

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 165**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2010 PCT/JP2010/071102**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11065469**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2010 E 10833315 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2508594**

54 Título: **Bacteria que produce L-cisteína y procedimiento para la producción de L-cisteína**

30 Prioridad:

30.11.2009 JP 2009272358

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

12.12.2017

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, Kyobashi 1-chome Chuo-ku
Tokyo, 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

NONAKA, GEN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 646 165 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

Bacteria que produce L-cisteína y procedimiento para la producción de L-cisteína

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir L-cisteína o una sustancia relacionada con la misma. Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir L-cisteína o una sustancia relacionada con la misma, que utiliza una bacteria adecuada para la producción de L-cisteína o una sustancia relacionada con la misma. La L-cisteína y las sustancias relacionadas con la misma se utilizan en los campos farmacéutico, cosmético y alimentario.

Antecedentes de la técnica

15 La L-cisteína se obtiene convencionalmente mediante extracción a partir de sustancias que contienen queratina, tales como pelo, cuernos y plumas, o mediante la conversión del precursor ácido DL-2-aminotiazolín-4-carboxílico utilizando un enzima microbiano. También se ha planificado producir L-cisteína a gran escala mediante un procedimiento con enzima inmovilizado que utiliza un nuevo enzima. Además, también se ha intentado producir L-cisteína mediante fermentación utilizando un microorganismo.

20 Como microorganismos con capacidad para producir L-cisteína se conoce, por ejemplo, una bacteria corineforme en la que la actividad intracelular de serina acetiltransferasa se encuentra incrementada (documento de patente nº 1). También se conoce una técnica para incrementar la capacidad productora de L-cisteína mediante la incorporación de una serina acetiltransferasa mutante de la que la inhibición por retroalimentación por la L-cisteína se encuentra atenuada (documentos de patente nº 2 a nº 4).

Además, como microorganismos en los que la capacidad productora de L-cisteína se encuentra incrementada mediante la supresión del sistema que actúa descomponiendo la L-cisteína, se conocen bacterias corineformes o bacterias *Escherichia* en las que la actividad de la cistationín-β-liasa (documento de patente nº 2), triptofanasa (documento de patente nº 5) u O-acetilserina sulfhidralasa B (documento de patente nº 6) se encuentra atenuada o anulada.

Además, es conocido que el gen *ydeD* codificante de la proteína YdeD participa en la secreción de productos metabólicos de la ruta de la L-cisteína (documento no de patente nº 1). Además, también se conocen técnicas de incremento de la capacidad de producción de L-cisteína mediante el incremento de la expresión del locus *mar*, el locus *emr*, el locus *acr*, el locus *cmr*, el gen *mex*, el gen *bmr* o el gen *qacA* (documento de patente nº 7), o el gen *emrAB*, *emrKY*, *yoiIH*, *acrEF*, *bcr* o *cusA* (documento de patente nº 8), en los que los loci/genes codifican para proteínas adecuadas para la secreción de una sustancia citotóxica a partir de las células.

Además, como bacteria productora de L-cisteína se conoce *Escherichia coli*, en la que la actividad del factor de control transcripcional positivo del regulón de la cisteína codificado por el gen *cysB* se encuentra incrementada (documento de patente nº 9).

Además, es conocido que un gen *serA* mutante codificante de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa de la que la inhibición por retroalimentación por serina se encuentra atenuada, y se propone la utilización de la misma para la producción de L-cisteína por *Escherichia coli* (documentos de patente nº 10 y nº 11).

Aunque *yciW* se encuentra registrado en la base de datos EcoCyc como gen codificante de una oxidorreductasa predicha (documento no de patente nº 2), las funciones reales de la misma no son conocidas y la relación de las mismas con la producción de L-cisteína no es conocida.

Además, aunque se ha informado de que el gen *yciW* se encuentra regulado positivamente por agotamiento de una fuente de azufre (documento no de patente nº 3), el furfural (documento no de patente nº 4) y el estrés oxidativo (documento no de patente nº 5), se menciona en todos los documentos sólo como uno de entre un gran número de genes que muestran variación en la expresión en los experimentos de micromatriz, y no se ha propuesto la relación de los mismos con la producción de la L-cisteína.

Referencias de la técnica anterior

60 Documentos de patente

Documento de patente nº 1: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2002-233384.

Documento de patente nº 2: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 11-155571.

Documento de patente nº 3: solicitud publicada de patente US nº 20050112731.

65 Documento de patente nº 4: patente US nº 6.218.168.

Documento de patente nº 5: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2003-169668.

Documento de patente nº 6: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-245311.

Documento de patente nº 7: patente US nº 5.972.663.

Documento de patente nº 8: patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-287333.

Documento de patente nº 9: publicación de patente internacional nº WO01/27307.

5 Documento de patente nº 10: patente US nº 5.856.148.

Documento de patente nº 11: solicitud publicada de patente US nº 20050009162.

Documentos no de patente

10 Documento no de patente nº 1: Dabler et al., Mol. Microbiol. 36:1101-1112, 2000.

Documento no de patente nº 2: página principal de BioCyc, *Escherichia coli* K-12-substr. MG1655 Gen: *yciW* [búsqueda de 14 de octubre de 2009], dirección URL de Internet: <<http://biocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=G6640>>

Documento no de patente nº 3: Gyaneshwar P. et al., J. Bacteriol. 187:1074-1090, 2005.

15 Documento no de patente nº 4: Elliot N., Miller E.N. et al., Appl. Envir. Microbiol. 10.1128-/AEM.01187-09, 2009.

Documento no de patente nº 5: Wang S. et al., Appl. Envir. Microbiol. 10.1128/AEM.00914-09, 2009.

Divulgación de la invención

20 El documento US 20090226983 da a conocer una bacteria perteneciente a la familia de las enterobacteriáceas que presenta capacidad de producción de L-cisteína y ha sido modificada para reducir la actividad de la proteína codificada por el gen *yhaM*.

Objetivo que debe alcanzar la invención

25 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir L-cisteína, L-cistina, un derivado de las mismas, o una mezcla de las mismas mediante el desarrollo de una nueva técnica para mejorar la capacidad de producción de L-cisteína de una bacteria.

30 En el contexto de la presente invención se han realizado diversas investigaciones con el fin de conseguir el objetivo mencionado anteriormente. Como resultado se ha descubierto que la capacidad de producción de L-cisteína de una bacteria podría mejorarse mediante la modificación de la bacteria de manera que se reduzca la actividad de la proteína codificada por el gen *yciW*, y de esta manera ha llevado a cabo la presente invención.

35 Es decir, la presente invención puede realizarse de la manera siguiente.

[1] Un procedimiento para producir L-cisteína, L-cistina, un derivado de las mismas, o una mezcla de las mismas, que comprende cultivar una bacteria *Escherichia* en un medio y recoger L-cisteína, L-cistina, un derivado de las mismas, o una mezcla de las mismas a partir del medio, en el que la bacteria presenta capacidad de producción de L-cisteína y ha sido modificada para que la actividad de la proteína codificada por el gen *yciW* se encuentre reducida mediante reducción de la cantidad expresada del gen *yciW*, o mediante la disrupción del gen.

40

[2] El procedimiento según [1], en el que la proteína es una proteína definida en (A) o (B) a continuación:

45 (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 2.

(B) Una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 2, pero que incluye la sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o varios residuos aminoácidos, la reducción de la actividad de la cual en la bacteria resulta en la mejora de la capacidad de producción de L-cisteína.

50

[3] El procedimiento según [1] o [2], en el que el gen *yciW* es un ADN definido en (a) o (b) a continuación:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de las posiciones 301 a 1.428 en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 1,

55

(b) un ADN hibridable con una secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos de las posiciones 301 a 1.428 en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 1 o con una sonda que puede prepararse a partir de dicha secuencia complementaria, bajo condiciones restrictivas que comprenden el lavado a una concentración salina y a una temperatura correspondientes a 1 x SSC, 0,1% de SDS a 60°C, y la codificación de una proteína la reducción de actividad de la cual en una bacteria resulta en la mejora de la capacidad de producción de L-cisteína.

60

[4] El procedimiento según cualquiera de entre [1] y [3], en el que la bacteria comprende además por lo menos una de las características siguientes:

65

i) ha sido modificada de manera que la actividad de serina acetiltransferasa se encuentra incrementada,

- ii) ha sido modificada de manera que la expresión del gen *ydeD* se encuentra incrementada,
- iii) ha sido modificada de manera que la actividad de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa se encuentra incrementada.

5 [5] El procedimiento según cualquiera de entre [1] y [4], en el que la bacteria es *Escherichia coli*.

[6] El procedimiento según cualquiera de entre [1] y [5], en el que el derivado de L-cisteína es un derivado tiazolidina.

10 **Efecto de la invención**

Según la presente invención, pueden producirse eficientemente L-cisteína, L-cistina, un derivado de las mismas, o una mezcla de las mismas.

15 **Modos de poner en práctica la invención**

<1> Bacteria utilizada en la presente invención

20 La bacteria utilizada en la presente invención es una bacteria *Escherichia* que presenta una capacidad de producción de L-cisteína y ha sido modificada de manera que la actividad de la proteína codificada por el gen *yciW* se encuentra reducida. La capacidad de producción de L-cisteína a la que se hace referencia en la presente memoria se refiere a una capacidad de la bacteria de producir L-cisteína en un medio o en las células de la bacteria y que se acumula en las mismas en una cantidad que permite la recolección de la L-cisteína del medio o de las células al cultivar la bacteria en el medio. Una bacteria con capacidad de producción de L-cisteína se refiere a una bacteria que puede producir y en la que puede acumularse L-cisteína en el medio en una cantidad mayor que con una cepa de tipo salvaje o con una cepa parental, preferentemente una bacteria que puede producir y en la que se puede acumular L-cisteína en el medio en una cantidad de 0,05 g/l o superior, más preferentemente de 0,1 g/l o superior, particularmente preferida de 0,2 g/l o superior.

30 Una parte de la L-cisteína producida por la bacteria puede convertirse en L-cistina en el medio mediante la formación de un enlace disulfuro. Además, la S-sulfocisteína puede generarse mediante la reacción de la L-cisteína y tiosulfato contenido en el medio (Szczepkowski T.W., Nature 182, 1958) tal como se menciona a continuación. Además, la L-cisteína generada en las células bacterianas puede condensarse con una cetona o aldehído, por ejemplo ácido pirúvico, que se encuentra presente en las células, para producir un derivado tiazolidina mediante un hemitiocetal como producto intermedio (ver la patente japonesa nº 2992010). Este derivado tiazolidina y el hemitiocetal pueden encontrarse presentes en forma de mezcla en equilibrio. Por lo tanto, la capacidad de producción de L-cisteína no se encuentra limitada a la capacidad de acumular únicamente L-cisteína en el medio o en las células, sino que también incluye la capacidad de acumular, además de L-cisteína, L-cistina, un derivado de la misma, tal como S-sulfocisteína, un derivado tiazolidina, o un hemitiocetal, o una mezcla de los mismos en el medio. Además, la L-cisteína se utiliza como materia prima en las biosíntesis de γ -glutamilcisteína, glutatión, cistationina, homocisteína, metionina, S-adenosilmetionina, etc. Por lo tanto, mediante la utilización de una bacteria con capacidad para producir cualquiera de dichos compuestos además de la capacidad de producir L-cisteína, pueden producirse dichos compuestos. Por lo tanto, la capacidad de producir L-cisteína también incluye la capacidad de acumular otro compuesto que se produce mediante la L-cisteína.

45 La bacteria que presenta capacidad de producir L-cisteína puede presentar inherentemente la capacidad de producción de L-cisteína, o puede obtenerse mediante la modificación de una bacteria, tal como las indicadas a continuación, mediante mutagénesis, o mediante una técnica de ADN recombinante, de manera que adquiera la capacidad de producción de L-cisteína. En la presente invención, a menos que se indique específicamente, el término L-cisteína puede utilizarse para referirse a L-cisteína de tipo reducido, L-cistina, un derivado tal como los indicados anteriormente o una mezcla de los mismos.

La bacteria utilizada para la presente invención es una bacteria del género *Escherichia*.

55 Aunque las bacterias *Escherichia* no se encuentran particularmente limitadas, pueden utilizarse específicamente las indicadas en el trabajo de Neidhardt et al. (Backmann B.J., Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, páginas 2460 a 2488, Tabla 1, en F.D. Neidhardt (editor), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/segunda edición, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., 1996). Entre ellas, puede utilizarse, por ejemplo, *Escherichia coli*. Entre los ejemplos específicos de *Escherichia coli* se incluyen *Escherichia coli* W3110 (ATCC nº 27325), *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076), y otras, las cuales se derivan de la cepa prototipo de tipo salvaje, la cepa K12.

65 Dichas cepas se encuentran disponibles a partir de, por ejemplo, la American Type Culture Collection (dirección: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos). Es decir, los números de registro se proporcionan para cada una de dichas cepas y las cepas pueden encargarse

mediante la utilización de estos números de registro (ver <http://www.atcc.org/>). Los números de registro de las cepas están enumerados en el catálogo de la American Type Culture Collection.

5 En adelante en la presente memoria se describen procedimientos para proporcionar la capacidad de producir L-cisteína a las bacterias *Escherichia*, o los procedimientos para potenciar la capacidad de producción de L-cisteína de dichas bacterias.

10 Para proporcionar capacidad de producción de L-cisteína a una bacteria, pueden utilizarse procedimientos utilizados convencionalmente en la cría de las bacterias corineformes, las bacterias *Escherichia*. Entre dichos procedimientos se incluyen la adquisición de una cepa mutante auxótrofa, una cepa resistente a análogos, o una cepa mutante de la regulación metabólica, o la construcción de una cepa recombinante en la que se sobreexpone un enzima de biosíntesis de la L-cisteína, y otros (ver "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1a edición, publicada el 30 de mayo de 1986, páginas 77 a 100). En el cultivo de las bacterias productoras de L-cisteína, puede proporcionarse la propiedad o propiedades anteriormente indicadas, tales como la auxotrofia, la resistencia a análogos y la mutación de la regulación metabólica, solas o en combinaciones de dos o más. La expresión del enzima o enzimas de biosíntesis de la L-cisteína puede incrementarse sola o en combinaciones de dos o más. Además, la provisión de propiedades tales como la auxotrofia, la resistencia a análogos y la mutación de la regulación metabólica pueden combinarse con la potenciación de un enzima biosintético.

20 Puede obtenerse una cepa mutante auxótrofa, una cepa resistente a un análogo de la L-cisteína, o una cepa mutante de la regulación metabólica con capacidad de producción de L-cisteína, sometiendo una cepa parental o cepa de tipo salvaje a mutagénesis convencional, tal como la exposición a rayos X o la irradiación de UV o el tratamiento con un mutágeno tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o metanosulfonato de etilo (EMS), seguido de la selección de una cepa que muestre auxotrofia, resistencia a análogos o una mutación de la regulación metabólica y que presente una capacidad de producción de un L-aminoácido a partir de las cepas mutantes obtenidas.

30 La capacidad de producción de L-cisteína de una bacteria puede mejorarse potenciando la actividad de un enzima de la ruta de biosíntesis de la L-cisteína o de un enzima que participe en la generación de un compuesto que actúe como sustrato en la ruta, tal como la L-serina, por ejemplo la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa y la serina acetiltransferasa. Debido a que la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa resulta inhibida mediante inhibición por retroalimentación por la serina, la actividad enzimática de dicho enzima puede incrementarse mediante la incorporación en una bacteria de un gen *serA* de tipo mutante codificante para una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa mutante en la que la inhibición por retroalimentación se encuentre atenuada o anulada.

40 Además, la serina acetiltransferasa resulta inhibida mediante inhibición por retroalimentación por la L-cisteína. Por lo tanto, la actividad enzimática de dicho enzima puede incrementarse mediante la incorporación en una bacteria de un gen *cysE* de tipo mutante que codifique para una serina acetiltransferasa en la que la inhibición por retroalimentación se encuentre atenuada o anulada.

45 La capacidad de producción de L-cisteína también puede incrementarse potenciando la expresión del gen *ydeD*, codificante para la proteína YdeD (Dabler et al., Mol. Microbiol. 36:1101-1112, 2000) o el gen *yfiK* codificante para la proteína YfiK (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2004-49237).

Una forma de realización de la bacteria utilizada en la presente invención es una bacteria que presenta por lo menos una de las características siguientes:

50 i) ha sido modificada de manera que la actividad de serina acetiltransferasa se encuentra incrementada, ii) ha sido modificada de manera que la expresión del gen *ydeD* se encuentra incrementada y iii) ha sido modificada de manera que la actividad de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa se encuentra incrementada.

55 Además, la capacidad de producción de L-cisteína también puede mejorarse potenciando la actividad del sistema de transporte de sulfato/tiosulfato. Las proteínas del sistema de transporte de sulfato/tiosulfato se encuentran codificadas por el complejo génico *cysPTWAM* (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-137369, patente europea nº 1528108).

60 La capacidad de producción de L-cisteína de una bacteria también puede mejorarse mediante el incremento de la expresión del gen *yeaS* (patente europea abierta al público nº 1016710).

65 Entre los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-cisteína se incluyen de manera no limitativa cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tal como la cepa *E. coli* JM15 transformada con múltiples tipos de alelos de *cysE* codificantes de serina acetiltransferasa (SAT) resistente a la inhibición por retroalimentación (patente US nº 6.218.168), la cepa *E. coli* W3110 con un gen sobreexpresado codificante de una proteína adecuada para la secreción de una sustancia citotóxica (patente US nº 5.972.663), la cepa de *E. coli* en la que se encuentra reducida la actividad de la cisteína desulfhidrasa (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 11-155571) y la

cepa *E. coli* W3310 en la que la actividad del factor de control transcripcional positivo del regulón cisteína codificado por el gen *cysB* se encuentra incrementada (documento nº WO01/27307), *E. coli* que presenta el plásmido pACYC-DES (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-137369 (solicitud publicada de patente US nº 20050124049 (A1), patente europea abierta al público nº 1528108 (A1)) que contiene el gen *ydeD*, un gen *cysE* mutante y un gen *serA5* mutante, y otros. El pACYC-DES es un plásmido obtenido mediante la inserción de los tres tipos anteriormente indicados de genes en pACYC184 y la expresión de cada uno de los genes se encuentra controlada por el promotor *PompA*.

Como proteínas que presentan actividad de cisteína desulfhidrasa de *E. coli*, se conoce la cistationín-β-liasa (producto de *metC*, patente japonesa abierta al público nº 11-155571, Chandra et al., Biochemistry 21:3064-3069, 1982), triptofanasa (producto de *tnA*, patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2003-169668; Austin Newton et al., J. Biol. Chem. 240:1211-1218, 1965), O-acetilserina sulfhidrilasa B (producto del gen *cysM*, patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-245311) y el producto del gen *malY* (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-245311). Mediante la reducción de las actividades de dichas proteínas, se mejora la capacidad de producción de L-cisteína.

En la presente invención, la bacteria productora de L-cisteína preferentemente presenta una SAT mutante que es resistente a la inhibición por retroalimentación. Como SAT mutante que deriva de *Escherichia coli* y es resistente a la inhibición por retroalimentación, se conoce específicamente la SAT mutante en la que el residuo metionina en la posición 256 ha sido sustituido por un residuo de glutamato (patente japonesa abierta al público nº 11-155571), la SAT mutante en la que el residuo metionina en la posición 256 se ha sustituido por un residuo de glutamato (patente japonesa abierta al público nº 11-155571), la SAT mutante en la que el residuo de metionina en la posición 256 se ha sustituido por un residuo de isoleucina (Denk D. y Boeck A., J. General Microbiol. 133:515-525, 198), la SAT mutante que presenta una mutación en la región entre el residuo aminoácido en la posición 97 y el residuo aminoácido en la posición 273 o la eliminación de la región C-terminal entre el residuo aminoácido en la posición 227 (publicación de patente internacional nº WO97/15673, patente US nº 6.218.168), la SAT mutante en la que la secuencia de aminoácidos correspondiente a las posiciones 89 a 96 de la SAT de tipo salvaje contiene una o más mutaciones y que se encuentra desensibilizada frente a la inhibición por retroalimentación por L-cisteína (solicitud publicada de patente US nº 20050112731 (A1)), la SAT mutante en la que el residuo de Val y el residuo de Asp en las posiciones 95 y 96 de SAT han sido sustituidas por un residuo de Arg y un residuo de Pro, respectivamente (nombre del gen mutante: *cysE5*, documento nº WO2005/007841), la mutación en la que el residuo de treonina en la posición 167 ha sido sustituido por un residuo de alanina (patente US nº 6.218.168, solicitud publicada de patente US nº 20050112731 (A1)) y otros.

El gen de SAT no se encuentra limitado al gen de *Escherichia coli* y puede utilizarse cualquier gen codificante para una proteína que presenta actividad de SAT. Es conocido un isozima de SAT de *Arabidopsis thaliana* desensibilizado respecto a la inhibición por retroalimentación por la L-cisteína y también puede utilizarse el gen codificante de dicho isoenzima (FEMS Microbiol. Lett. 179:453-459, 1999).

En el caso de que se introduzca un gen codificante de una SAT mutante en una bacteria, se proporciona capacidad de producción de L-cisteína.

Para introducir un gen en una bacteria, pueden utilizarse diversos vectores para la expresión habitual de las proteínas. Entre los ejemplos de dichos vectores se incluyen pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pBR322, pACYC184, pMW219 y otros.

Con el fin de introducir un vector recombinante en una bacteria pueden utilizarse procedimientos utilizados habitualmente para la transformación de bacterias, tales como el procedimiento de D.A. Morrison (Methods in Enzymology 68:326, 1979), un procedimiento de tratamiento de células receptoras con cloruro de calcio para incrementar la permeabilidad de las células para el ADN (Mandel M. y Higa A., J. Mol. Biol. 53:159, 1970) y un procedimiento basado en la electroporación.

Además, también puede incrementarse la actividad de una proteína, tal como SAT, mediante el incremento del número de copia del gen codificante para la proteína. El número de copia de un gen puede incrementarse mediante la introducción del gen en una bacteria mediante la utilización de un vector tal como los indicados anteriormente, o mediante la introducción de múltiples copias del gen en el ADN cromosómico de una bacteria. Se introducen múltiples copias del gen mediante recombinación homóloga utilizando una secuencia presente en el ADN cromosómico en un número de copia múltiple como diana. Puede utilizarse un ADN repetitivo o una repetición invertida en los extremos de un trasposón como secuencia presente en un ADN cromosómico en un número de copia múltiple. Alternativamente, tal como se da a conocer en la patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2-109985, pueden introducirse múltiples copias de un gen en un ADN cromosómico mediante la incorporación de las mismas en un trasposón y transfiriéndolo.

La capacidad de producir compuestos biosintetizados a partir de la L-cisteína como materia prima, tal como γ-glutamilcisteína, glutatión, cistationina, homocisteína, metionina y S-adenosilmetionina, también puede proporcionarse o potenciarse mediante el incremento de la actividad de un enzima de la ruta de biosíntesis de un

compuesto objetivo, o mediante la reducción de la actividad de un enzima de una ruta que se desvíe de la ruta de biosíntesis de un compuesto objetivo o un enzima que descomponga el compuesto objetivo.

5 Por ejemplo, la capacidad de producir γ -glutamilcisteína puede potenciarse mediante el incremento de la actividad de la γ -glutamilcisteína sintetasa y/o mediante la reducción de la actividad de la glutatión sintetasa. Además, la capacidad de producir glutatión puede proporcionarse o potenciarse mediante el incremento de la actividad de la γ -glutamilcisteína sintetasa y/o de la actividad de glutatión sintetasa. Además, mediante la utilización de una γ -glutamilcisteína sintetasa mutante resistente a la inhibición por retroalimentación por el glutatión, puede incrementarse la capacidad de producción de γ -glutamilcisteína o glutatión. La producción del glutatión se describe en detalle en la revisión de Li et al. (Yin Li, Gongyuan Wei, Jian Chen, Appl. Microbiol. Biotechnol. 66:233-242, 2004).

15 La capacidad de producir L-metionina puede proporcionarse o potenciarse mediante el incremento de la auxotrofia de L-treonina o de la resistencia a norleucina (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2000-139471). En *E. coli*, los genes de los enzimas que participan en la biosíntesis de la L-treonina existen como operón treonina (*thrABC*) y una cepa auxótrofa para L-treonina que ha perdido la capacidad de biosíntesis para la L-homoserina y pueden obtenerse los compuestos siguientes, por ejemplo mediante la eliminación de la fracción *thrBC*. En una cepa resistente a la norleucina, se atenúa la actividad de la S-adenosilmetionina sintetasa y se proporciona o se potencia la capacidad de producción de L-metionina. En *E. coli*, la S-adenosilmetionina sintetasa se encuentra codificada por el gen *metK*. La capacidad de producir L-metionina también puede proporcionarse o potenciarse mediante la eliminación del represor de metionina o mediante el incremento de la actividad de un enzima que participa en la biosíntesis de la L-metionina, tal como la homoserina trans-succinilasa, la cistationina γ -sintasa y la aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa II (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2000-139471). En *E. coli*, el represor de metionina se encuentra codificado por el gen *metJ*, la homoserina trans-succinilasa se encuentra codificada por el gen *metA*, la cistationina γ -sintasa se encuentra codificada por el gen *metB* y la aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa II se encuentra codificada por el gen *metL*. Además, mediante la utilización de una homoserina trans-succinilasa mutante resistente a la inhibición por retroalimentación por la L-metionina, también puede proporcionarse o potenciarse la capacidad de producción de L-metionina (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2000-139471, la solicitud publicada de patente US nº 200090029424). Debido a que la L-metionina se biosintetiza pasando por la L-cisteína como producto intermedio, también puede mejorarse la capacidad de producción de la L-metionina mediante la mejora de la capacidad de producir la L-cisteína (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2000-139471, la solicitud publicada de patente US nº 20080311632). Por lo tanto, para proporcionar o potenciar la capacidad de producir la L-metionina, también resulta eficaz proporcionar o potenciar la capacidad de producir L-cisteína.

35 Entre los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-metionina y las cepas parentales utilizadas para la construcción de las mismas se incluyen cepas de *E. coli* tales como AJ11539 (NRRL nº B-12399), AJ11540 (NRRL nº B-12400), AJ11541 (NRRL nº B-12401), AJ11542 (NRRL nº B-12402) (patente británica nº 2075055), cepa 218 resistente a norleucina, que es un análogo de la L-metionina (VKPM B-8125, patente rusa nº 2209248) y cepa 73 (VKPM B-8126, patente rusa nº 2215782).

45 Además, como bacteria productora de L-metionina o como cepa parental utilizada para la construcción de la misma, también puede utilizarse AJ13425 derivada de *E. coli* W3110 (FERM nº P-16808, patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2000-139471). AJ13425 es una cepa auxótrofa para L-treonina en la que el represor de metionina se encuentra eliminado, la actividad intracelular de la S-adenosilmetionina sintetasa se encuentra atenuada y la actividad intracelular de la homoserina trans-succinilasa, la actividad de la cistationina γ -sintasa y la actividad de la aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa II se encuentran incrementadas. AJ13425 fue depositada el 14 de mayo de 1998 en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (actualmente el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, depósito internacional de organismos de patente, dirección: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) y se le ha asignado el número de acceso de FERM nº P-16808.

55 Debido a que la cistationina y la homocisteína son productos intermedios de la ruta de biosíntesis de la L-metionina, resulta eficaz utilizar parcialmente los procedimientos anteriormente mencionados con el fin de incrementar la capacidad de producción de la L-metionina e incrementar de esta manera las capacidades de producción de dichas sustancias. Como procedimientos específicos para incrementar la capacidad de producir cistationina, se conoce un procedimiento que utiliza una cepa mutante auxótrofa para metionina (solicitud de patente japonesa nº 2003-010654) y un procedimiento de adición de cisteína (o materia prima para la biosíntesis de la misma) y/o homoserina (o materia prima para la biosíntesis de la misma) a un medio de fermentación (patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-168422). Debido a que la homocisteína es producida mediante la utilización de cistationina como precursor, los procedimientos mencionados anteriormente para incrementar la capacidad de producir cistationina también resultan eficaces para incrementar la capacidad de producción de homocisteína.

65

Debido a que la L-metionina es un precursor de la S-adenosilmetionina, para incrementar la capacidad de producción de S-adenosilmetionina, resulta eficaz utilizar parcialmente los procedimientos anteriormente indicados para incrementar la capacidad de producción de L-metionina. Por ejemplo, puede proporcionarse o potenciarse la capacidad de producir S-adenosilmetionina potenciando la metionina adenosiltransferasa (patente europea abierta al público nº 0647712 y Nº 1457569) o potenciando el factor de secreción MdfA (patente US nº 7.410.789).

La bacteria utilizada en la presente invención puede obtenerse mediante la modificación de dicha bacteria de *Escherichia* y que presenta la capacidad de producción de L-cisteína tal como se ha indicado anteriormente de manera que se reduce la actividad de la proteína codificada por el gen *yciW* (en adelante también denominada "YciW"). Alternativamente, tras modificar la bacteria de manera que se reduce la actividad de la proteína YciW, puede proporcionarse la capacidad de producir L-cisteína.

El término gen *yciW* es sinónimo de ECK1282 y JW5200.

La expresión "actividad de la proteína codificada por el gen *yciW* se encuentra reducida" se refiere a que la actividad de la proteína YciW codificada por el gen *yciW* se encuentra reducida en comparación con la de una cepa no modificada, tal como una cepa de tipo salvaje o una cepa parental, e incluye el caso en que la actividad ha desaparecido por completo.

Dicha modificación para reducir la actividad de la proteína YciW se consigue mediante, por ejemplo, la reducción de la expresión del gen *yciW*. Específicamente, por ejemplo, puede reducirse la actividad intracelular de la proteína mediante la eliminación de una parte o la totalidad de la región codificante del gen *yciW* en un cromosoma. La actividad de la proteína YciW también puede reducirse mediante la reducción de la expresión del gen *yciW* modificando una secuencia de control de la expresión, tal como la secuencia del promotor y la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) del gen *yciW*, y similares. Además, el nivel de expresión del gen también puede reducirse mediante la modificación de una región no traducida diferente de la secuencia de control de la expresión. Además, puede eliminarse el gen entero que incluye las secuencias presentes en ambos lados del gen en un cromosoma. Adicionalmente, también puede conseguirse mediante la introducción de una sustitución de aminoácido (mutación de sentido incorrecto ("missense")), un codón de parada (mutación sin sentido ("nonsense")) o una mutación por desplazamiento de marco que añade o elimina uno o dos nucleótidos, en la región codificante del gen *yciW* en un cromosoma (Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617, 1997; Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 95:5511-5515, 1998; Journal of Biological Chemistry 266:20833-20839, 1991). Además, la expresión del gen también puede reducirse mediante la manipulación de un factor que participa en el control de la expresión (moléculas pequeñas que participan en el control transcripcional o traduccional (inductor, inhibidor, etc.), proteínas (factor transcripcional, etc.), ácidos nucleicos (ARNs, etc.) y similares).

Además, la modificación puede ser una modificación provocada mediante mutagénesis convencional basada en rayos X o irradiación ultravioleta o en la utilización de un mutágeno, tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, con la condición de que sea una modificación que reduzca la actividad de la proteína YciW.

Se lleva a cabo una modificación de una secuencia de control de la expresión para preferentemente uno o más nucleótidos, más preferentemente dos o más nucleótidos, particularmente preferentemente tres o más nucleótidos. Al eliminar una región codificante, la región que debe eliminarse puede ser cualquiera de entre una región N-terminal, una región interna o una región C-terminal, o incluso puede ser la región codificante entera, con la condición de que la función de la proteína YciW resulte reducida o anulada. La eliminación de una región más larga habitualmente puede inactivar con más seguridad un gen. Además, resulta preferido que los marcos de lectura situados cadena arriba y cadena abajo de la región que debe eliminarse no sean iguales.

Además, también puede llevarse a cabo una modificación para reducir la actividad de la proteína YciW mediante la inserción de otra secuencia en la región codificante del gen *yciW*. Al insertar otra secuencia en la región codificante del gen *yciW*, dicha secuencia puede insertarse en cualquier región del gen y la inserción de una secuencia más larga puede inactivar con más seguridad el gen. Resulta preferido que los marcos de lectura situados cadena arriba y cadena abajo del sitio de inserción no sean iguales. La otra secuencia no se encuentra particularmente limitada con la condición de que se seleccione una secuencia la inserción de la cual reduzca o anule la función de la proteína YciW, y entre los ejemplos se incluyen un trasposón portador de un gen de resistencia a antibióticos o un gen útil para la producción de L-cisteína, y similares.

El gen *yciW* en el cromosoma puede modificarse tal como se ha mencionado anteriormente mediante, por ejemplo, la preparación de un gen de tipo eliminación en el que se elimina una secuencia parcial del gen de manera que el gen de tipo eliminación no produzca la proteína YciW que funciona normalmente y transformar una bacteria con un ADN que contiene el gen de tipo eliminación para causar la recombinación homóloga entre el gen de tipo eliminación y el gen en el cromosoma, y sustituir de esta manera el gen de tipo eliminación para el gen en el cromosoma. La proteína YciW codificada por el gen de tipo eliminación presenta una conformación diferente de la de la proteína de tipo salvaje, si se produce en absoluto, y de esta manera se reduce o se anula la

función. Dicha disrupción génica basada en la sustitución génica mediante recombinación homóloga ya es un procedimiento establecido y existe un procedimiento denominado "integración controlada por Red" (Datsenko K.A. y Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000), un procedimiento que utiliza un ADN lineal, tal como un procedimiento que utiliza la integración controlada por Red en combinación con un sistema de extracción derivado del fago λ (Cho E.H., Gumpert R.I., Gardner J.F., J. Bacteriol. 184:5200-5203, 2002) (ver el documento nº WO2005/010175), un procedimiento que utiliza un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a la temperatura, un procedimiento que utiliza un plásmido susceptible de transferencia por conjugación, un procedimiento que utiliza un vector suicida que no presenta origen de replicación en un huésped (patente US nº 6.303.383, patente japonesa abierta al público nº 05-007491) y similares.

La reducción de la cantidad de transcripción del gen *yciW* puede confirmarse mediante la comparación de la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen con la observada en una cepa de tipo salvaje o una cepa no modificada. Entre los ejemplos del procedimiento para evaluar la cantidad de ARNm se incluyen la hibridación northern, la RT-PCR (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 2001) y similares.

La reducción de la cantidad de proteína YciW puede confirmarse mediante transferencia western utilizando anticuerpos (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 2001).

El gen *yciW* de la cepa *Escherichia coli* K12 corresponde a una secuencia complementaria de la secuencia en las posiciones 1347004 a 1348131 en la secuencia genómica registrada en la base de datos de NCBI como acceso de GenBank nº NC_000913 (versión NC_000913.2 GI: 49175990). Además, la proteína YciW está registrada como GenBank nº de acceso NP_415803 (versión NP_415803.2 GI: 90111242, locus_tag="b1287"). La secuencia de nucleótidos que contiene el gen *yciW* y 300 pb de regiones cadena arriba y cadena abajo del mismo, y la secuencia de aminoácidos codificada por dicho gen se muestran en SEC ID nº 1 y nº 2, respectivamente.

Debido a que la secuencia de nucleótidos del gen *yciW* puede diferir según el género, especie o cepa a la que pertenezca la bacteria, el gen *yciW* que debe modificarse puede ser una variante de la secuencia de nucleótidos en las posiciones 301 a 1.428 de la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1. Puede buscarse una variante del gen *yciW* mediante la utilización de BLAST (<http://blast.genome.jp/>) o similar haciendo referencia a la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1. Además, la variante del gen *yciW* incluye homólogos del gen, tal como genes que pueden amplificarse mediante PCR utilizando, por ejemplo, un cromosoma de dicho microorganismo, tal como como una bacteria perteneciente a la familia de las enterobacteriáceas o bacterias corineformes, a modo de molde y oligonucleótidos sintéticos preparados basándose en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº 1.

Entre los ejemplos de los homólogos del gen *yciW* de bacterias diferentes de *Escherichia coli* se incluyen los genes *yciW* de las bacterias siguientes. En la Tabla 1, la identidad (%) indica la identidad entre la proteína YciW de la cepa *Escherichia coli* K12 y el homólogo de cada bacteria determinada por BLAST. Los números de acceso son los números de acceso de la base de datos NCBI.

[Tabla 1]

Cepa	Observación	Identidad (%)	Número de acceso
<i>Shigella dysenteriae</i> 1012	proteína hipotética conservada	96	ZP_03066078
<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 2457T	oxidorreductasa conservada	96	NP_836979
<i>Shigella boydii</i> CDC 3083-94	proteína hipotética	94	YP_001880125
<i>Shigella boydii</i> Sb227	oxidorreductasa putativa	94	YP_408203
<i>Escherichia albertii</i> TW07627	oxidorreductasa putativa	77	ZP_02903357
<i>Citrobacter koseri</i> ATCC BAA-895	proteína hipotética	60	YP_001452946
<i>Citrobacter youngae</i> ATCC 29220	proteína hipotética	58	Z_03836971
<i>Citrobacter</i> sp. 30_2	proteína hipotética conservada	57	ZP_04562177
<i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	amidasa o amidotransferasa putativa	54	YP_002382809
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Tennessee</i> str. CDC07-0191	proteína hipotética	53	ZP_04655747
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	proteína hipotética	54	YP_002238976
<i>Cronobacter turicensis</i>	proteína no caracterizada	48	YP_003210691
<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894	proteína hipotética	47	YP_001437680
<i>Enterobacter</i> sp. 638	oxidorreductasa putativa	46	YP_001176905
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	proteína citoplasmática putativa	50	NP_460660
<i>Pantoea</i> sp. At-9b	proteína hipotética conservada	41	ZP_05729283
<i>Erwinia pyrifoliae</i> Ep1/96	proteína hipotética	39	YP_002648706

<i>Erwinia tasmaniensis</i> Et1/99	proteína hipotética conservada	40	YP_001907570
<i>Yersinia intermedia</i> ATCC 29909	proteína hipotética	38	ZP_04635903
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081	proteína hipotética	36	YP_001006371
<i>Serratia proteamaculans</i> 568	enzima relacionado con peroxidasa no caracterizado	37	YP_001478863
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> YPIII	proteína hipotética	34	YP_001720631
<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> AAC00-1	peroxidasa no caracterizada-enzima no relacionado	28	YP_972817

El gen *yciW* también puede ser un gen codificante para una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína YciW tal como se ha mencionado anteriormente, pero que incluye la sustitución, eliminación, inserción, adición o similar de uno o varios residuos aminoácidos en una o varias posiciones, con la condición de que codifique una proteína, la reducción de la actividad de la cual en la bacteria resulta en la mejora de la capacidad de producción de L-cisteína. Aunque el número al que hace referencia la expresión "uno o varios" puede diferir según las posiciones de los residuos aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína o los tipos de los residuos aminoácidos, específicamente preferentemente es de entre 1 y 20, más preferentemente de entre 1 y 10, todavía más preferentemente de entre 1 y 5. La sustitución, eliminación, inserción o adición anteriormente indicadas de uno o varios residuos aminoácidos es una mutación conservadora que mantiene la función normal de la proteína. La mutación conservadora típicamente es una sustitución conservadora. La sustitución conservadora es una mutación en la que la sustitución tiene lugar mutuamente entre Phe, Trp y Tyr, en el caso de que el sitio de sustitución sea de un aminoácido aromático; de entre Leu, Ile y Val, en el caso de que sea un aminoácido hidrófobo; de entre Gln y Asn, en el caso de que sea un aminoácido polar; de entre Lys, Arg e His, en el caso de que sea un aminoácido básico; de entre Asp y Glu, en el caso de que sea un aminoácido ácido, y de entre Ser y Thr, en el caso de que sea un aminoácido con grupo hidroxilo. Entre los ejemplos específicos de sustituciones conservadoras se incluyen: la sustitución de Ser o Thr por Ala; la sustitución de Gln, His o Lys por Arg; la sustitución de Glu, Gln, Lys, His o Asp por Asn; la sustitución de Asn, Glu o Gln por Asp; la sustitución de Ser o Ala por Cys; la sustitución de Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg por Gln; la sustitución de Gly, Asn, Gln, Lys o Asp por Glu; la sustitución de Pro por Gly; la sustitución de Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr por His; la sustitución de Leu, Met, Val o Phe por Ile; la sustitución de Ile, Met, Val o Phe por Leu; la sustitución de Asn, Glu, Gln, His o Arg por Lys; la sustitución de Ile, Leu, Val o Phe por Met; la sustitución de Trp, Tyr, Met, Ile o Leu por Phe; la sustitución de Thr o Ala por Ser; la sustitución de Ser o Ala por Thr; la sustitución de Phe o Tyr por Trp; la sustitución de His, Phe o Trp por Tyr, y la sustitución de Met, Ile o Leu por Val. La sustitución, eliminación, inserción, adición, inversión, etc. de aminoácidos anteriormente indicados pueden ser el resultado de una mutación natural (mutante o variante) debida a una diferencia individual, una diferencia de especie o similar de una bacteria a partir de la que se deriva el gen.

Además, el gen que presenta dicha mutación conservadora tal como se ha indicado anteriormente puede ser un gen codificante para una proteína que muestra una homología de 80% o superior, preferentemente de 90% o superior, más preferentemente de 95% o superior, todavía más preferentemente de 97% o superior, particularmente preferentemente de 99% o superior, respecto a la secuencia total de aminoácidos de la proteína codificada y que presenta una función equivalente a la de la proteína YciW de tipo salvaje. En la presente memoria, "homología" puede referirse a "identidad".

Además, el gen *yciW* puede ser un ADN que puede hibridarse con una sonda que puede prepararse a partir de una secuencia génica conocida, tal como la secuencia génica anteriormente indicada o una secuencia complementaria a la misma, bajo condiciones restrictivas, y que codifica una proteína que presenta una función equivalente a la de la proteína YciW. Las "condiciones restrictivas" se refieren a condiciones bajo las que se forma un denominado híbrido específico y no se forma un híbrido no específico. Entre los ejemplos de las condiciones restrictivas se incluyen aquellas bajo las que se hibridan ADN altamente homólogos entre sí, por ejemplo ADN con homología no inferior a 80%, preferentemente con homología no inferior a 90%, más preferentemente homología no inferior a 95%, todavía más preferentemente homología no inferior a 97%, particularmente preferentemente homología no inferior a 99%, se hibridan entre sí, y los ADN con menor homología que la indicada anteriormente no se hibridan entre sí, o condiciones de lavado de la hibridación southern típica, es decir, condiciones de lavado una vez, preferentemente 2 o 3 veces, a una concentración salina y a una temperatura correspondientes a 1 x SSC, 0,1% de SDS a 60°C, preferentemente 0,1 x SSC, 0,1% de SDS a 60°C, más preferentemente 0,1 x SSC, 0,1% de SDS a 68°C.

La sonda puede ser una parte de una secuencia complementaria al gen. Dicha sonda puede prepararse mediante PCR utilizando oligonucleótidos preparados basándose en una secuencia génica conocida como cebadores y un fragmento de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos como molde. Por ejemplo, en el caso de que se utilice un fragmento de ADN con una longitud de aproximadamente 300 pb como la sonda, las condiciones de lavado de la hibridación pueden ser, por ejemplo, de 50°C, 2 x SSC y 0,1% de SDS.

La explicación anteriormente indicada de las variantes de los genes y proteínas también se aplican de manera similar a enzimas tales como la serina acetiltransferasa y la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa y la proteína YdeD, así como a los genes codificantes de las mismas.

5 <2> procedimiento para producir L-cisteína, L-cistina, derivado de las mismas, o mezcla de las mismas según la presente invención

10 Mediante el cultivo de la bacteria utilizada en la presente invención obtenida tal como se ha mencionado anteriormente en un medio y recolectando L-cisteína, L-cistina, un derivado de las mismas, o una mezcla de las mismas a partir del medio, pueden producirse dichos compuestos. Entre los ejemplos del derivado de L-cisteína se incluyen S-sulfocisteína, derivados de tiazolidina, hemitiocetales correspondientes a los derivados tiazolidina y similares, tal como se ha mencionado anteriormente. La γ -glutamilcisteína, glutatión, cistationina, homocisteína, metionina, S-adenosilmetionina, y similares, los cuales se biosintetizan a partir de L-cisteína como material de partida, también pueden producirse de una manera similar.

15 Como medio para la utilización, pueden indicarse medios ordinarios que contienen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una fuente de azufre, iones inorgánicos y otros componentes orgánicos según se requieran.

20 Como fuente de carbono, pueden utilizarse sacáridos, tales como glucosa, fructosa, sacarosa, melaza e hidrolizado de almidón, y ácidos orgánicos, tales como ácido fumárico, ácido cítrico y ácido succínico.

25 Como fuente de nitrógeno, pueden utilizarse sales amónicas inorgánicas, tales como sulfato amónico, cloruro amónico y fosfato amónico, nitrógeno orgánico, tal como hidrolizado de soja, gas amonio, amonio acuoso y similares.

30 Como fuente de azufre, pueden indicarse compuestos de azufre inorgánico, tales como sulfatos, sulfitos, sulfuros, hiposulfitos y tiosulfatos.

35 Como nutrientes traza orgánicos, resulta deseable añadir sustancias requeridas, tales como vitamina B1, extracto de levadura y otros en cantidades apropiadas. Además de ellos, se añaden fosfato de potasio, sulfato de magnesio, iones hierro, iones manganeso y similares en cantidades pequeñas, según se requiera.

40 El cultivo se lleva a cabo preferentemente bajo condiciones aeróbicas durante 30 a 90 horas. La temperatura del cultivo preferentemente se controla para que sea de entre 25°C y 37°C, y el pH preferentemente se controla a un valor de entre 5 y 8 durante el cultivo. Para ajustar el pH, pueden utilizarse sustancias ácidas inorgánicas u orgánicas o alcalinas, gas amonio y similares. La recolección de L-cisteína a partir del caldo de cultivo puede llevarse a cabo mediante una combinación de un procedimiento ordinario de resina de intercambio iónico, la precipitación y otros procedimientos conocidos.

45 La L-cisteína obtenida tal como se ha mencionado anteriormente puede utilizarse para la producción de derivados de L-cisteína. Entre los derivados de L-cisteína se incluyen metilcisteína, etilcisteína, carbocisteína, sulfocisteína, acetilcisteína y similares.

50 Además, al acumular en el medio un derivado tiazolidina de la L-cisteína, puede producirse L-cisteína mediante la recolección del derivado tiazolidina a partir del medio y rompiendo el equilibrio de reacción entre el derivado tiazolidina y la L-cisteína de manera que se produce en exceso la L-cisteína.

55 Además, al acumular la S-sulfocisteína en el medio, puede convertirse en L-cisteína mediante reducción utilizando un agente reductor, tal como ditiotreitól.

Ejemplo

En adelante en la presente memoria, la presente invención se explica más específicamente haciendo referencia a un ejemplo.

(1) Construcción de una cepa deficiente en el gen *yciW*

60 La eliminación del gen *yciW* se llevó a cabo mediante el procedimiento denominado "Integración controlada por Red", desarrollado por primera vez por Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):6640-6645, 2000). Según el procedimiento de "Integración controlada por Red", mediante la utilización de un producto de PCR obtenido con oligonucleótidos sintéticos diseñados para que una parte del gen diana se encuentre presente en el extremo 5', y una parte del gen de resistencia a antibiótico se encuentre presente en el extremo 3', respectivamente, como cebadores, puede construirse en una etapa una cepa con disrupción génica. Un procedimiento para eliminar un gen de *E. coli* utilizando dicha "Integración controlada por Red" y el sistema de extracción derivado del fago λ se describe en detalle en la patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-

058227 (solicitud publicada de patente US nº 2006154344), documento nº WO2007/119880A1, y similares. Se obtuvo una cepa deficiente en el gen *yciW* mediante el mismo procedimiento que dichos procedimientos.

Se obtuvo mediante PCR un fragmento de ADN que comprendía secuencias homólogas de los dos extremos del gen *yciW* y un gen de resistencia a antibióticos (gen de resistencia a la canamicina (Km^r)) entre ellas. Los procedimientos y materiales experimentales específicos son los mismos que los indicados en la patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-058227 (solicitud publicada de patente US nº 2006154344) excepto en que se utilizaron como cebadores DyciWec-FW (SEC ID nº 3, ATGGAACAACGCCACATCACCGGCAAAAGCCACTGGTATCATGAAACGCATGAAGCCTGCTTTTTATACTAA GTTGGCA) y DyciWec-RV (SEC ID nº 4, CCCATTGGTTAATTTTCATTTTCGCCCTTGCGCATAAGGGTGCTGATTTTTTCGCTCAAGTTAGTATAAAAAAGCT GAACGA) y un como molde se utilizó un fragmento de ADN que contenía la secuencia λ attL- Km^r - λ attR derivada de pMW118-(λ attL- Km^r - λ attR) (documento nº WO2006/093322A2).

Mediante dicho procedimiento, se obtuvo una cepa deficiente en gen *yciW*, MG1655 Δ *yciW*:: Km^r , a partir de *E. coli* MG1655 (ATCC nº 47076).

Además, el gen Km^r incorporado en la cepa con disrupción del gen *yciW* puede eliminarse mediante la utilización del sistema de extracción derivado del fago λ .

(2) Construcción de bacteria productora de L-cisteína

pACYC-DES, un plásmido individual en el que se había integrado un *cysE* mutante codificante para una serina acetiltransferasa mutante en la que se encontraba reducida la inhibición por retroalimentación por L-cisteína (solicitud publicada de patente US nº 20050112731 (A1)), el gen *ydeD* codificante de un factor de secreción de la L-cisteína (patente US nº 5.972.663) y un gen *serA* mutante codificante de una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa en la que se encontraba reducida la inhibición por retroalimentación por la L-serina (patente US nº 6.180.373), se introdujo en la cepa *E. coli* MG1655 y en las cepas MG1655DyciW:: Km^r . En la serina acetiltransferasa mutante anteriormente indicada, se sustituyó el residuo de treonina en la posición 167 por un residuo de alanina. Además, en la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa anteriormente indicada, el residuo de tirosina en la posición 410 se había eliminado. La construcción de pACYC-DES se describe en la patente japonesa abierta al público (Kokai) nº 2005-137369 (solicitud publicada de patente US nº 20050124049(A1), patente europea abierta al público nº 1528108(A1)).

(3) Cultivo de producción de L-cisteína

Con el fin de investigar el efecto de la eliminación del gen *yciW* sobre la producción de L-cisteína y compuestos relacionados con la L-cisteína mediante fermentación, se cultivaron las bacterias *E. coli* productoras de L-cisteína anteriormente indicadas, MG1655/pACYC-DES y MG1655DyciW:: Km^r /pACYC-DES (deficiente en *yciW*) para la producción mediante fermentación y se compararon las cantidades producidas de L-cisteína y de compuestos relacionados con la L-cisteína. Para el cultivo, se utilizó un medio de producción de cisteína que presentaba la composición siguiente. Como fuente de azufre para la producción de L-cisteína, se utilizó sulfato (sulfato amónico) y tiosulfato (tiosulfato sódico). El cultivo con sólo el sulfato se llevó a cabo sin añadir el componente 6 (tiosulfato sódico) indicado en la composición de medio siguiente. Además, el cultivo con tiosulfato se llevó a cabo mediante la utilización de la totalidad de los componentes de medio siguientes.

[Medio de producción de L-cisteína] (las concentraciones de los componentes son concentraciones finales)

Componentes 1:

(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g/l
KH ₂ PO ₄	1,5 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/l
Hidrocloruro de tiamina	0,1 mg/l

Componentes 2:

FeSO ₄ · 7H ₂ O	1,7 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,15 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,7 mg/l
MnCl · 4H ₂ O	1,6 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,3 mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,25 mg/l

Componentes 3:

Triptona	0,6 g/l
Extracto de levadura	0,3 g/l
NaCl	0,6 g/l

Componente 4:
Carbonato de calcio 20 g/l

Componente 5:
Monohidrato de hidrocloreto de L-histidina 135 mg/l

5 Componente 6:
Tiosulfato sódico 4 g/l

Componente 7:
Hidrocloreto de piridoxina 2 mg/l

10 Componente 8:
Glucosa 40 g/l

15 Para dichos componentes se prepararon soluciones madre de concentración de 10 veces (componentes 1), de concentración de 1.000 veces (componentes 2), de concentración de 100/6 veces (componentes 3), de concentración de 100 veces (componente 5), de concentración de 350/4 veces (componente 6), de concentración de 1.000 veces (componente 7) y de concentración de 10 veces (componente 8), se mezclaron en el momento de utilizarlos y se obtuvo el volumen definido con agua esterilizada para conseguir las concentraciones finales. Se llevó a cabo la esterilización mediante autoclave a 110°C durante 30 minutos (componentes 1, 2, 3, 5 y 8), esterilización con calor seco a 180°C durante 5 horas o más (componente 4) o la esterilización mediante filtración (componentes 6 y 7).

20 El cultivo de producción de L-cisteína se llevó a cabo de la manera siguiente. Cada cepa de producción se extendió sobre el medio de LB-agar para llevar a cabo el precultivo de durante la noche a 37°C y después las células correspondientes a aproximadamente 7 cm sobre la placa se rasparon con un asa de inoculación de 10 µl (NUNC Blue Loop) tres veces (tres asas) y se inocularon en 2 ml del medio de producción de L-cisteína contenido en una probeta grande (diámetro interior: 23 mm, longitud: 20 cm) para igualar sustancialmente la cantidad de células de ambas cepas en el momento de inicio del cultivo. El cultivo se llevó a cabo a 32°C bajo agitación y se terminó tras 25 horas. Se cuantificó la L-cisteína (incluyendo compuestos relacionados con la L-cisteína) producida en el medio mediante el procedimiento descrito por Gaitonde M.K. (Biochem. J. 104(2):627-33, agosto de 1967). El experimento se llevó a cabo por cuadruplicado para cada cepa y las cantidades de L-cisteína producidas (medias) y las desviaciones estándares, y los rendimientos de L-cisteína para la glucosa consumida se muestran en la Tabla 2. En la Tabla 2, cepa de tipo salvaje se refiere a la cepa MG1655/pACYC-DES y la cepa de eliminación de *yciW* se refiere a la cepa MG1655DyciW:Km^r/pACYC-DES. Se reveló que la eliminación del gen *yciW* presentó el efecto de incrementar la acumulación de L-cisteína para ambas fuentes de azufre.

35 [Tabla 2]

Fuente de azufre	Cepa	L-cisteína (g/l)	Rendimiento para el azúcar consumido (%)
Sulfato	Cepa de tipo salvaje	0,5 ± 0,02	1,4 ± 0,07
	Cepa de eliminación de <i>yciW</i>	1,7 ± 0,04	5,0 ± 0,21
Sulfato y tiosulfato	Cepa de tipo salvaje	1,4 ± 0,05	3,9 ± 0,12
	Cepa de eliminación de <i>yciW</i>	1,8 ± 0,37	5,7 ± 1,29

Listado de secuencias

40 <110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Bacteria que produce L-cisteína y procedimiento para la producción de L-cisteína

45 <130> D195-10202

<150> JP2009-272358

<151> 2009-11-30

50 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 646 165 T3

<210> 1
 <211> 1728
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (301) .. (1428)

10 <400> 1

```

agccggtacc ccgattcgcc gtaccggtac tattgaagat gtgggtaact ctgcggcatt      60
cctgtgctcc gatctctctg ccggtatctc cgggtgaagtg gtccacgttg acggcgggttt      120
cagcattgct gcaatgaacg aactcgaact gaaataatcg ttctgttggt aaagatgggc      180
ggcgttctgc cgcccgttat ctctgttata ctttctgat atttgttatc gccgatccgt      240
ctttctcccc ttcccgcctt gcgtcaggat aacgatttcc tttacgacca aggagcgccc      300
atg gaa caa cgc cac atc acc ggc aaa agc cac tgg tat cat gaa acg      348
Met Glu Gln Arg His Ile Thr Gly Lys Ser His Trp Tyr His Glu Thr
1                               5                               10                               15
caa tcc agt act acg gag tat gac gtt ctg cct ctg gtc ccg gaa gcc      396
Gln Ser Ser Thr Thr Glu Tyr Asp Val Leu Pro Leu Val Pro Glu Ala
20                               25                               30
gca aag gtc agc gat ccc ttt cta ctc gac gtg atc ctt gaa aaa gaa      444
Ala Lys Val Ser Asp Pro Phe Leu Leu Asp Val Ile Leu Glu Lys Glu
35                               40                               45
acg ctg gcc ccc ttc ctt tca tgg ctg gac cct gcg cgt gtt ctt gca      492
Thr Leu Ala Pro Phe Leu Ser Trp Leu Asp Pro Ala Arg Val Leu Ala
50                               55                               60
gtg gat ttg ttc cct gac cag ctt acc gtg acc cgt tca cag acc ttc      540
Val Asp Leu Phe Pro Asp Gln Leu Thr Val Thr Arg Ser Gln Thr Phe
65                               70                               75                               80
acc gct tat gaa cgc ttg tgc acg gcc ctg acg gtt gct cag gtt tgc      588
Thr Ala Tyr Glu Arg Leu Ser Thr Ala Leu Thr Val Ala Gln Val Cys
85                               90                               95
ggc gtc cag cgg tta tgt aac tac tat tgc gcg cga ctt acg ccg ctc      636
Gly Val Gln Arg Leu Cys Asn Tyr Tyr Ser Ala Arg Leu Thr Pro Leu
100                              105                              110
ccc ggg cct gat tcc acc agg gaa agt aat cat cgg ttg gca caa atc      684
Pro Gly Pro Asp Ser Thr Arg Glu Ser Asn His Arg Leu Ala Gln Ile
115                              120                              125
acg caa tat gcc cgc caa ctg gct agc tgc cct tct att atc gac aac      732
Thr Gln Tyr Ala Arg Gln Leu Ala Ser Ser Pro Ser Ile Ile Asp Asn
130                              135                              140
cga tgc cgc cag cat ctg aat gac gtc ggt ctt act gcc tgg gac tgt      780
Arg Ser Arg Gln His Leu Asn Asp Val Gly Leu Thr Ala Trp Asp Cys
145                              150                              155                              160
gtg atc att agc caa atc att ggt ttt att ggc ttt cag gcg cgg aca      828
Val Ile Ile Ser Gln Ile Ile Gly Phe Ile Gly Phe Gln Ala Arg Thr
165                              170                              175
    
```

ES 2 646 165 T3

```

att gcg aca ttt cag gct tat ctc ggg cat ccg gta cgc tgg tta ccc      876
Ile Ala Thr Phe Gln Ala Tyr Leu Gly His Pro Val Arg Trp Leu Pro
      180      185      190
ggg ctg gag ata caa aac tac gcc gac gcg tca ctg ttt gct gat gaa      924
Gly Leu Glu Ile Gln Asn Tyr Ala Asp Ala Ser Leu Phe Ala Asp Glu
      195      200      205
tca tta cgc tgg cga agc agc tat gag gtg gaa aaa cta cct gaa gag      972
Ser Leu Arg Trp Arg Ser Ser Tyr Glu Val Glu Lys Leu Pro Glu Glu
      210      215      220
cac aca aaa agt tca act gca gaa ctt tgc caa ctg gcc gaa ata ctc      1020
His Thr Lys Ser Ser Thr Ala Glu Leu Cys Gln Leu Ala Glu Ile Leu
      225      230      235      240
tct ctc cac cct att tca ctt tcc ctt ctc gaa aag ttg tta aac agc      1068
Ser Leu His Pro Ile Ser Leu Ser Leu Glu Lys Leu Leu Asn Ser
      245      250      255
aca cgg ggc aat aca cag ccg gat aat cag ctt gcg gcg ttg tta tgc      1116
Thr Arg Gly Asn Thr Gln Pro Asp Asn Gln Leu Ala Ala Leu Leu Cys
      260      265      270
gcg cgt ata aat ggc agt cct gct tgt ttt gcc acc tgt atg gat tca      1164
Ala Arg Ile Asn Gly Ser Pro Ala Cys Phe Ala Thr Cys Met Asp Ser
      275      280      285
tca aat gaa tat aaa aaa atc agc acc ctt atg cgc aag ggc gaa aat      1212
Ser Asn Glu Tyr Lys Lys Ile Ser Thr Leu Met Arg Lys Gly Glu Asn
      290      295      300
gaa att aac caa tgg gct gac cgt cat tct gtt gag cgc gct acc gtt      1260
Glu Ile Asn Gln Trp Ala Asp Arg His Ser Val Glu Arg Ala Thr Val
      305      310      315      320
cag gcg ata caa tgg ctg acc cga gca ccc gat cgc ttt agc gcc gcc      1308
Gln Ala Ile Gln Trp Leu Thr Arg Ala Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ala
      325      330      335
cag ttc agc cct tta ctc gaa cac gaa aaa tca tca acg cag att att      1356
Gln Phe Ser Pro Leu Leu Glu His Glu Lys Ser Ser Thr Gln Ile Ile
      340      345      350
aat ctg ctg gta tgg agc ggg ctg tgt ggc tgg ata aat cgc tta aaa      1404
Asn Leu Leu Val Trp Ser Gly Leu Cys Gly Trp Ile Asn Arg Leu Lys
      355      360      365
atc gcg ttg ggt gag aca tat taa ccttgccgcg tcagacagat tcgcgtaaaa      1458
Ile Ala Leu Gly Glu Thr Tyr
      370      375
ctgtcagccg ctctaattggc caccaaaata gacaattatg tttcaggaca acccgctgct      1518
agcgcagctt aaacagcaac tgcattccca gacgccacgc gctgaagggg tggtaaaagc      1578
cacagaaaaa ggctttggct tcctggaagt cgacgcgcaa aaaagttatt tcattccgcc      1638
gccgcagatg aaaaaagtca tgcatggcga ccgaattatc gcggtgatcc acagtgaaaa      1698
agaacgtgaa tccgcagagc cagaagaact      1728

```

<210> 2
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 2

```

Met Glu Gln Arg His Ile Thr Gly Lys Ser His Trp Tyr His Glu Thr
1      5      10      15
Gln Ser Ser Thr Thr Glu Tyr Asp Val Leu Pro Leu Val Pro Glu Ala
      20      25      30
Ala Lys Val Ser Asp Pro Phe Leu Leu Asp Val Ile Leu Glu Lys Glu
      35      40      45
Thr Leu Ala Pro Phe Leu Ser Trp Leu Asp Pro Ala Arg Val Leu Ala
      50      55      60
Val Asp Leu Phe Pro Asp Gln Leu Thr Val Thr Arg Ser Gln Thr Phe
      65      70      75      80
Thr Ala Tyr Glu Arg Leu Ser Thr Ala Leu Thr Val Ala Gln Val Cys
      85      90      95
Gly Val Gln Arg Leu Cys Asn Tyr Tyr Ser Ala Arg Leu Thr Pro Leu

```

10

ES 2 646 165 T3

			100						105				110			
Pro	Gly	Pro	Asp	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Asn	His	Arg	Leu	Ala	Gln	Ile	
			115				120					125				
Thr	Gln	Tyr	Ala	Arg	Gln	Leu	Ala	Ser	Ser	Pro	Ser	Ile	Ile	Asp	Asn	
			130				135				140					
Arg	Ser	Arg	Gln	His	Leu	Asn	Asp	Val	Gly	Leu	Thr	Ala	Trp	Asp	Cys	
145					150					155					160	
Val	Ile	Ile	Ser	Gln	Ile	Ile	Gly	Phe	Ile	Gly	Phe	Gln	Ala	Arg	Thr	
				165						170					175	
Ile	Ala	Thr	Phe	Gln	Ala	Tyr	Leu	Gly	His	Pro	Val	Arg	Trp	Leu	Pro	
			180					185					190			
Gly	Leu	Glu	Ile	Gln	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ala	Ser	Leu	Phe	Ala	Asp	Glu	
		195					200					205				
Ser	Leu	Arg	Trp	Arg	Ser	Ser	Tyr	Glu	Val	Glu	Lys	Leu	Pro	Glu	Glu	
		210				215					220					
His	Thr	Lys	Ser	Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	Cys	Gln	Leu	Ala	Glu	Ile	Leu	
225					230					235					240	
Ser	Leu	His	Pro	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Asn	Ser	
				245						250				255		
Thr	Arg	Gly	Asn	Thr	Gln	Pro	Asp	Asn	Gln	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	
			260					265					270			
Ala	Arg	Ile	Asn	Gly	Ser	Pro	Ala	Cys	Phe	Ala	Thr	Cys	Met	Asp	Ser	
		275					280					285				
Ser	Asn	Glu	Tyr	Lys	Lys	Ile	Ser	Thr	Leu	Met	Arg	Lys	Gly	Glu	Asn	
		290				295					300					
Glu	Ile	Asn	Gln	Trp	Ala	Asp	Arg	His	Ser	Val	Glu	Arg	Ala	Thr	Val	
305					310					315					320	
Gln	Ala	Ile	Gln	Trp	Leu	Thr	Arg	Ala	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Ala	Ala	
				325					330					335		
Gln	Phe	Ser	Pro	Leu	Leu	Glu	His	Glu	Lys	Ser	Ser	Thr	Gln	Ile	Ile	
			340					345					350			
Asn	Leu	Leu	Val	Trp	Ser	Gly	Leu	Cys	Gly	Trp	Ile	Asn	Arg	Leu	Lys	
		355					360					365				
Ile	Ala	Leu	Gly	Glu	Thr	Tyr										
		370				375										

<210> 3
 <211> 80
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador DyciWec-FW

<400> 3

```
atggaacaac gccacatcac cggcaaaagc cactggtatc atgaaacgca tgaagcctgc 60
tttttatac taagttggca 80
```

<210> 4
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador DyciWec-RV

<400> 4

```
cccattgggt aatttcattt tgcgccttgc gcataagggt gctgattttt cgctcaagtt 60
agtataaaaa agctgaacga 80
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para producir L-cisteína, L-cistina, un derivado de las mismas, o una mezcla de las mismas, que comprende cultivar una bacteria *Escherichia* en un medio y recoger L-cisteína, L-cistina, un derivado de las mismas, o una mezcla de las mismas a partir del medio, en el que la bacteria presenta una capacidad de producción de L-cisteína y es modificada de manera que es reducida la actividad de una proteína codificada por el gen *yciW* reduciendo la cantidad de expresión del gen *yciW* o mediante la disrupción del gen.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la proteína es una proteína definida en los (A) o (B) siguientes:
- (A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 2,
- 15 (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 2, pero que incluye una sustitución, eliminación, inserción o adición de uno o varios residuos aminoácidos, la reducción de la actividad de la cual en la bacteria da como resultado la mejora en la capacidad de producción de L-cisteína.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el gen *yciW* es un ADN definido en los (a) o (b) siguientes:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de las posiciones 301 a 1.428 en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 1,
- 25 (b) un ADN hibridable con una secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos de las posiciones 301 a 1.428 en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 1 o con una sonda que puede prepararse a partir de dicha secuencia complementaria, bajo condiciones restrictivas que comprenden lavar a una concentración de sal y temperatura correspondientes a 1 x SSC, 0,1% de SDS a 60°C y codificar una proteína, cuya reducción de actividad en una bacteria da como resultado la mejora de la capacidad de producción de L-
- 30 cisteína.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la bacteria comprende además por lo menos una de las características siguientes:
- 35 i) es modificada de manera que la actividad de la serina acetiltransferasa es aumentada,
ii) es modificada de manera que la expresión del gen *ydeD* es aumentada,
iii) es modificada de manera que la actividad de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa es aumentada.
- 40 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la bacteria es la *Escherichia coli*.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el derivado de la L-cisteína es un derivado de tiazolidina.