-DL-triptófano, resistencia a 4-fluorotriptófano, resistencia a 6-fluorotriptófano, resistencia a antranilato, resistencia a triptazano, resistencia a indol, resistencia a ácido indolacrílico, necesidad de fenilalanina, necesidad de tirosina, opcionalmente capacidad para utilizar sacarosa, potenciamiento del operón de triptófano, preferentemente de antranilato sintasa, preferentemente de la forma resistente a la retroalimentación, una triptofanoil-ARNt sintasa parcialmente defectuosa, una captación de triptófano atenuada, una triptofanasa defectuosa, proteínas represoras inactivadas, potenciamiento de la biosíntesis de serina, potenciamiento de la síntesis de fosfoeno/piruvato, potenciamiento de la síntesis de D-eritrosa-4-fosfato, potenciamiento de la síntesis de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DHAP) y potenciamiento de la biosíntesis de corismato.

Además de al menos una modificación genética que causa una reducción en la actividad de ppGppasa, la célula según la invención puede tener modificaciones adicionales con respecto a la cepa de partida que efectúan un aumento en la producción de aminoácido(s) de interés, en particular alterando la expresión génica. En una realización preferida, la expresión que la célula está genéticamente modificada en su forma no mutante de tal forma que se "expresa a un grado reducido o expresa en exceso al menos una secuencia de ácidos nucleicos o una variante de los mismos", con respecto a su forma no mutante, como se usa en el presente documento, significa que la célula genéticamente modificada produce una cantidad más baja o una cantidad más alta de producto de transcripción y/o de traducción de la secuencia de ácidos nucleicos que haría la célula genéticamente no modificada, en condiciones comparables, por ejemplo temperatura, suministro de nutrientes y densidad celular.

La expresión de un ácido nucleico puede aumentarse, por ejemplo, aumentando el número de copias de los polinucleótidos correspondientes cromosómicamente o extracromosómicamente por al menos una copia. Un método ampliamente usado de aumento del número de copias consiste en insertar el polinucleótido relevante en un vector, preferentemente un plásmido, que es replicado por una bacteria. Ejemplos de vectores plasmídicos adecuados para *Enterobacteriaceae* son vectores de clonación derivados de pACYC184 (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315, 1988) o derivados de pSC101 (Vocke y Bastia; Proc. Natl. Acad. Sci. 80(21): 6557-6561, 1983). También son particularmente adecuados plásmidos derivados de pCL1920 (Lerner, C.G.

e Inouye, M., Nucl. Acids Res., 1990, 18:4631 [PMID: 2201955]). Vectores plasmídicos derivados de "cromosomas artificiales bacterianos" (BAC), por ejemplo pCC1BAC (EPICENTRE Biotechnologies, Madison, EE.UU.), son asimismo adecuados para aumentar el número de copias de los polinucleótidos relevantes en *E. coli*.

5 Vectores que pueden además emplearse son transposones, elementos de inserción (elementos IS) o fagos. Estos tipos de sistemas genéticos se ilustran, por ejemplo, en las patentes US 4.822.738, US 5.804.414 y US 5.804.414. Similarmente, puede usarse el elemento IS ISaBI descrito en el documento WO 92/02627 o el transposón Tn 45 del plásmido pXZ10142 (citado en "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*" (editores: L. Eggeling y M. Bott)).

10 Otro método común de aumento de la expresión es el método de amplificación génica cromosómica. Este método implica insertar al menos una copia adicional del polinucleótido de interés en el cromosoma de una célula. Procesos de amplificación de este tipo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 03/014330 o WO 03/040373.

15 Otro método de aumento de la expresión consiste en enlazar funcionalmente el gen o alelo relevante a un promotor o un casete de expresión (operativamente unido). Promotores adecuados para *E. coli* son, por ejemplo, los promotores descritos por Amann et al. (Gene 69(2), 301-315, 1988) y Amann y Brosius (Gene 40(2-3), 183-190, 1985), T3, T7, SP6, M13, lac, tac y trc. Un promotor de este tipo puede insertarse, por ejemplo, en la dirección 5' del gen en cuestión, normalmente a una distancia de aproximadamente 1 - 500 bases de nucleótidos desde el codón de iniciación. El documento US 5.939.307 informa que la incorporación de casetes de expresión o promotores tales como, por ejemplo, promotor tac, promotor trp, promotor lpp o promotor PL y promotor PR de λ fago, por ejemplo en la dirección 5' del operón de treonina cromosómico, logró un aumento en la expresión. Los promotores del fago T7, los promotores gear-box, los promotores nar o los promotores de los genes rrsG, rnpB, csrA, csrB, ompA, fusA, pepQ, rplX y rpsG pueden usarse de un modo similar. Estos tipos de casetes de expresión o promotores también pueden usarse con el fin de expresar en exceso genes unidos a plásmido, como se describe en el documento EP 0 593 792. Usando el alelo lacQ, puede a su vez controlarse la expresión de genes (Glacock y Weickert, Gene 223, 221-231, 1998). Un experto en la materia puede además aumentar la actividad de dichos promotores modificando su secuencia por medio de una o más sustituciones de nucleótido, por inserción (inserciones) y/o delección (delecciones).

25 El grado de expresión de un ácido nucleico o una variante del mismo puede reducirse por tratamiento del cultivo adecuado, por modificación (mutación) genética de las estructuras señal de expresión génica o incluso por tecnología de ARN antisentido. Las estructuras señal de expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión al ribosoma, codón de iniciación y terminadores. El experto en la materia encuentra información de éstos, entre otros, por ejemplo en Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195, 1998), en Carrier y Keasling (Biotechnology Progress 15: 58-64, 1999), Franch y Gerdes (Current Opinion in Microbiology 3: 159-164, 2000), Kawano et al. (Nucleic Acids Research 33(19), 6268-6276, 2005) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik" [Genética Molecular], 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995) o el de Winnacker ("Gene und Klone" [Genes y clones], VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990). En una realización preferida, el término "inactivación" de un gen, como se usa en el presente documento, significa que el gen o la maquinaria celular requerida para su expresión o ácidos nucleicos requeridos o partes de los mismos, por ejemplo promotores, han sido genéticamente modificados, por ejemplo, por mutación, delección o inserción, de tal forma que la expresión se reduce, en el orden de preferencia creciente, el 50, 75, 80, 85, 90, 95 o el 99 %. Es posible, por ejemplo, para la expresión del gen que se ponga bajo el control de un promotor que conduce a la expresión reducida en el microorganismo usado para el método en comparación con la cepa de partida. La expresión puede además reducirse delecionando el gen o partes de los mismos en el microorganismo usado para el método. También es posible usar transiciones, transversiones o inserciones que conducen a mutaciones de aminoácido o mutaciones terminadoras. La expresión puede además reducirse usando un sitio de unión al ribosoma que conduce a traducción reducida en el microorganismo usado para el método en comparación con la cepa de partida. Un experto en la materia puede además reducir la expresión del gen, empeorando el uso de codones con respecto al microorganismo usado para el método. Finalmente, la expresión génica puede ser, se reduce suprimiendo una mutación de codón de parada en la región codificante del gen por medio de supresores de ARNt adecuados.

50 La célula según la invención o usada según la invención presenta elevada secreción o producción del aminoácido deseado en un proceso de fermentación en comparación con la cepa de partida o cepa parental empleada, siendo los aminoácidos liberados en el medio circundante o acumulados dentro de la célula.

55 El rendimiento de la célula según la invención o del proceso de fermentación usando el mismo con respecto a uno o más de los parámetros seleccionados del grupo que consiste en concentración de producto (producto por volumen), rendimiento de producto (producto formado por fuente de carbono consumida) y formación de producto (producto formado por volumen y tiempo), o incluso otros parámetros de proceso y combinaciones de los mismos, mejora al menos el 0,5 %, al menos el 1 %, al menos el 1,5 % o al menos el 2 % basado en la cepa de partida o cepa parental o el proceso de fermentación usando el mismo.

60 La célula puede cultivarse en el método según la invención continuamente - como se describe, por ejemplo, en el documento PCT/EP2004/008882 - o discontinuamente en un proceso discontinuo (cultivo discontinuo) o un proceso de alimentación de lotes o un proceso de alimentación de lotes repetido, con el fin de producir L-aminoácidos. Un

sumario general de métodos de cultivo conocido está disponible en el libro de texto por Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Tecnología de bioprocesos 1. Introducción a la tecnología de bioprocesos] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto por Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y equipo periférico] (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)).

5 El medio de cultivo o el medio de fermentación que va a usarse debe cumplir adecuadamente los requisitos de las cepas particulares. Descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos se dan, por ejemplo, en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" publicado por la Sociedad Americana de Bacteriología (Washington D.C., EE.UU., 1981). Los términos medio de cultivo, medio de fermentación y medio son mutuamente intercambiables.

10 La fuente de carbono empleada puede ser azúcares e hidratos de carbono, por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, disoluciones que contienen sacarosa derivadas de la producción de remolacha azucarera o caña de azúcar, almidón, hidrolizado de almidón y celulosa, aceites y grasas, por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco, ácidos grasos, por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, por ejemplo glicerol, metanol y etanol, y ácidos orgánicos, por ejemplo ácido acético. Estas
15 sustancias pueden usarse individualmente o como mezclas.

La fuente de nitrógeno empleada puede ser compuestos que contienen nitrógeno orgánicos, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, extracto soluble de maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, nitrato de amonio, amoniaco y tiosulfato de amonio. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse individualmente o como
20 mezclas.

La fuente de fósforo empleada puede ser ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o dihidrogenofosfato de dipotasio o las sales que contienen sodio correspondientes.

La fuente de azufre empleada puede ser una sal de ácido ditiosulfúrico (tiosulfato), tanto sola como junto con otras fuentes de azufre, por ejemplo sulfato, sulfito, sulfuro, hidrogenosulfuro, metanotiolato o ditionito, véase también la
25 solicitud EP 11151526.8.

El medio de cultivo debe además contener sales, por ejemplo en forma de cloruros, de metales, por ejemplo sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro, por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, pueden usarse sustancias de crecimiento tales como aminoácidos, por ejemplo
30 homoserina, y vitaminas, por ejemplo cobalamina, tiamina, biotina o ácido pantoténico, además de las sustancias mencionadas anteriormente.

Además de estos, pueden añadirse precursores adecuados del aminoácido particular al medio de cultivo.

Las sustancias empleadas mencionadas pueden añadirse al cultivo en forma de una mezcla de una sola vez o alimentarse en un modo adecuado durante el cultivo.

35 Se emplean compuestos básicos tales como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco o amoniaco acuoso, o compuestos de ácido tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, en un modo adecuado para controlar el pH del cultivo. En general, el pH se ajusta a un valor de 6,0 a 9,0, preferentemente de 6,5 a 8. Es posible usar antiespumantes, tales como ésteres de poliglicol de ácido graso, para controlar la formación de espuma. Pueden añadirse sustancias adecuadas que actúan selectivamente, por ejemplo antibióticos, al medio con el fin de mantener la estabilidad de los plásmidos. Con el fin de mantener las condiciones aerobias, se pasa oxígeno o mezclas de gas
40 que contiene oxígeno, tales como aire, al cultivo. También es posible usar líquidos que están enriquecidos con peróxido de hidrógeno. Cuando corresponda, la fermentación se realiza a presión positiva, por ejemplo bajo una presión de 0,03 a 0,2 MPa. La temperatura del cultivo normalmente es de 20 °C a 45 °C, y preferentemente de 25 °C a 40 °C. En el caso de procesos discontinuos, el cultivo continúa hasta que se ha producido un máximo del aminoácido deseado. Este objetivo normalmente se logra en el plazo de 10 horas a 160 horas. Son posibles tiempos
45 de cultivo más largos en el caso de procesos continuos.

Medios de fermentación adecuados se describen, entre otros, en los documentos US 6.221.636, US 5.840.551, US 5.770.409, US 5.605.818, US 5.275.940 y US 4.224.409.

El caldo de fermentación preparado de esta forma se somete entonces a procesamiento adicional en un producto sólido o líquido.

50 En una realización preferida, un "caldo de fermentación", como se usa en el presente documento, se entiende como que significa un medio de fermentación en el que un microorganismo se ha cultivado durante un cierto tiempo y una cierta temperatura. El medio de fermentación, o el medio empleado durante la fermentación, contiene todas las sustancias o componentes que se requieren para la propagación del microorganismo y formación del aminoácido deseado.

Al final de la fermentación, el caldo de fermentación resultante contiene por consiguiente a) la biomasa del microorganismo que ha sido producido debido a la propagación de las células de dicho microorganismo, b) el aminoácido deseado formado durante la fermentación, c) los subproductos formados durante la fermentación, y d) los constituyentes del medio de fermentación/medios de fermentación empleados, o de las sustancias empleadas, por ejemplo vitaminas, tales como biotina, aminoácidos tales como homoserina, o sales tales como sulfato de magnesio, constituyentes que no fueron consumidos por la fermentación.

Los subproductos incluyen sustancias que se generan por los microorganismos empleados en la fermentación, además del L-aminoácido deseado particular, y que pueden ser secretadas. Incluyen L-aminoácidos que ascienden a menos del 30 %, 20 % o 10 % en comparación con el aminoácido deseado, además de ácidos orgánicos que tienen de uno a tres grupos carboxilo, por ejemplo ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico o ácido fumárico, y también azúcares, por ejemplo trehalosa.

Caldos de fermentación típicos que son adecuados para fines industriales tienen un contenido de aminoácidos de 40 g/kg a 180 g/kg o de 50 g/kg a 150 g/kg. En general, el contenido de biomasa (a modo de biomasa seca) es de 20 a 50 g/kg.

El estado de la técnica ha descrito numerosos procesos para purificar el aminoácido a partir del caldo de cultivo o caldo de fermentación producido, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cristalización, procesos de extracción y tratamiento con carbono activo. Esto produce L-aminoácidos ampliamente puros que tienen un contenido de ≥ 90 % en peso, ≥ 95 % en peso, ≥ 96 % en peso, ≥ 97 % en peso, ≥ 98 % en peso o ≥ 99 % en peso.

Es asimismo posible purificar un aminoácido a partir del caldo de fermentación producido eliminando la biomasa de las bacterias contenidas en el caldo de fermentación completamente (100 %) o casi completamente, es decir, más de o superior a ($>$) 90 %, > 95 %, > 97 %, > 99 %, y dejar los otros constituyentes del caldo de fermentación en gran medida, es decir, 30 % - 100 %, 40 % - 100 %, 50 % - 100 %, 60 % - 100 %, 70 % - 100 %, 80 % - 100 %, o 90 % - 100 % de los mismos, preferentemente más de o superior a (\geq) 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 % o ≥ 95 %, o incluso completamente (100 %) en el producto.

Se emplean métodos de separación tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación, floculación o una combinación de los mismos, para eliminar o separar la biomasa.

El caldo obtenido se espesa o concentra entonces usando métodos conocidos tales como, por ejemplo, con la ayuda de un evaporador rotatorio, evaporador de capa fina, evaporador de película descendente, por ósmosis inversa, por nanofiltración o una combinación de los mismos.

Este caldo concentrado se procesa entonces por métodos de liofilización, secado por pulverización, granulación por pulverización o por otros procesos para dar un polvo finamente dividido preferentemente vertible. Este polvo finamente dividido vertible puede entonces a su vez convertirse en un producto de grano grueso, fácilmente vertible, almacenable y en gran medida libre de polvo por procesos de compactación o granulación adecuados. Esto implica eliminar en conjunto más del 90 % de agua, de manera que el contenido de agua en el producto sea inferior al 10 % en peso, inferior al 5 % en peso, inferior al 4 % en peso o inferior al 3 % en peso.

El análisis de L-aminoácidos para determinar la concentración en uno o más momentos durante la fermentación puede llevarse a cabo separando los L-aminoácidos por medio de cromatografía de intercambio iónico, preferentemente cromatografía de intercambio catiónico, con posterior derivatización post-columna usando ninhidrina, como se describe en Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)). También es posible emplear *orto*-ftalaldehído en vez de ninhidrina para la derivatización post-columna. Un artículo de resumen sobre la cromatografía de intercambio iónico puede encontrarse en Pickering (LC-GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)).

Es asimismo posible llevar a cabo una derivatización pre-columna, por ejemplo usando *orto*-ftalaldehído o isotiocianato de fenilo, y fraccionar los derivados de aminoácido resultantes por cromatografía de fase inversa (RP), preferentemente en forma de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Un método de este tipo se describe, por ejemplo, en Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

La detección se lleva a cabo fotométricamente (absorbancia, fluorescencia).

Una revisión referente al análisis de aminoácidos puede encontrarse, entre otros, en el libro de texto "Bioanalytik" por Lottspeich y Zorbach (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania 1998).

La presente invención se ilustra además por las figuras y ejemplos no limitantes, a continuación, a partir de los cuales pueden sacarse características, realizaciones, aspectos y ventajas adicionales de la presente invención.

La **Fig. 1** muestra un mapa del plásmido pMAK-ligB que contiene una sección del gen ligB.

La **Fig. 2** muestra un mapa del plásmido pCC3.

La **Fig. 3** muestra un mapa del plásmido pME-RDL2a.

La información de longitud debe tomarse como valores aproximados. Las abreviaturas y nombres de referencia usados tienen el siguiente significado:

- aadA1: gen de resistencia a estreptomycin/estreptomycin
- lacIq: gen para la proteína represora del promotor trc
- 5 • repA_{ts}: proteína de replicación de plásmidos (ts); también repA
- oriV: origen de replicación
- ori2: origen de replicación
- cam/Cm: gen de resistencia a cloranfenicol
- inserción ligB: parte de la región codificante del gen ligB
- 10 • serC: región codificante del gen serC
- serA: región codificante del gen serA
- glyA: región codificante del gen glyA
- serB: región codificante del gen serB
- thrA*1: región codificante del gen thrA (alelo resistente a la retroalimentación)
- 15 • cysE: región codificante del gen cysE
- P_{gapA}: promotor gap
- metA*11: región codificante del gen metA (alelo resistente a la retroalimentación)
- RDL2a: región codificante del alelo RDL2 que codifica tiosulfato sulfurtransferasa

Las abreviaturas para las enzimas de restricción se definen como sigue:

- 20 • Agel: endonucleasa de restricción de *Ruegeria gelatinovora*
- HindIII: endonucleasa de restricción de *Haemophilus influenzae* Rd
- XbaI: endonucleasa de restricción de *Xanthomonas campestris*
- KpnI: endonucleasa de restricción de *Klebsiella pneumoniae*

La presente invención se ilustra más abajo en más detalle basándose en realizaciones a modo de ejemplo.

- 25 Medios mínimos (M9) y completos (LB) usados para *E. coli* se han descrito por J.H. Miller (A Short Course in Bacteriol Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento de ADN de plásmido de *E. coli* y todas las técnicas referentes a la restricción, ligación, tratamiento con Klenow y con fosfatasa alcalina se llevan a cabo según Sambrook et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press),
- 30 a menos que se establezca de otro modo. La transformación de *E. coli* se lleva a cabo según Chung et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 2172-2175, 1989), a menos que se establezca de otro modo.

A menos que se establezca de otro modo, la temperatura de incubación para la producción de cepas y transformantes es 37 °C.

Ejemplo 1

Clonación de pMAK-ligB

- 35 Se clonó el plásmido pMAK-ligB como un marcador de selección para la transducción de alelos spoT y se insertó en el gen ligB en el cromosoma de DM1849 de *E. coli*. El gen ligB está localizado en el cromosoma aproximadamente 1,2 kbp en la dirección 5' de spoT. La cepa DM1849 de *E. coli* tiene un alelo spoT según la invención.

- 40 Los cebadores de PCR ligB-up y ligB-down tienen en sus extremos 5' en cada caso 6 nucleótidos aleatoriamente seleccionados, seguido de secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción XbaI (tctaga) y KpnI (ggtacc), respectivamente. Los nucleótidos 13 a 32 de ligB-up se unen desde las posiciones 3817496 a 3817516 en

ES 2 645 997 T3

el genoma de MG1655 de *E. coli*. Los nucleótidos 13 a 32 de ligB-down se unen desde las posiciones 3818519 a 3818498 en el genoma de MG1655 de *E. coli*.

ligB-up (SEQ ID NO:9)

5' CAGTACTctagaAGCCACGAAGGACACTAAGG 3'

5 ligB-down (SEQ ID NO:10)

5' TTAGTTggtaccCGGATGGACCGCAGTTAATG 3'

Se usaron estos dos cebadores y ADN genómico de MG1655 de *E. coli* como molde para llevar a cabo una PCR. El producto de PCR fue 1045 pb de longitud e incluyó la secuencia desde las posiciones 3817496 a 3818519 del genoma de MG1655 (SEQ ID NO:11).

- 10 Dicho producto de PCR se purificó usando un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Hilden, Alemania), se escindió por las enzimas de restricción XbaI y KpnI y se purificó otra vez. El plásmido pMAK705 (Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR (1989); J Bacteriol.; 171(9): 4617-4622) se escindió por las enzimas de restricción XbaI y KpnI, se desfosforiló por fosfatasa alcalina (fosfatasa alcalina, intestinal de ternero, New England Biolabs, Frankfurt a.M., Alemania) y se purificó usando un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden). El
- 15 producto de PCR se ligó entonces con pMAK705, y la mezcla de ligación se transformó en DH5 α de *E. coli*. Se seleccionaron clones de plásmido correctos por 20 mg/l de cloranfenicol y se identificaron por escisión con restricción y posterior secuenciación de las inserciones. El plásmido obtenido de esta forma se llamó pMAK-ligB.

Ejemplo 2

Integración de pMAK-ligB en la cepa donante DM1849

- 20 La cepa DM1849 de *E. coli* lleva tres mutaciones en el gen *spoT* que codifican ppGppasa: una inserción de los seis nucleótidos CATGAT en la dirección 3' de la posición de nucleótido 252 (correspondiente a la posición 3820674 en el genoma de MG1655), la sustitución g520t (basada en el gen *spoT* no mutante, correspondiente a la posición 3820942 en el genoma de MG1655) y la sustitución c1585t (basada en el gen *spoT* no mutante, correspondiente a la posición 3822007 en el genoma de MG1655).
- 25 La cepa DM1849 se transformó con el plásmido pMAK-ligB por electroporación. pMAK-ligB tiene un gen de resistencia a cloranfenicol y un origen de replicación sensible a la temperatura. El plásmido se replica por *E. coli* a 30 °C pero no a 44 °C. La mezcla de transformación se sembró en placa sobre agar LB que contenía 20 mg/l de cloranfenicol y se incubó a 30 °C durante 40 horas. Entonces, las células se recogieron usando un bucle de inoculación, se resuspendieron en medio LB y se diluyeron 1 en 10.000 con medio LB. Se sembraron 100 μ l de la
- 30 dilución en placa sobre agar LB que contenía 20 mg/l de cloranfenicol y se incubaron a 44 °C durante otras 24 horas. Como resultado, se seleccionaron colonias donde el plásmido pMAK-ligB se había integrado cromosómicamente en el gen *ligB*. Una de estas colonias se aclaró usando un bucle de inoculación sobre agar LB que contenía 20 mg/l de cloranfenicol y se incubó a 44 °C durante 24 horas. La cepa resultante se llamó DM1849::pMAK-ligB.

Ejemplo 3

- 35 Generación de una biblioteca de fagos P1 a partir de DM1849::pMAK-ligB

Primero, se inocularon 10 ml de medio LB con la cepa DM1849::pMAK-ligB y se cultivaron a 44 °C durante 18 horas. Posteriormente, se transfirieron 100 μ l del cultivo a 10 ml de medio LB y se cultivaron a 44 °C a una densidad óptica (a 600 nm) de 0,5. Entonces se añadieron cloruro de calcio, hasta una concentración final de 5 mM, y glucosa, hasta una concentración final de 2 g/l. Esto fue seguido de añadir 100 μ l de una suspensión de fago P1 e incubar las

40 células a 37 °C. Después de 4 horas, el cultivo se centrifugó y el sobrenadante se esterilizó por filtración dos veces.

Ejemplo 4

Transducción de ECM1 de *E. coli* productora de metionina con la biblioteca de fagos P1 a partir de DM1849::pMAK-ligB para transferir las tres mutaciones de DM1849

- 45 La cepa ECM1 de *E. coli* productora de L-metionina lleva un alelo *metA* resistente a retroalimentación, una delección del gen *metJ* y una copia del promotor *trc* fuerte en la dirección 5' de cada uno de los genes *metH*, *metF*, *cysP* y *cysJ*. Se basa en la cepa de K12 no mutante MG1655.

Se inocularon 10 ml de medio LB con la cepa aceptora ECM1 y se cultivaron a 37 °C durante 18 horas. Esto fue seguido de eliminación de 2 ml del cultivo por centrifugación y resuspensión del sedimento de células en 1 ml de medio LB que contenía MgSO₄ 10 mM y CaCl₂ 5 mM. A 300 μ l de la suspensión de células se añadieron 100 μ l de la biblioteca de fagos P1 a partir de DM1849::pMAK-ligB y la mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min. Esto fue seguido de añadir 200 μ l de citrato de trisodio 1 M y agitar con vórtex brevemente. Entonces se añadió 1 ml de medio LB y las células se cultivaron a 44 °C durante una hora. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con

50

en cada caso 1 ml de LB que contenía citrato de trisodio 100 mM y finalmente se resuspendieron en 100 µl de LB que contenía citrato de trisodio 100 mM. Se extendió sobre agar LB que contenía 20 mg/l de cloranfenicol y se incubó a 44 °C durante 48 horas. Se aclararon diez colonias sobre agar LB que contenía 20 mg/l de cloranfenicol y se incubó otra vez a 44 °C durante 48 horas. En estos clones, se había transducido un fragmento genómico que comprendía la región ligB que incluye el plásmido pMAK-ligB integrado. Por secuenciación de ADN posterior de las secciones relevantes del gen spoT, se identificaron cinco clones en los que el alelo spoT de DM1849 se había co-

5

La escisión del plásmido pMAK-ligB del cromosoma y el tratamiento se llevaron a cabo como se describe en Hamilton *et al.* (CM Hamilton, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR (1989); J Bacteriol.; 171(9); 4617-4622). Uno de los clones libres de plásmido obtenido de esta forma se llamó ECM1_spoT1849.

10

Las cepas ECM1 y ECM1_spoT1849 se depositaron según el Tratado de Budapest en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7B, 38124 Brunswick, Alemania) con los números de DSM DSM 25066 (= ECM1) y DSM 25067 (= ECM1_spoT1849) el 3 de agosto de 2011.

Ejemplo 5

15 Clonación del gen serC en el plásmido pUC18

Se amplificó el gen serC de MG1655 de *E. coli* con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se clonó en el plásmido pUC18 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Alemania).

20

Los cebadores de PCR serCF(XbaI) y serCR(HindIII) tienen en sus extremos 5' en cada caso nucleótidos aleatoriamente seleccionados, seguido de secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción XbaI (TCTAGA) y HindIII (AAGCTT), respectivamente. Los nucleótidos 13 a 38 de serCF(XbaI) se unen desde las posiciones 956619 a 956644 en el genoma MG1655 de *E. coli*. Los nucleótidos 13 a 37 de serCR(HindIII) se unen desde las posiciones 958028 a 958004 en el genoma MG1655 de *E. coli*.

serCF(XbaI) (SEQ ID NO: 12)

5' AGGTGCTCTAGAGTCCGCGCTGTGCAAATCCAGAATGG 3'

25

serCR(HindIII) (SEQ ID NO: 13)

5' TACACCAAGCTTAACTCTCTACAACAGAAATAAAAAC 3'

Se amplificó el gen serC por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores serCF(XbaI) y serCR(HindIII) y la ADN polimerasa Phusion (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia). ADN genómico de MG1655 de *E. coli* sirvió de molde. El fragmento de ADN resultante tuvo 1434 pb de tamaño. Se escindió por las endonucleasas de restricción XbaI y HindIII y se purificó con ayuda de un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). Se escindió ADN de plásmido pUC18 no metilado por las endonucleasas de restricción XbaI y HindIII y se purificó con la ayuda de un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). El plásmido escindido se ligó entonces con el producto de PCR y se transformó en DH5α de *E. coli*. Se identificaron clones de plásmido que contenían el gen serC por restricción con escisión y secuenciación de ADN. El plásmido resultante se llamó pUC18-serC.

30

35

Ejemplo 6

Clonación del gen serA en el plásmido pUC18-serC

Se amplificó el gen serA de MG1655 de *E. coli* con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se clonó en el plásmido pUC18-serC.

40

El cebador de PCR serAF(XbaI) tiene en su extremo 5' 6 nucleótidos aleatoriamente seleccionados, seguido de una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción XbaI (TCTAGA). Los nucleótidos 12 a 33 se unen desde las posiciones 3055199 a 3055220 en el genoma de MG1655 de *E. coli*. El cebador de PCR serAR(SHSSNB) tiene en su extremo 5' 6 nucleótidos aleatoriamente seleccionados, seguido de secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción SacI, HindIII, SphI, SmaI, NotI y BglII. Los nucleótidos 49 a 58 se unen desde las posiciones 3056880 a 3056861 en el genoma de MG1655 de *E. coli*.

45

serAF(XbaI) (SEQ ID NO: 14)

5' CTGTAGTCTAGATTAGTACAGCAGACGGGCGCG 3'

serAR(SHSSNB) (SEQ ID NO: 15)

5'

CAAGAGCTCAAGCTTGCATGCGATTCCCGGGCGGCCGCAATAAGATCTCCGTC
AGGGCGTGGTGACCG 3'

Se amplificó el gen *serA* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores *serAF*(XbaI) y *serAR*(SHSSNB) y la ADN polimerasa Phusion (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia). El ADN genómico de MG1655 de *E. coli* sirvió de molde. El fragmento resultante de ADN tenía 1731 pb de tamaño.

- 5 Se escindió por las endonucleasas de restricción XbaI y SacI y se purificó con la ayuda de un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). El plásmido pUC18-*serC* se escindió asimismo por las endonucleasas de restricción XbaI y SacI y se purificó con la ayuda de un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). Entonces, el plásmido escindido se ligó con el producto de PCR y se transformó en DH5α de *E. coli*. Se identificaron clones de plásmido que contenían el gen *serA* por escisión con restricción y secuenciación de ADN. El plásmido resultante se llamó pUC18-*serAC*.

Ejemplo 7

Clonación del gen *serB* en el plásmido pUC18-*serAC*

Se amplificó el gen *serB* de MG1655 de *E. coli* con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se clonó en el plásmido pUC18-*serAC*.

- 15 El cebador de PCR *serB*(SphI) tiene en su extremo 5' 6 nucleótidos aleatoriamente seleccionados, seguido de una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción SphI (GCATGC). Los nucleótidos 13 a 34 se unen desde las posiciones 4622816 a 4622837 en el genoma M1655 de *E. coli*.

- 20 El cebador de PCR *serB*(SmaI) tiene en su extremo 5' 6 nucleótidos aleatoriamente seleccionados, seguido de secuencias de reconocimiento para las endonucleasas de restricción Sall (GTCGAC) y SmaI (CCCGGG). Los nucleótidos 54 a 75 se unen desde las posiciones 4623887 a 4623866 en el genoma MG1655 de *E. coli*.

serB(SphI) (SEQ ID NO: 16)

5' CCATGCGCATGCCACCCTTTGAAAATTTGAGAC 3'

serB(SmaI) (SEQ ID NO: 17)

5' CCGCATGTGACATCCCGGGGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGTGTG
ATTACTTCTGATTCAGGCTGCC 3'

- 25 Se amplificó el gen *serB* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los cebadores *serB*(SphI) y *serB*(SmaI) y la ADN polimerasa Phusion (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia). El ADN genómico de MG1655 de *E. coli* sirvió de molde. El fragmento de ADN resultante tenía 1137 pb de tamaño.

- 30 Se escindió por las endonucleasas de restricción SphI y SmaI y se purificó con la ayuda de un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). El plásmido pUC18-*serAC* se escindió asimismo por las endonucleasas de restricción SphI y SmaI, se desfosforiló por fosfatasa alcalina y se purificó con la ayuda de un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). Entonces, el plásmido escindido se ligó con el producto de PCR y se transformó en DH5α de *E. coli*. Se identificaron clones de plásmido que contenían el gen *serB* por escisión por restricción y secuenciación de ADN. El plásmido resultante se llamó pUC18-*serBAC*.

Ejemplo 8

- 35 Clonación del gen *glyA* en el plásmido pUC18-*serBAC*

Se amplificó el gen *glyA* de MG1655 de *E. coli* con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posteriormente se clonó en el plásmido pUC18-*serBAC*.

- 40 El cebador de PCR *glyA*-en la dirección 3' tiene en su extremo 5' 6 nucleótidos aleatoriamente seleccionados, seguido de una secuencia de reconocimiento para la endonucleasa de restricción BglII (AGATCT). Los nucleótidos 13 a 35 se unen desde las posiciones 2682063 a 2682085 en el genoma de MG1655 de *E. coli*.

El cebador de PCR *glyA*-en la dirección 5' tiene en su extremo 5' nucleótidos aleatoriamente seleccionados, seguido de secuencias de reconocimiento para la endonucleasa de restricción NotI (GCGCCGC). Los nucleótidos 15 a 33 se unen desde las posiciones 2683762 a 2683744 en el genoma de M1655 de *E. coli*.

glyA-en la dirección 3' (SEQ ID NO: 18)

5' ATCTAAAGATCTGTTACGACAGATTTGATGGCGCG 3'

glyA-en la dirección 5' (SEQ ID NO: 19)

5' TTCATCGCGGCCGCGAAAGAATGTGATGAAGTG 3'

5 El gen glyA se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores glyA-en la dirección 3' y glyA-en la dirección 5' y la ADN polimerasa Phusion (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia). El ADN genómico de MG1655 de *E. coli* sirvió de molde. El fragmento de ADN resultante tuvo 1726 pb de tamaño.

10 Se escindió por las endonucleasas de restricción BglII y NotI y se purificó con la ayuda de un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). El plásmido pUC18-serBAC se escindió asimismo por las endonucleasas de restricción BglII y NotI y se purificó con la ayuda de un kit de purificación por PCR QIAquick (Qiagen, Hilden, Alemania). Entonces, el plásmido escindido se ligó con el producto de PCR y se transformó en DH5 α de *E. coli*. Se identificaron clones de plásmido que contenían el gen glyA por escisión con restricción y secuenciación de ADN. El plásmido resultante se llamó pUC18-serB-glyA-serAC.

Ejemplo 9

Clonación de los genes serB-glyA-serAC de pUC18-serB-glyA-serAC con pCC1-BAC

15 Se escindió el plásmido pUC18-serB-glyA-serAC por la endonucleasa de restricción HindIII y los fragmentos de ADN se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa. Se aisló un fragmento de ADN de 5,9 kb que contenía los genes serB, glyA, serA y serC del gel. El fragmento se ligó con el plásmido pCC1BAC Cloning-Ready Vector (Hind III) de Epicentre / Madison, EE.UU, que había sido previamente escindido por HindIII, y se transformó en EPI300 de *E. coli*. Los clones de plásmido que contenían el fragmento de ADN de serB, glyA, serA y serC se identificaron por
20 escisión con restricción y secuenciación de ADN. El plásmido de producción resultante se llamó pCC3.

Ejemplo 10

Clonación del plásmido de producción pME-RDL2a

25 Se llevó a cabo la clonación del plásmido de producción pME-RDL2a como se describe en la solicitud EP 11151526.8. Incluye el gen cysE de *E. coli*, alelos resistentes a la retroalimentación de los genes thrA y metA de *E. coli* y el gen RDL2a que codifica la tiosulfato sulfurtransferasa de *Saccharomyces cerevisiae* RDL2p. Además, incluye un gen de resistencia a estreptomycinina.

Ejemplo 11

Transformación de las cepas ECM1 y ECM1 spoT1849 con los plásmidos de producción

30 Las cepas ECM1 y ECM1_spoT1849 se transformaron con el vector de producción pCC3 del Ejemplo 9, y los transformantes se seleccionaron usando 20 mg/l de cloranfenicol. Las células se transformaron entonces con el plásmido pME-RDL2a del Ejemplo 10 y los transformantes resultantes se seleccionaron usando 20 mg/l de cloranfenicol + 100 mg/l de estreptomycinina. Las cepas resultantes se llamaron ECM1/pCC3/pME-RDL2a y ECM1_spoT1849/pCC3/pME-RDL2a.

Ejemplo 12

Ensayo de rendimiento en un experimento de matraz agitador

35 Se evaluó el rendimiento de las cepas productoras de L-metionina de *E. coli* por pruebas de producción en matraces cónicos de 100 ml. Precultivos de en cada caso 10 ml de medio de pre-cultivo (10 % de medio LB que contenía 2,5 g/l de glucosa y 90 % de medio mínimo PC1) inoculados con 100 μ l de cultivo celular se cultivaron a 37 °C durante 10 horas. Estos se usaron entonces para inocular en cada caso 10 ml de medio mínimo PC1 (Tabla 1) a una
40 DO 600 nm de 0,2 (bio-fotómetro de Eppendorf; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y los cultivos se cultivaron a 37 °C durante 24 horas. La concentración de L-metionina extracelular se determinó por cromatografía de intercambio iónico y derivatización post-columna con detección de ninhidrina usando un analizador de aminoácidos (Sykam GmbH, Eresing, Alemania). La concentración de glucosa extracelular se determinó usando un analizador de glucosa YSI 2700 Select (YSI Life Sciences, Yellow Springs, Ohio, EE.UU.). Los resultados se enumeran en la Tabla 2.
45 Después de 24 horas la glucosa había sido usada completamente en ambos cultivos. La concentración de metionina en el sobrenadante de cultivo de ECM1_spoT1849/pCC3/pME-RDL2a fue, a 1,56 g/l, claramente superior a en la cepa comparativa (1,01 g/l). La modificación del gen que codifica ppGppasa mediante la introducción de las mutaciones Gly174, Leu529 y una inserción entre Asp84 y Met85 produjo así un aumento en el rendimiento de metionina con respecto a la cepa de partida del 10,1 % (gramos de metionina por gramo de glucosa) al 15,6 %.

50

Tabla 1: Medio mínimo PC1

Sustancia	Concentración
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	4 mg/l
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	2 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	20 mg/l
H ₃ BO ₃	1 mg/l
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,4 mg/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1 g/l
Ácido cítrico * 1 H ₂ O	6,56 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	40 mg/l
K ₂ HPO ₄	8,02 g/l
Na ₂ HPO ₄	2 g/l
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8 g/l
NH ₄ Cl	0,13 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₃	5,6 g/l
MOPS	5 g/l
NaOH 10M	ajustado a pH 6,8
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	40 mg/l
Clorhidrato de tiamina	10 mg/l
Vitamina B12	10 mg/l
Glucosa	10 g/l
Isopropil-tio-β-galactósido (IPTG)	2,4 mg/l
Espectinomicina	50 mg/l
Cloranfenicol	20 mg/l

Tabla 2: Concentraciones de L-metionina en los caldos de fermentación de cepas de *E. coli* ECM1/pCC3/pME-RDL2a y ECM1_spoT1849/pCC3/pME-RDL2a

Cepa	DO (600 nm)	L-Metionina (g/l)
ECM1/pCC3/pME-RDL2a	6,36	1,01
ECM1_spoT1849/pCC3/pME-RDL2a	7,46	1,56

5

Las características de la invención desveladas en la descripción anterior y en las reivindicaciones pueden ambas individualmente y en cualquier combinación ser esenciales para implementar la invención en sus diversas realizaciones.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de metionina o triptófano, que comprende la etapa de cultivar una célula de *E. coli*, que ya produce en exceso metionina o triptófano y está adicionalmente genéticamente modificada con respecto a su forma no mutante de tal forma que tiene una actividad de ppGppasa reducida con respecto a su forma no mutante, en el que la célula de *E. coli* tiene una actividad de (p)ppGpp-sintetasa que es esencialmente invariable con respecto a su forma no mutante y en el que la ppGppasa es al menos una seleccionada del grupo que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la actividad en la célula de *E. coli* cultivada de al menos una ppGppasa del grupo que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6 se reduce como resultado de dicha ppGppasa que tiene al menos la siguiente modificación: está presente una inserción de los dos aminoácidos His y Asn entre Asp84 y Met85.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, que comprende además la etapa de purificar el aminoácido esencial.
4. Célula de *E. coli*, que ya produce en exceso metionina o triptófano, en la que la actividad de al menos una ppGppasa del grupo que comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6 se reduce como resultado de dicha ppGppasa que tiene la siguiente modificación: está presente una inserción de los dos aminoácidos His y Asn entre Asp84 y Met85, y en la que la célula de *E. coli* tiene una actividad de (p)ppGpp-sintetasa que es esencialmente invariable con respecto a su forma no mutante.
5. Célula de *E. coli* según la reivindicación 4, en la que la actividad de al menos una ppGppasa que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 se reduce como resultado de dicha ppGppasa que tiene las siguientes modificaciones: está presente una inserción de los dos aminoácidos His y Asn entre Asp84 y Met85 y en la que la célula de *E. coli* tiene una actividad de (p)ppGpp-sintetasa que es esencialmente invariable con respecto a su forma no mutante.
6. Célula de *E. coli* según la reivindicación 5, en la que la ppGppasa tiene además al menos una modificación del grupo que comprende sustituciones en los aminoácidos Gln9, Thr13, Tyr63, Arg109, Gln225, Cys245, Val248, Asn268, Ser270, Met280, His344, Pro436, Asn501, Gln505, His543, Ala546, Ser547, Ile548, His555, Gly556, His557, Pro559, Lys619, Thr621, Ala622, Thr627, Thr651, Ala669, Ala675, Thr698 y una inserción entre Glu343 y His344.
7. Célula de *E. coli* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que la ppGppasa tiene al menos una modificación del grupo que tiene las siguientes sustituciones:
- 1.) sustitución de Gln9 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile y Val,
 - 2.) sustitución de Thr13 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Gln y Asn,
 - 3.) sustitución de Tyr63 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg y His,
 - 4.) sustitución de Arg109 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln y Asn,
 - 5.) sustitución de Gln225 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Thr,
 - 6.) sustitución de Cys245 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile y Val,
 - 7.) sustitución de Val248 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg y His,
 - 8.) sustitución de Asn268 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg y His,
 - 9.) sustitución de Ser270 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Leu, Ile y Val,
 - 10.) sustitución de Met280 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Thr y Ala,
 - 11.) inserción de los aminoácidos Lys y Glu entre los aminoácidos Glu343 y His344,
 - 12.) sustitución de His344 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln y Asn,
 - 13.) sustitución de Pro436 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Thr,
 - 14.) sustitución de Asn501 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Thr,
 - 15.) sustitución de Gln505 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro, Ser, Ala y Thr,
 - 16.) sustitución de His543 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln,
 - 17.) sustitución de Ala546 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln,

- 18.) sustitución de Ser547 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Leu, Ile y Val,
 19.) sustitución de Ile548 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln,
 20.) sustitución de His555 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile y Val,
 21.) sustitución de glicina en la posición 556 por Lys, Arg y His,
 5 22.) sustitución de His557 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln,
 23.) sustitución de Pro559 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Thr,
 24.) sustitución de Lys619 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Gln,
 25.) sustitución de Thr621 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Leu, Ile y Val,
 26.) sustitución de Ala622 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp,
 10 27.) sustitución de Thr627 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala y Gly,
 28.) sustitución de Thr651 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Glu y Asp,
 29.) sustitución de Ala669 y/o Ala675 por Thr,
 30.) sustitución de Thr698 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln y Asn.
8. Célula de *E. coli* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que la célula de *E. coli* expresa en exceso, con respecto a su forma no mutante, al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de las siguientes enzimas
- 15 1.) sistema de transporte de tiosulfato/sulfato CysPUWA (EC 3.6.3.25),
 2.) 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato reductasa CysH (EC 1.8.4.8),
 3.) sulfito reductasa CysJI (EC 1.8.1.2),
 20 4.) cisteína sintasa A CysK (EC 2.5.1.47),
 5.) cisteína sintasa B CysM (EC 2.5.1.47),
 6.) serina acetiltransferasa CysE (EC 2.3.1.30),
 7.) sistema de escisión de glicina GcvTHP-Lpd (EC 2.1.2.10, EC 1.4.4.2, EC 1.8.1.4),
 8.) lipoil sintasa LipA (EC 2.8.1.8),
 25 9.) lipoil-proteína ligasa LipB (EC 2.3.1.181),
 10.) fosfoglicerato deshidrogenasa serA (EC 1.1.1.95),
 11.) 3-fosfoserina fosfatasa SerB (EC 3.1.3.3),
 12.) 3-fosfoserina/fosfohidroxitreonina aminotransferasa SerC (EC 2.6.1.52),
 13.) serina hidroximetiltransferasa GlyA (EC 2.1.2.1),
 30 14.) aspartocinasa I y homoserina deshidrogenasa I ThrA (EC 2.7.2.4, EC 1.1.1.3),
 15.) aspartato cinasa LysC (EC 2.7.2.4),
 16.) homoserina deshidrogenasa Hom (EC 1.1.1.3),
 17.) homoserina O-acetiltransferasa MetX (EC 2.3.1.31),
 18.) homoserina O-succiniltransferasa MetA (EC 2.3.1.46),
 35 19.) cistationina gamma-sintasa MetB (EC 2.5.1.48),
 20.) C-S liasa AecD (EC 4.4.1.8, también denominada beta-liasa),
 21.) cistationina beta-liasa MetC (EC 4.4.1.8),

- 22.) homocisteína S-metiltransferasa independiente de B12 MetE (EC 2.1.1.14),
 23.) homocisteína S-metiltransferasa dependiente de B12 MetH (EC 2.1.1.13),
 24.) metilentetrahidrofolato reductasa MetF (EC 1.5.1.20),
 25.) exportador de L-metionina BrnFE de *Corynebacterium glutamicum*,
 5 26.) exportador de valina YgaZH de *Escherichia coli* (b2682, b2683),
 27.) supuesto transportador YjeH de *Escherichia coli* (b4141),
 28.) piridina nucleótido transhidrogenasa PntAB (EC 1.6.1.2),
 29.) O-succinilhomoserina sulfhidrilasa MetZ (EC 2.5.1.48),
 30.) fosfoenolpiruvato carboxilasa Pyc (EC 4.1.1.31),
 10 31.) tiosulfato sulfurtransferasa RDL2p (EC 2.8.1.1),
 32.) tiosulfato-tiol sulfurtransferasa (EC 2.8.1.3),
 33.) tiosulfato-ditiol sulfurtransferasa (EC 2.8.1.5).
9. Célula de *E. coli* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en la que la célula de *E. coli* expresa en una
 escala reducida, con respecto a su forma no mutante, al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica
 15 cualquiera de las siguientes enzimas:
- 1.) regulador transcripcional de la biosíntesis de L-metionina (MetJ) (b3938, ECK3930),
 2.) glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi, EC 5.3.1.9) (b4025, ECK4017),
 3.) homoserina cinasa (ThrB, EC 2.7.1.39) (b0003, ECK0003),
 4.) S-adenosilmetionina sintasa (MetK, EC 2.5.1.6) (b2942, ECK2937),
 20 5.) dihidrodipicolinato sintasa (DapA, EC 4.2.1.52) (b2478, ECK2474),
 6.) fosfoenolpiruvato carboxicinas (Pck, EC 4.1.1.49) (b3403, ECK3390),
 7.) formiltetrahidrofolato hidrolasa (PurU, EC 3.5.1.10) (b1232, ECK1227),
 8.) piruvato cinasa II (PykA, EC 2.7.1.40) (b1854, ECK1855),
 9.) piruvato cinasa I (PykF, EC 2.7.1.40) (b1676, ECK1672),
 25 10.) subunidad de transportador de L-metionina (MetQNI) (b0197, ECK0197),
 11.) subunidad de transportador de L-metionina (MetQNI) (b0198, ECK0198),
 12.) subunidad de transportador de L-metionina (MetQNI) (b0199, ECK0199),
 13.) desoxicitidina 5'-trifosfato desaminasa (Dcd, EC 3.5.4.13) (b2065, ECK2059),
 14.) supuesta N-aciltransferasa (YncA),
 30 15.) ARNp regulador FnrS,
 16.) factor sigma RpoS.
10. Célula de *E. coli* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en la que la célula de *E. coli* expresa en exceso,
 con respecto a su forma no mutante, al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de las
 siguientes enzimas:
 35 1.) antranilato sintasa (trpDE, EC 4.1.3.27), antranilato fosforribosiltransferasa (trpD, EC 2.4.2.18),
 fosforribosilantranilato isomerasa (trpC, EC 5.3.1.24), indol-3-glicerol-fosfato sintasa (trpC, EC 4.1.1.48) y
 triptófano sintasa (trpAB, EC 4.1.2.8 y 4.2.1.122),
 2.) fosfoglicerato deshidrogenasa serA (EC 1.1.1.95),
 3.) 3-fosfoserina fosfatasa SerB (EC 3.1.3.3),

ES 2 645 997 T3

- 4.) 3-fosfoserina/fosfohidroxitreonina aminotransferasa SerC (EC 2.6.1.52),
 - 5.) DHAP sintasa sensible a L-tirosina (aroF, EC 2.5.1.54),
 - 6.) DHAP sintasa resistente a retroalimentación de L-fenilalanina (aroG, EC 2.5.1.54),
 - 7.) DHAP sintasa sensible a L-triptófano (aroH, EC 2.5.1.54),
 - 5 8.) fosfoenolpiruvato sintasa ppsA (EC 2.7.9.2),
 - 9.) fosfoenolpiruvato carboxinasa pck (EC 4.1.1.49),
 - 10.) transcetolasa A tktA (EC 2.2.1.1),
 - 11.) transcetolasa B tktB (EC 2.2.1.1),
 - 12.) producto génico del marco de lectura abierto de *E. coli* (ORF) yddG.
- 10 11. Célula de *E. coli* según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en la que la célula de *E. coli* expresa en una escala reducida, con respecto a su forma no mutante, al menos una secuencia de ácidos nucleicos que codifica cualquiera de las siguientes enzimas:
- 1.) triptofanasa (tnaA, EC 4.1.99.1),
 - 2.) represor del operón de trp (trpR),
 - 15 3.) corismato mutasa T o preferato deshidrogenasa (tyrA, EC 1.3.1.12),
 - 4.) corismato mutasa P o preferato deshidrogenasa (pheA, EC 4.2.1.51),
 - 5.) proteína de transporte específica de triptófano (mtr),
 - 6.) triptófano permeasa (tnaB),
 - 7.) transportador para aminoácidos aromáticos (aroP),
 - 20 8.) L-serina desaminasa (sdaA, EC 4.3.1.17),
 - 9.) glucosa-6-fosfato isomerasa (pgi, EC 5.3.1.9),
 - 10.) tirosina aminotransferasa (tyrB),
 - 11.) represor del regulón de glp (glpR);
 - 12.) factor sigma RpoS (rpoS).
- 25 12. Método de preparación de metionina o triptófano, que comprende la etapa de cultivar una célula de *E. coli* como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11.

Figura 1: Mapa del plásmido pMAK-ligB que contiene el gen ligB

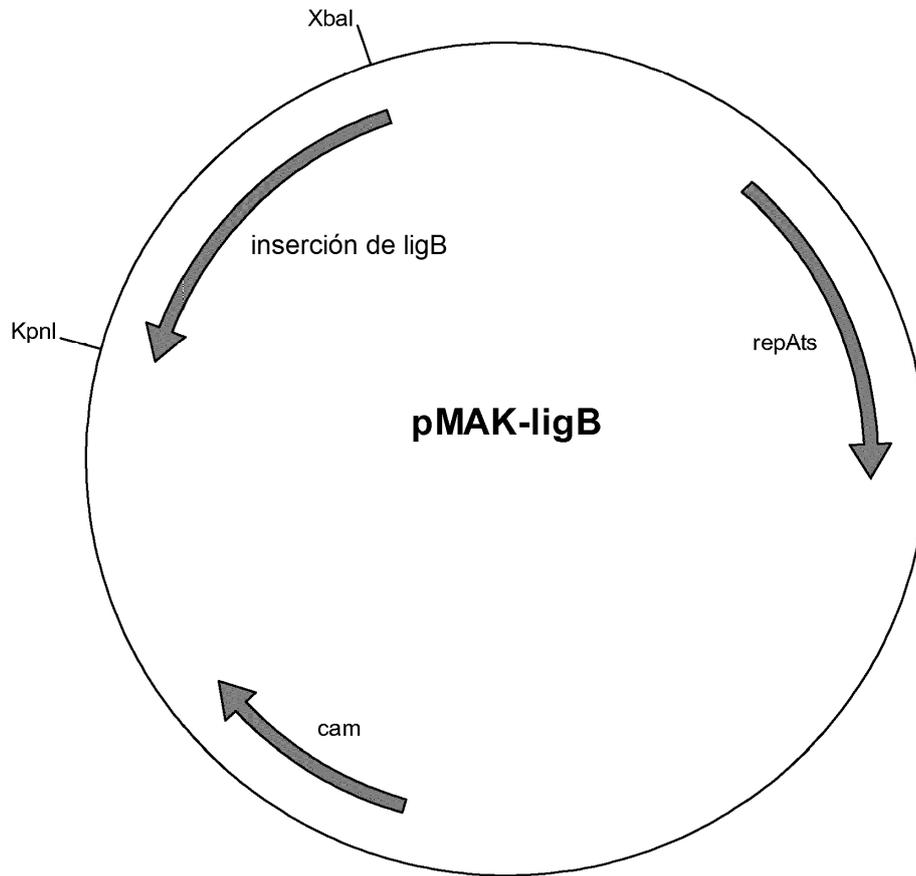


Figura 2: Mapa del plásmido pCC3

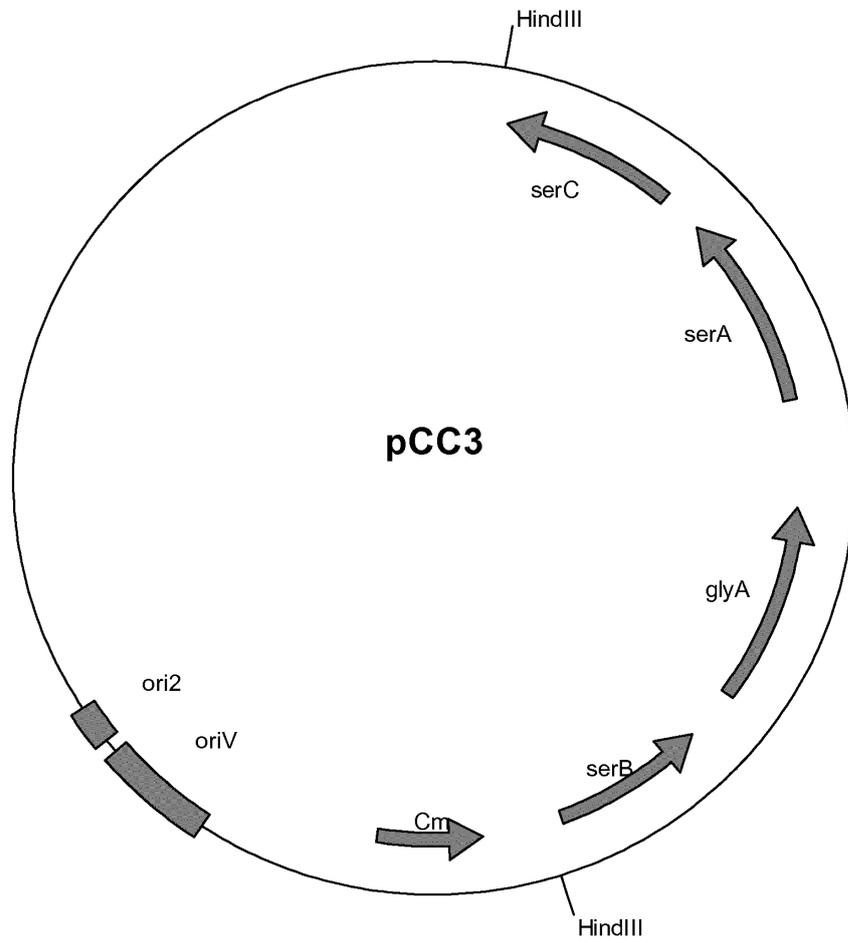


Figura 3: Mapa del plásmido pME-RDL2a

