

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 011**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2014 PCT/JP2014/077993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15060314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2014 E 14835548 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2886651**

54 Título: **Método para producir L-aminoácido**

30 Prioridad:

21.10.2013 JP 2013218221

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

17.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TOYAZAKI, MIKU;
NOGUCHI, KEIKO;
MORIYA, MIKA y
UEHARA, YURI**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 694 011 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

Método para producir L-aminoácido

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir un L-aminoácido usando una bacteria. Los L-aminoácidos son útiles de manera industrial como aditivos para piensos, ingredientes de condimentos, alimentos y bebidas, infusiones de aminoácidos, y así sucesivamente.

10

Técnica anterior

Los L-aminoácidos se producen industrialmente, por ejemplo, mediante fermentación usando diversos microorganismos que tienen una capacidad de producción de L-aminoácidos. Los ejemplos de métodos para producir un L-aminoácido mediante fermentación incluyen, por ejemplo, métodos de uso de un microorganismo de tipo natural (cepa de tipo natural), métodos de uso de una cepa auxotrófica derivada de una cepa de tipo natural, métodos de uso de una cepa mutante de regulación metabólica derivada como una cepa mutante resistente a cualquiera de los diversos fármacos de una cepa de tipo natural, y métodos de uso de una cepa que tiene características como una cepa auxotrófica y como cepa mutante de regulación metabólica.

20

Además, en los últimos años, se usan microorganismos de los cuales se mejora una capacidad de producción de L-aminoácidos mediante técnicas de ADN recombinante para la producción de L-aminoácidos. Los ejemplos de métodos para mejorar una capacidad de producción de L-aminoácidos de un microorganismo incluyen, por ejemplo, potenciar la expresión de un gen que codifica una enzima biosintética de L-aminoácido (documentos de patente 1 y 2), y potenciar la entrada de una fuente de carbono en un sistema de biosíntesis de L-aminoácido (documento de patente 3).

25

El documento US 2009/286290 describe la producción de un L-aminoácido mediante un microorganismo que se ha modificado de modo que se disminuyen la actividad de succinato deshidrogenasa y la actividad de alfa-cetoglutarato deshidrogenasa.

30

El documento US 2010/209977 describe la producción de un L-aminoácido mediante una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, que se ha modificado para tener una mutación específica en el gen *yeaS*.

35

El documento WO 2012/002486 describe un método para producir un L-aminoácido a partir de etanol como material de partida usando una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* modificada de modo que se reduce la actividad de la proteína Aldb, preferiblemente una bacteria modificada adicionalmente de modo que se potencia la actividad de la proteína AdhE.

40

El documento WO 2009/031564 describe la producción de un L-aminoácido mediante una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacter*, que se ha modificado para suprimir la expresión de uno o más genes seleccionados de entre *ydcU*, *yfeK*, *smpA*, *htrG*, *adiC*, *htrA*, *ydhK*, *bacA*, *yaiW* y *yidQ*.

45

El documento WO 2011/152565 describe un método para producir L-aminoácidos usando una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, que se ha modificado para atenuar la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en los genes *pepA*, *pepB* y *pepD*.

50

El gen *acpP* es un gen que codifica la proteína portadora de acilo (ACP) (documento no de patente 1). ACP se traduce como apo-ACP inactiva, entonces se añade 4'-fosfopanteteína como cofactor al residuo de serina de la posición 36 (en el caso de *Escherichia coli*) de apo-ACP mediante ACP sintasa, y apo-ACP se convierte de ese modo en holo-ACP activa. ACP es una proteína que desempeña un papel importante en las biosíntesis de ácidos grasos de bacterias, y así sucesivamente. Específicamente, en la biosíntesis de ácidos grasos, ACP (holo-ACP) se une a una cadena de ácido graso por medio del grupo 4'-fosfopanteteína, para portar de ese modo la cadena de ácido graso.

55

El gen *fabF* es un gen que codifica β -cetoacil-ACP sintasa II (documento no de patente 1). El β -cetoacil-ACP sintasa II es una de las enzimas de biosíntesis de ácidos grasos, y participa en la extensión de la cadena de ácido graso. Específicamente, la β -cetoacil-ACP sintasa II cataliza la reacción que genera una 3-oxoacil-ACP (número de carbono = $n + 2$) de una acil-ACP (número de carbono = n) y malonil-ACP (EC 2.3.1.41).

60

En *Escherichia coli*, los genes que participan en la biosíntesis de ácido graso, incluyendo el gen *acpP* y el gen *fabF*, existen como la agrupación génica *yceD-rpmF-plsX-fabHDG-acpP-fabF*. Los genes de esta agrupación génica se transcriben conjuntamente como varios pares de genes (documento no de patente 1). Por ejemplo, el gen *acpP* y el gen *fabF* se transcriben conjuntamente como el operón *acpP-fabF*. Además, el gen *fabF* también se transcribe independientemente con su propio promotor. Además, el gen *acpP* también puede transcribirse conjuntamente a partir del gen *fabD* y el gen *fabG* en la agrupación génica *yceD-rpmF-plsX-fabHDG-acpP-fabF*.

65

Sin embargo, no se ha conocido la relación entre los genes *acpP* y *fabF*, y la producción de L-aminoácido.

Referencias de la técnica anterior

5

Documentos de patente

Documento de patente 1: patente estadounidense n.º 5.168.056

10 Documento de patente 2: patente estadounidense n.º 5.776.736

Documento de patente 3: patente estadounidense n.º 5.906.925

Documento no de patente

15

Documento no de patente 1: Zhang Y, Cronan JE Jr., J Bacteriol., junio de 1996; 178(12):3614-20

Sumario de la invención

20

Objeto que va a lograrse mediante la invención

Un objeto de la presente invención es desarrollar una técnica nueva para mejorar una capacidad de producción de L-aminoácido de una bacteria, y proporcionar de ese modo un método para producir de manera eficaz un L-aminoácido.

25

Medios para lograr el objeto

El inventor de la presente invención llevó a cabo diversas investigaciones con el fin de lograr el objeto mencionado anteriormente. Como resultado, el inventor encontró que una capacidad de producción de L-aminoácido de una bacteria puede mejorarse modificando la bacteria de modo que se reduce la expresión de los genes *acpP* y *fabF*, y logró la presente invención.

30

Es decir, la presente invención puede realizarse, por ejemplo, tal como sigue.

35

[1] Un método para producir un L-aminoácido que comprende:

cultivar una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido en un medio para producir y acumular un L-aminoácido en el medio o células de la bacteria; y

40

recoger el L-aminoácido del medio o las células,

en el que la bacteria se ha modificado de modo que el operón *acpP-fabF* se atenúa en comparación con una cepa no modificada,

45

en el que el operón *acpP-fabF* se atenúa atenuando la expresión de un gen del operón *acpP-fabF*,

en el que la expresión del gen del operón *acpP-fabF* se atenúa modificando una secuencia de control de la expresión del gen.

50

[2] El método según [1], en el que el gen del operón *acpP-fabF* consiste en el gen *acpP* y/o el gen *fabF*.

[3] El método según [2], en el que el gen del operón *acpP-fabF* consiste en el gen *acpP* y el gen *fabF*.

55

[4] El método según uno cualquiera de [2] a [3], en el que la expresión del gen del operón *acpP-fabF* se atenúa reemplazando la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* por otra base,

en el que la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* es una posición correspondiente a la posición 177 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7.

60

[5] El método según [4], en el que la expresión del gen del operón *acpP-fabF* se atenúa reemplazando la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* por adenina.

65

[6] El método según uno cualquiera de [1] a [5], en el que la bacteria es una bacteria que pertenece a los géneros *Escherichia*, *Pantoea* o *Enterobacter*.

[7] El método según [6], en el que la bacteria es *Escherichia coli*.

[8] El método según uno cualquiera de [1] a [7], en el que la cepa no modificada es la cepa *Escherichia coli* MG1655.

5 [9] El método según uno cualquiera de [1] a [8], en el que la cepa no modificada tiene la secuencia de nucleótidos del operón *acpP-fabF*, que incluye en dirección 5' 210 pb del mismo, mostrada como SEQ ID NO: 7.

[10] El método según uno cualquiera de [1] a [9], en el que el L-aminoácido es L-lisina.

10 [11] El método según uno cualquiera de [1] a [10], en el que la cantidad de expresión del gen *acpP* no se reduce hasta el 0 %.

[12] Un método para producir L-lisina que comprende:

15 cultivar *Escherichia coli* que tiene capacidad de producción de L-lisina en un medio para producir y acumular L-lisina en el medio o células de la *Escherichia coli*; y

recoger L-lisina del medio o las células,

20 en el que la expresión de un gen del operón *acpP-fabF* se ha atenuado en la *Escherichia coli* en comparación con una cepa no modificada modificando una secuencia de control de la expresión del gen.

[13] El método según [12], en el que la cepa no modificada es la cepa *Escherichia coli* MG1655.

25 [14] El método según [12] o [13], en el que la cepa no modificada tiene la secuencia de nucleótidos del operón *acpP-fabF*, que incluye en dirección 5' 210 pb del mismo, mostrada como SEQ ID NO: 7.

[15] El método según uno cualquiera de [12] a [14], en el que la cantidad de expresión del gen *acpP* no se reduce hasta el 0 %.

30 [16] Un método para producir L-lisina que comprende:

cultivar *Escherichia coli* que tiene capacidad de producción de L-lisina en un medio para producir y acumular L-lisina en el medio o células de la *Escherichia coli*; y

35 recoger L-lisina del medio o las células,

en el que la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* se ha reemplazado por otra base en la *Escherichia coli*,

40 en el que la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* es una posición correspondiente a la posición 177 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7.

45 [17] El método para producir L-lisina según [16], en el que la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* se ha reemplazado por adenina en la *Escherichia coli*.

Modos para llevar a cabo la invención

En adelante, la presente invención se explicará en detalle.

50 El método de la presente invención es un método para producir un L-aminoácido que comprende cultivar una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido en un medio para producir y acumular un L-aminoácido en el medio o células de la bacteria, y recoger el L-aminoácido del medio o las células, en el que la bacteria se ha modificado de modo que el operón *acpP-fabF* se atenúa tal como se define en las reivindicaciones. La bacteria usada para este método se denomina también "la bacteria de la presente divulgación".

<1> Bacteria de la presente divulgación

60 La bacteria de la presente divulgación es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido, que se ha modificado de modo que el operón *acpP-fabF* se atenúa.

<1-1> Bacteria que tiene capacidad de producción de L-aminoácido

65 En la presente invención, una "bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido" se refiere a una bacteria que tiene una capacidad para producir y acumular un L-aminoácido objetivo en un medio o células de la

bacteria en tal medida que el L-aminoácido puede recogerse, cuando la bacteria se cultiva en el medio. La bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido puede ser una bacteria que puede acumular un L-aminoácido objetivo en un medio en una cantidad mayor que la que puede obtenerse con una cepa no modificada. Los ejemplos de la cepa no modificada incluyen cepas de tipo natural y cepas progenitoras. La bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido puede ser una bacteria que puede acumular un L-aminoácido objetivo en un medio en una cantidad de preferiblemente 0,5 g/l o más, más preferiblemente 1,0 g/l o más.

Los ejemplos del L-aminoácido incluyen aminoácidos básicos tales como L-lisina, L-ornitina, L-arginina, L-histidina y L-citrulina; aminoácidos alifáticos tales como L-isoleucina, L-alanina, L-valina, L-leucina y glicina; aminoácidos que son ácidos hidroximonoaminocarboxílicos tales como L-treonina y L-serina; aminoácidos cíclicos tales como L-prolina; aminoácidos aromáticos tales como L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano; aminoácidos que contienen azufre tales como L-cisteína, L-cistina y L-metionina; aminoácidos ácidos tales como ácido L-glutámico y ácido L-aspártico; y aminoácidos que tienen un grupo amida en la cadena lateral tales como L-glutamina y L-asparagina. La bacteria de la presente divulgación puede tener una capacidad para producir un solo tipo de L-aminoácido, o dos o más tipos de L-aminoácidos.

En la presente invención, el término "aminoácido" puede referirse a un L-aminoácido a menos que se declare lo contrario. Además, el L-aminoácido que va a producirse puede ser un compuesto libre, una sal del mismo, o una mezcla de los mismos. Es decir, en la presente invención, el término "L-aminoácido" puede referirse a un L-aminoácido en una forma libre, una sal del mismo, o una mezcla de ellos a menos que se declare lo contrario. Los ejemplos de la sal se describirán a continuación.

Los ejemplos de bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* incluyen bacterias que pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Photobacterium*, *Providencia*, *Salmonella*, *Morganella*, o similares. Específicamente, pueden usarse las bacterias clasificadas en la familia *Enterobacteriaceae* según la taxonomía usada en la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>).

Las bacterias de *Escherichia* no están particularmente limitadas, y los ejemplos de las mismas incluyen las clasificadas en el género *Escherichia* según la taxonomía conocida por los expertos en el campo de la microbiología. Los ejemplos de las bacterias de *Escherichia* incluyen, por ejemplo, las descritas en el trabajo de Neidhardt *et al.* (Backmann B.J., 1996, Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, págs. 2460-2488, tabla 1, en F.D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology, segunda edición, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.). Los ejemplos de la bacteria de *Escherichia* incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*. Los ejemplos específicos de *Escherichia coli* incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325) y *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076) derivadas de la cepa prototipo de tipo natural, cepa K-12.

Las bacterias de *Enterobacter* no están particularmente limitadas, y los ejemplos de las mismas incluyen las clasificadas en el género *Enterobacter* según una clasificación conocida para un experto en la técnica de la microbiología. Los ejemplos de las bacterias de *Enterobacter* incluyen, por ejemplo, *Enterobacter agglomerans* y *Enterobacter aerogenes*. Los ejemplos específicos de *Enterobacter agglomerans* incluyen, por ejemplo, la cepa *Enterobacter agglomerans* ATCC 12287. Los ejemplos específicos de *Enterobacter aerogenes* incluyen, por ejemplo, la cepa *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, cepa NBRC 12010 (Biotechnol Bioeng., 2007, Mar. 27; 98(2):340-348), y cepa AJ110637 (FERM ABP-10955). Los ejemplos de la bacteria de *Enterobacter* también incluyen, por ejemplo, las cepas descritas en la solicitud de patente europea abierta a consulta por el público (EP-A) n.º 0952221. Además, *Enterobacter agglomerans* también incluye algunas cepas clasificadas como *Pantoea agglomerans*.

Las bacterias de *Pantoea* no están particularmente limitadas, y los ejemplos de las mismas incluyen las clasificadas en el género *Pantoea* según una clasificación conocida para un experto en la técnica de la microbiología. Los ejemplos de las bacterias de *Pantoea* incluyen, por ejemplo, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans* y *Pantoea citrea*. Los ejemplos específicos de *Pantoea ananatis* incluyen, por ejemplo, la cepa *Pantoea ananatis* LMG20103, cepa AJ13355 (FERM BP-6614), cepa AJ13356 (FERM BP-6615), cepa AJ13601 (FERM BP-7207), cepa SC17 (FERM BP-11091), y cepa SC17(0) (VKPM B-9246). Algunas cepas de *Enterobacter agglomerans* se reclasificaron recientemente en *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* o *Pantoea stewartii* basándose en el análisis de la secuencia de nucleótidos de ARNr 16S etc. (Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 162-173 (1993)). En la presente invención, las bacterias de *Pantoea* incluyen las reclasificadas en el género *Pantoea* tal como se describió anteriormente.

Los ejemplos de las bacterias de *Erwinia* incluyen *Erwinia amylovora* y *Erwinia carotovora*. Los ejemplos de las bacterias de *Klebsiella* incluyen *Klebsiella planticola*.

Estas cepas están disponibles de, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo (dirección: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, apartado de correos 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos de América). Es decir, se dan números de registro a las cepas respectivas, y las cepas pueden ordenarse usando estos números de

registro (remítase a <http://www.atcc.org/>). Los números de registro de las cepas se enumeran en el catálogo de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

La bacteria de la presente divulgación puede ser una bacteria que tiene inherentemente una capacidad de producción de L-aminoácido, o puede ser una bacteria modificada de modo que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido. La bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido puede obtenerse impartiendo una capacidad de producción de L-aminoácido a una bacteria de este tipo tal como se mencionó anteriormente, o potenciando una capacidad de producción de L-aminoácido de una bacteria de este tipo tal como se mencionó anteriormente.

Para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácido, pueden usarse métodos empleados convencionalmente en la mejora genética de cepas productoras de aminoácidos de bacterias corineformes, bacterias de *Escherichia*, y así sucesivamente (véase "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1.^a edición, publicado el 30 de mayo de 1986, págs.77-100). Los ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, adquirir una cepa mutante auxotrófica, adquirir una cepa resistente a análogos de L-aminoácidos, adquirir una cepa mutante de regulación metabólica, y construir una cepa recombinante en la que la actividad de una enzima biosintética de L-aminoácido se potencia. En la mejora genética de bacterias productoras de L-aminoácidos, una de las propiedades descritas anteriormente tales como auxotrofia, resistencia a análogos y mutación de regulación metabólica puede impartirse sola, o pueden impartirse dos o tres o más de tales propiedades en combinación. Además, en la mejora genética de bacterias productoras de L-aminoácido, la actividad de una de las enzimas biosintéticas de L-aminoácido puede potenciarse sola, o las actividades de dos o tres o más de tales enzimas pueden potenciarse en combinación. Además, impartir propiedad(es) tal(es) como auxotrofia, resistencia a análogos y mutación de regulación metabólica puede combinarse con potenciar la(s) actividad(es) de la(s) enzima(s) biosintética(s).

Puede obtenerse una cepa mutante auxotrófica, cepa resistente a análogos de L-aminoácido, o cepa mutante de regulación metabólica que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido sometiendo una cepa progenitora o cepa de tipo natural a un tratamiento de mutagénesis habitual, y después seleccionando una cepa que presenta autotrofia, resistencia a análogos, o una mutación de regulación metabólica, y que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido a partir de las cepas mutantes obtenidas. Los ejemplos del tratamiento de mutagénesis habitual incluyen irradiación de rayos X o ultravioleta y un tratamiento con un agente de mutación tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), metanosulfonato de etilo (EMS) y metanosulfonato de metilo (MMS).

También puede impartirse o potenciarse una capacidad de producción de L-aminoácido potenciando la actividad de una enzima implicada en la biosíntesis de un L-aminoácido objetivo. Puede potenciarse una actividad enzimática, por ejemplo, modificando una bacteria de modo que la expresión de un gen que codifica la enzima se potencia. Los métodos para potenciar la expresión génica se describen en los documentos WO00/18935, EP 1010755 A, y así sucesivamente. Los procedimientos detallados para potenciar la actividad enzimática se describirán a continuación.

Además, también puede impartirse o potenciarse una capacidad de producción de L-aminoácido reduciendo la actividad de una enzima que cataliza una reacción que se ramifica de la ruta biosintética de un L-aminoácido objetivo para generar un compuesto distinto del L-aminoácido objetivo. La "enzima que cataliza una reacción que se ramifica de la ruta biosintética de un L-aminoácido objetivo para generar un compuesto distinto del L-aminoácido objetivo" a la que se hace referencia en este documento incluye una enzima implicada en la descomposición del aminoácido objetivo. El método para reducir una actividad enzimática se describirá a continuación.

A continuación, las bacterias productoras de L-aminoácidos y métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácidos se ejemplificarán específicamente. Todas las propiedades de las bacterias productoras de L-aminoácidos y modificaciones para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácidos pueden usarse independientemente o en cualquier combinación apropiada.

<Bacterias productoras de ácido L-glutámico>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de ácido L-glutámico incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de ácido L-glutámico. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, glutamato deshidrogenasa (*gdhA*), glutamina sintetasa (*glnA*), glutamato sintetasa (*gltBD*), isocitrato deshidrogenasa (*icdA*), aconitato hidratasa (*acnA*, *acnB*), citrato sintasa (*gltA*), metilcitrato sintasa (*prpC*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), piruvato carboxilasa (*pyc*), piruvato deshidrogenasa (*aceEF*, *lpdA*), piruvato cinasa (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintasa (*ppsA*), enolasa (*eno*), fosfogliceromutasa (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato cinasa (*pgk*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapA*), triosa fosfato isomerasa (*tpiA*), fructosa bisfosfato aldolasa (*fbp*), fosfofructocinasa (*pfkA*, *pfkB*), glucosa fosfato isomerasa (*pgi*), 6-fosfogluconato deshidratasa (*edd*), 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (*eda*) y transhidrogenasa. Mostrados en los paréntesis tras los nombres de las enzimas están los nombres de los genes que codifican las enzimas (lo mismo se aplicará a los mismos casos a continuación). Es preferible potenciar la actividad o actividades de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de, por ejemplo, glutamato

deshidrogenasa, citrato sintasa, fosfoenol piruvato carboxilasa y metilcitrato sintasa, entre estas enzimas.

Los ejemplos de cepas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y modificadas de modo que se aumenta la expresión del gen de citrato sintasa, gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o gen de glutamato deshidrogenasa incluyen las divulgadas en los documentos EP 1078989 A, EP 955368 A y EP 952221 A. Además, los ejemplos de cepas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y modificadas de modo que se aumenta la expresión de un gen de la ruta de Entner-Doudoroff (*edd*, *eda*) incluyen los divulgados en el documento EP 1352966 B.

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de ácido L-glutámico también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades reducidas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas que catalizan una reacción que se ramifica de la ruta de biosíntesis de L-glutamina para generar un compuesto distinto de ácido L-glutámico. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, isocitrato liasa (*aceA*), α -cetoglutarato deshidrogenasa (*sucA*), fosfotransacetilasa (*pta*), acetato cinasa (*ack*), ácido acetohidroxi sintasa (*ilvG*), acetolactato sintasa (*ilvI*), formiato acetiltransferasa (*pfl*), lactato deshidrogenasa (*ldh*), alcohol deshidrogenasa (*adh*), glutamato descarboxilasa (*gadAB*), succinato deshidrogenasa (*sdhABCD*) y 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (*putA*). Es preferible reducir o eliminar, por ejemplo, la actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa, entre estas enzimas.

Se describen bacterias de *Escherichia* que tienen una actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa reducida o deficiente en la actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa, y métodos para obtenerlas en las patentes estadounidenses n.º 5.378.616 y 5.573.945. Además, se divulgan métodos para reducir o eliminar la actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa de bacterias de *Enterobacteriaceae* tales como bacterias de *Pantoea*, bacterias de *Enterobacter*, bacterias de *Klebsiella* y bacterias de *Erwinia* en las patentes estadounidenses n.º 6.197.559, 6.682.912, 6.331.419, 8.129.151 y el documento WO2008/075483. Los ejemplos específicos de bacterias de *Escherichia* que tienen una actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa reducida o deficientes en la actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa incluyen las siguientes cepas.

E. coli W3110*sucA*::Km^r

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

E. coli W3110*sucA*::Km^r es una cepa obtenida alterando el gen *sucA* que codifica α -cetoglutarato deshidrogenasa de *E. coli* W3110. Esta cepa es completamente deficiente en la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa.

Los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen bacterias de *Pantoea*, tales como la cepa *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614), cepa *Pantoea ananatis* SC17 (FERM BP-11091) y cepa *Pantoea ananatis* SC17(0) (VKPM B-9246). La cepa AJ13355 es una cepa aislada de tierra en Iwatashi, Shizuoka-ken, Japón como una cepa que puede proliferar en un medio de pH bajo que contiene ácido L-glutámico y una fuente de carbono. La cepa SC17 es una cepa seleccionada como una cepa mutante poco productora de flema de la cepa AJ13355 (patente estadounidense n.º 6.596.517). Se depositó la cepa SC17 ante la agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Depositario del Organismo Internacional de Patentes (actualmente agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario del Organismo Internacional de Patentes, n.º 120, 2-5-8 Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 4 de febrero de 2009, y se le asignó el número de registro de FERM BP-11091. Se depositó la cepa AJ13355 ante el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (actualmente, agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario del Organismo Internacional de Patentes, n.º 120, 2-5-8 Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 19 de febrero de 1998 y se le asignó el número de registro de FERM P-16644. Entonces, se convirtió el depósito en un depósito internacional con arreglo a lo dispuesto en el Tratado de Budapest el 11 de enero de 1999, y se le asignó el número de registro de FERM BP-6614.

Además, los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen bacterias de *Pantoea* que tienen una actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa reducida o deficiente en la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa. Los ejemplos de tales cepas incluyen la cepa AJ13356 (patente estadounidense n.º 6.331.419), que es una cepa deficiente en el gen de la subunidad E1 de α -cetoglutarato deshidrogenasa (*sucA*) de la AJ13355, y la cepa SC17*sucA* (patente estadounidense n.º 6.596.517), que es una cepa deficiente en el gen *sucA* de la cepa SC17. Se depositó la cepa AJ13356 ante el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (actualmente, agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario del Organismo Internacional de Patentes, n.º 120, 2-5-8 Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 19 de febrero de 1998, y se le asignó el número de registro de FERM P-16645. Entonces, se convirtió el depósito en un depósito internacional con arreglo a

lo dispuesto en el Tratado de Budapest el 11 de enero de 1999, y se le asignó el número de registro de FERM BP-6616. A la cepa SC17sucA se le asignó un número privado de AJ417, y se depositó ante la agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Depositario del Organismo Internacional de Patentes (actualmente, agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario del Organismo Internacional de Patentes, n.º 120, 2-5-8 Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 26 de febrero de 2004, con el número de registro de FERM BP-8646.

Se identificó la cepa AJ13355 como *Enterobacter agglomerans* cuando se aisló, pero se reclasificó recientemente como *Pantoea ananatis* basándose en la secuenciación de nucleótidos de ARNr 16S y así sucesivamente. Por tanto, aunque las cepas AJ13355 y AJ13356 se depositan ante el depositario mencionado anteriormente como *Enterobacter agglomerans*, se denominan *Pantoea ananatis* en esta memoria descriptiva.

Además, los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen bacterias de *Pantoea* tales como la cepa *Pantoea ananatis* SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB, cepa *Pantoea ananatis* AJ13601, cepa *Pantoea ananatis* NP106 y cepa *Pantoea ananatis* NA1. Se obtuvo la cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB introduciendo el plásmido RSFCPG que contiene el gen de citrato sintasa (*gltA*), gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) y gen de glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) derivado de *Escherichia coli*, y el plásmido pSTVCB que contiene el gen de citrato sintasa (*gltA*) derivado de *Brevibacterium lactofermentum*, en la cepa SC17sucA. La cepa AJ13601 es una cepa seleccionada de la cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB como una cepa resistente a una alta concentración de ácido L-glutámico a un pH bajo. Se obtuvo la cepa NP106 de la cepa AJ13601 curando los plásmidos RSFCPG y pSTVCB. Se depositó la cepa AJ13601 ante el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (actualmente, agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario del Organismo Internacional de Patentes, n.º 120, 2-5-8 Kazusakamari, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 18 de agosto de 1999, y se le asignó el número de registro FERM P-17516. Entonces, se convirtió el depósito en un depósito internacional con arreglo a lo dispuesto en el Tratado de Budapest el 6 de julio de 2000, y se le asignó el número de registro FERM BP-7207.

Los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen cepas en las que tanto la actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa (*sucA*) como la actividad de succinato deshidrogenasa (*sdh*) se reducen o eliminan (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2010-041920). Los ejemplos específicos de tales cepas incluyen, por ejemplo, la cepa doble deficiente *sucAsdhA* de la cepa *Pantoea ananatis* NA1 (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2010-041920).

Los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen cepas mutantes auxotróficas. Los ejemplos específicos de cepas mutantes auxotróficas incluyen, por ejemplo, *E. coli* VL334thrC⁺ (VKPM B-8961, EP 1172433). *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) es una cepa auxotrófica de L-isoleucina y L-treonina que tiene mutaciones en los genes *thrC* e *ilvA* (patente estadounidense n.º 4.278.765). *E. coli* VL334thrC⁺ es una bacteria productora de ácido L-glutámico auxotrófica de L-isoleucina obtenida introduciendo un alelo de tipo natural del gen *thrC* en la cepa VL334. El alelo de tipo natural del gen *thrC* se introdujo mediante el método de transducción general usando un bacteriófago P1 hecho crecer sobre las células de la cepa *E. coli* K-12 de tipo natural (VKPM B-7).

Los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen cepas que tienen resistencia a un análogo de ácido aspártico. Tales cepas también pueden ser deficientes en la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa. Los ejemplos específicos de cepas que tienen resistencia a un análogo de ácido aspártico y deficientes en la actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa incluyen, por ejemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807, patente estadounidense n.º 5.908.768), *E. coli* FFRM P-12379, que adicionalmente tiene una capacidad de descomposición de ácido L-glutámico reducida (patente estadounidense n.º 5.393.671) y *E. coli* AJ13138 (FERM BP-5565, patente estadounidense n.º 6.110.714).

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de ácido L-glutámico también incluyen un método de modificación de una bacteria de modo que la actividad de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa y/o la actividad de fructosa-6-fosfato fosfocetolasa se potencia(n) (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kohyo) n.º 2008-509661). O bien una de la actividad de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa o bien la actividad de fructosa-6-fosfato fosfocetolasa puede potenciarse, o ambas pueden potenciarse. En esta memoria descriptiva, D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa y fructosa-6-fosfato fosfocetolasa pueden denominarse conjuntamente fosfocetolasa.

La actividad de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa significa una actividad para convertir xilulosa-5-fosfato en gliceraldehído-3-fosfato y acetil fosfato con consumo de ácido fosfórico para liberar una molécula de H₂O. Esta actividad puede medirse mediante el método descrito por Goldberg, M. *et al.* (Methods Enzymol., 9, 515-520, 1996) o el método descrito por L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001).

La actividad de fructosa-6-fosfato fosfocetolasa significa una actividad para convertir fructosa-6-fosfato en eritrosa-4-fosfato y acetil fosfato con consumo de ácido fosfórico para liberar una molécula de H₂O. Esta actividad puede medirse mediante el método descrito por Racker, E. (Methods Enzymol., 5, 276-280, 1962) o el método descrito por L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001).

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-glutamina también incluyen, por ejemplo, un método de potenciación de la expresión del gen *yhfK* (documento WO2005/085419) o el gen *ybjL* (documento WO2008/133161), que es un gen de secreción de ácido L-glutámico.

5

<Bacterias productoras de L-glutamina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-glutamina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-glutamina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) y glutamina sintetasa (*glnA*). La actividad glutamina sintetasa también puede potenciarse mediante alteración del gen de glutamina adenililtransferasa (*glnE*) o alteración del gen de la proteína de control PII (*glnB*) (documento EP 1229121).

15

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-glutamina también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades reducidas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas que catalizan una reacción que se ramifica de la ruta de biosíntesis de L-glutamina para generar un compuesto distinto de L-glutamina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, glutaminasa.

20

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas progenitoras para derivarlas incluyen una cepa que pertenece al género *Escherichia* y que tiene una glutamina sintetasa mutante en la que el residuo de tirosina de la posición 397 se reemplaza por otro residuo de aminoácido (solicitud publicada de patente estadounidense n.º 2003/0148474).

25

<Bacterias productoras de L-prolina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-prolina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-prolina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen glutamato-5-cinasa (*proB*), γ -glutamilfosfato reductasa, y pirolina-5-carboxilato reductasa (*putA*). Para potenciar la actividad de una enzima de este tipo, por ejemplo, puede usarse preferiblemente el gen *proB* que codifica una glutamato cinasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante L-prolina (patente alemana n.º 3127361).

35

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-glutamina también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad reducida de una enzima implicada en la descomposición de L-prolina. Los ejemplos de una enzima de este tipo incluyen prolina deshidrogenasa y ornitina aminotransferasa.

40

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-prolina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, *E. coli* NRRL B-12403 y NRRL B-12404 (patente británica n.º 2075056), *E. coli* VKPM B-8012 (solicitud de patente rusa n.º 2000124295), cepas mutantes de plásmido de *E. coli* descritas en la patente alemana n.º 3127361, cepas mutantes de plásmido de *E. coli* descritas por Bloom F.R. *et al.* (The 15th Miami winter symposium, 1983, p. 34), cepa *E. coli* 702 (VKPM B-8011), que es una cepa resistente a 3,4-deshidroxi-prolina y azetidina-2-carboxilato, y cepa *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012), que es una cepa deficiente en el gen *ilvA* de la cepa 702 (documento EP 1172433).

45

<Bacterias productoras de L-treonina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-treonina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-treonina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, aspartocinasa III (*lysC*), aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), aspartocinasa I (*thrA*), homoserina cinasa (*thrB*), treonina sintasa (*thrC*), y aspartato aminotransferasa (aspartato transaminasa) (*aspC*). Entre estas enzimas, es preferible potenciar la actividad o actividades de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de aspartocinasa III, aspartato semialdehído deshidrogenasa, aspartocinasa I, homoserina cinasa, aspartato aminotransferasa, y treonina sintasa. Cualquiera de los genes que codifican las enzimas de biosíntesis de L-treonina puede introducirse en una bacteria que tiene una capacidad reducida para descomponer treonina. Los ejemplos de una cepa de este tipo en la que se suprime la descomposición de treonina incluyen, por ejemplo, la cepa *E. coli* TDH6, que es deficiente en la actividad treonina deshidrogenasa (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2001-346578).

60

Las actividades de las enzimas de biosíntesis de L-treonina se inhiben mediante el producto final, L-treonina. Por tanto, para construir cepas productoras de L-treonina, se prefiere que los genes de las enzimas de biosíntesis de L-

65

treonina se modifiquen de modo que las enzimas se desensibilizan a inhibición de retroalimentación mediante L-treonina. Los genes *thrA*, *thrB* y *thrC* mencionados anteriormente constituyen el operón de treonina, que forma una estructura de atenuador. La expresión del operón de treonina se inhibe mediante isoleucina y treonina en el medio de cultivo y también se suprime mediante atenuación. Por tanto, la expresión del operón de treonina puede potenciarse retirando la secuencia líder o el atenuador en la región de atenuación (remítase a Lynn, S.P., Burton, W.S., Donohue, T.J., Gould, R.M., Gumpert, R.L., y Gardner, J.F., J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); documentos WO02/26993; WO2005/049808; y WO2003/097839).

El promotor nativo del operón de treonina está presente en dirección 5' del operón de treonina, y puede reemplazarse por un promotor no nativo (remítase al documento WO98/04715). Además, el operón de treonina puede construirse de modo que los genes de biosíntesis de treonina se expresan bajo el control del represor y promotor de fago λ (patente europea n.º 0593792). Además, también puede obtenerse una bacteria modificada de modo que se desensibiliza a inhibición de retroalimentación mediante L-treonina seleccionando una cepa resistente a ácido α -amino- β -hidroxiisovalérico (AHV), que es un análogo de L-treonina.

Se prefiere que la cantidad de expresión del operón de treonina que se modifica para desensibilizarse a inhibición de retroalimentación mediante L-treonina tal como se describió anteriormente se aumente en un huésped aumentando el número de copias del mismo o ligándolo a un promotor potente. El número de copias puede aumentarse introduciendo un plásmido que contiene el operón de treonina en un huésped. El número de copias puede aumentarse también transfiriendo el operón de treonina al genoma de un huésped usando un transposón, fago Mu, o similar.

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción L-treonina también incluyen, por ejemplo, un método de impartir resistencia a L-treonina a un huésped, y un método de impartir resistencia a L-homoserina a un huésped. Tal resistencia puede impartirse, por ejemplo, potenciando la expresión de un gen que imparte resistencia a L-treonina o un gen que imparte resistencia a L-homoserina. Los ejemplos de los genes que imparten la resistencia mencionada anteriormente incluyen el gen *rhtA* (Res. Microbiol. 154:123-135 (2003)), gen *rhtB* (patente europea abierta a consulta por el público n.º 0994190), gen *rhtC* (patente europea abierta a consulta por el público n.º 1013765), gen *yfiK* y gen *yeaS* (patente europea abierta a consulta por el público n.º 1016710). Como para los métodos para impartir resistencia a L-treonina a un huésped, puede hacerse referencia a los descritos en la patente europea abierta a consulta por el público n.º 0994190 y el documento WO90/04636.

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-treonina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996, patentes estadounidenses n.ºs 5.175.107 y 5.705.371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081, patente estadounidense n.º 5.631.157), *E. coli* NRRL-21593 (patente estadounidense n.º 5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (patente estadounidense n.º 5.474.918), *E. coli* FERM BP-3519 y FERM BP-3520 (patente estadounidense n.º 5.376.538), *E. coli* MG442 (Gusyatiner *et al.*, Genetika (en ruso), 14, 947-956 (1978)), *E. coli* VL643 y VL2055 (documento EP 1149911 A) y *E. coli* VKPM B-5318 (documento EP 0593792 B).

La cepa VKPM B-3996 es una cepa obtenida introduciendo el plásmido pVIC40 en la cepa TDH-6. La cepa TDH-6 tiene capacidad de asimilación de sacarosa y es deficiente en el gen *thrC*, y el gen *ilvA* del mismo tiene una mutación parcial. Esta cepa VKPM B-3996 también tiene una mutación en el gen *rhtA*, que imparte resistencia a alta concentración de treonina u homoserina. El plásmido pVIC40 es un plásmido obtenido insertando el operón *thrA*BC* que contiene un gen *thrA* mutante que codifica una aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa I resistente a inhibición de retroalimentación mediante treonina y los genes *thrBC* de tipo natural en un vector derivado de RSF1010 (patente estadounidense n.º 5.705.371). Este gen *thrA* mutante codifica una aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa I que se desensibiliza sustancialmente a inhibición de retroalimentación mediante treonina. La cepa B-3996 se depositó el 19 de noviembre de 1987 en el All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscú, Rusia) con el número de registro RIA 1867. Esta cepa también se depositó ante la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, FGUP GosNII Genetika, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscú 117545, Rusia) el 7 de abril de 1987 con el número de registro VKPM B-3996.

La cepa VKPM B-5318 es prototrófica con respecto a isoleucina, y alberga el plásmido pPRT614, que se corresponde con el plásmido pVIC40 del cual la región reguladora del operón de treonina se reemplaza por el represor CI de fago λ sensible a la temperatura y promotor PR. La cepa VKPM B-5318 se depositó ante la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscú 117545, Rusia) el 3 de mayo de 1990 con el número de registro de VKPM B-5318.

Se ha dilucidado el gen *thrA* que codifica aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa I de *E. coli* (números de nucleótidos 337 a 2799, registro de GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). El gen *thrA* se ubica entre los genes *thrL* y *thrB* en el cromosoma de *E. coli* K-12. Se ha dilucidado el gen *thrB* que codifica homoserina cinasa de *Escherichia coli* (números de nucleótidos 2801 a 3733, registro de GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). El gen de *thrB* se ubica entre los genes *thrA* y *thrC* en el cromosoma de *E. coli* K-12. Se ha dilucidado el gen *thrC* que codifica treonina sintasa de *E. coli* (números de nucleótidos 3734 a 5020, registro de GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). El gen *thrC* se ubica entre el gen *thrB* y el marco de lectura abierto *yaaX* en el cromosoma de *E. coli* K-12. El operón *thrA*BC* que contiene un gen *thrA* mutante que codifica una aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa I resistente

a inhibición de retroalimentación mediante treonina y los genes *thrBC* de tipo natural pueden obtenerse a partir del plásmido pVIC40 bien conocido, que está presente en la cepa productora de treonina *E. coli* VKPM B-3996 (patente estadounidense n.º 5.705.371).

5 El gen *rhtA* de *E. coli* se ubica en 18 min en el cromosoma de *E. coli* próximo al operón *glnHPQ*, que codifica componentes del sistema de transporte de glutamina. El gen *rhtA* es idéntico a ORF1 (gen *ybiF*, números de nucleótidos 764 a 1651, número de registro de GenBank AAA218541, gi:440181) y se ubica entre los genes *pexB* y *ompX*. La unidad que expresa una proteína codificada por el ORF1 se ha denominado gen *rhtA* (*rht*: resistencia a homoserina y treonina). También se ha revelado que la mutación *rhtA23* que imparte resistencia a alta concentración
10 de treonina u homoserina es una sustitución de A por G en la posición -1 con respecto al codón de inicio ATG (ABSTRACTS del 17º Congreso Internacional de Bioquímica y Biología Molecular junto con el Encuentro Anual de la Sociedad Americana para Bioquímica y Biología Molecular, San Francisco, California, 24-29 de agosto, 1997, n.º de resumen 457; documento EP 1013765 A).

15 El gen *asd* de *E. coli* ya se ha dilucidado (números de nucleótidos 3572511 a 3571408, registro de GenBank NC_000913.1, gi:16131307), y puede obtenerse mediante PCR (remítase a White, T.J., *et al.*, Trends Genet, 5:185-189, 1989) usando cebadores preparados basándose en la secuencia de nucleótidos del gen. Los genes *asd* de otros microorganismos también pueden obtenerse de manera similar.

20 El gen *aspC* de *E. coli* ya se ha dilucidado también (números de nucleótidos 983742 a 984932, registro de GenBank NC_000913.1, gi:16128895), y puede obtenerse mediante PCR usando cebadores preparados basándose en la secuencia de nucleótidos del gen. Los genes *aspC* de otros microorganismos también pueden obtenerse de manera similar.

25 <Bacterias productoras de L-lisina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-lisina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-lisina. Los ejemplos de tales
30 enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*), aspartocinasa III (*lysC*), dihidrodipicolinato reductasa (*dapB*), diaminopimelato descarboxilasa (*lysA*), diaminopimelato deshidrogenasa (*ddh*) (patente estadounidense n.º 6.040.160), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), aspartato aminotransferasa (aspartato transaminasa) (*aspC*), diaminopimelato epimerasa (*dapF*), tetrahidrodipicolinato succinilasa (*dapD*), succinilo diaminopimelato deacilasa (*dapE*) y aspartasa (*aspA*) (documento EP 1253195 A). Es preferible potenciar la actividad o actividades de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de, por ejemplo, dihidrodipicolinato reductasa, diaminopimelato descarboxilasa, diaminopimelato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, aspartato aminotransferasa, diaminopimelato epimerasa, aspartato semialdehído deshidrogenasa, tetrahidrodipicolinato succinilasa, y succinilo diaminopimelato deacilasa, entre estas enzimas. Además, bacterias productoras de L-lisina y cepas progenitoras para derivarlas pueden expresar un nivel aumentado
40 del gen implicado en la eficiencia energética (*cyo*) (documento EP 1170376 A), el gen que codifica nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (*pntAB*) (patente estadounidense n.º 5.830.716), el gen *ybiE* (documento WO2005/073390), o combinaciones de estos. Puesto que la aspartocinasa III (*lysC*) se somete a inhibición de retroalimentación mediante L-lisina, un gen *lysC* mutante que codifica una aspartocinasa III desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante L-lisina (patente estadounidense n.º 5.932.453) puede usarse para potenciar la actividad de esta enzima. Además, puesto que la dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*) se somete a inhibición de retroalimentación mediante L-lisina, un gen *dapA* mutante que codifica una dihidrodipicolinato sintasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante L-lisina puede usarse para potenciar la actividad de esta enzima.

50 Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-lisina también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades reducidas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas que catalizan una reacción que se ramifica de la ruta biosintética de L-lisina para generar un compuesto distinto de L-lisina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, homoserina deshidrogenasa, lisina descarboxilasa (patente estadounidense n.º 5.827.698) y enzima málica (documento WO2005/010175).

Los ejemplos de bacterias productoras de L-lisina y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen cepas mutantes que tienen resistencia a un análogo de L-lisina. Los análogos de L-lisina inhiben el crecimiento de bacterias tales como bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y bacterias corineformes, pero esta inhibición se libera completa o parcialmente cuando L-lisina está presente en el medio. Los ejemplos de estos análogos de L-lisina incluyen, pero no se limitan particularmente a, oxalisina, lisina hidroxamato, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ -metil-lisina y α -clorocapro lactama. Pueden obtenerse cepas mutantes que tienen resistencia a estos análogos de lisina sometiendo una bacteria a un tratamiento de mutagénesis artificial convencional.

65 Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-lisina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen *E. coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185, véase la patente estadounidense n.º 4.346.170) y *E. coli* VL611. En

estas cepas, la aspartocinasa se desensibiliza a inhibición de retroalimentación mediante L-lisina. Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-lisina y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen *E. coli* AJIK01 (NITE BP-01520). La cepa AJIK01 se designó *E. coli* AJ111046, y se depositó ante la agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario del Organismo Internacional de Patentes (n.º 120, 2-5-8 Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 29 de enero de 2013. Entonces, se convirtió en un depósito internacional con arreglo a lo dispuesto en el Tratado de Budapest el 15 de mayo de 2014, y se le asignó el número de registro de NITE BP-01520.

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-lisina y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen la cepa *E. coli* WC196. La cepa WC196 se mejoró genéticamente impartiendo resistencia a AEC a la cepa W3110, que se derivó de *E. coli* K-12 (patente estadounidense n.º 5.827.698). La cepa WC196 se designó *E. coli* AJ13069 y se depositó ante el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (actualmente, agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario del Organismo Internacional de Patentes, n.º 120, 2-5-8 Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 6 de diciembre de 1994 y se le asignó el número de registro de FERM P-14690. Entonces, se convirtió el depósito en un depósito internacional con arreglo a lo dispuesto en el Tratado de Budapest el 29 de septiembre de 1995, y se le asignó el número de registro de FERM BP-5252 (patente estadounidense n.º 5.827.698).

Los ejemplos preferidos de bacterias productoras de L-lisina incluyen *E. coli* WC196 Δ cadA Δ ldc y *E. coli* WC196 Δ cadA Δ ldc/pCABD2 (documento WO2006/078039). La *E. coli* WC196 Δ cadA Δ ldc es una cepa construida a partir de la cepa WC196 alterando los genes *cadA* y *ldcC* que codifican lisina descarboxilasa. La cepa WC196 Δ cadA Δ ldc/pCABD2 se construyó introduciendo el plásmido pCABD2 que contiene genes de enzimas de biosíntesis de lisina (patente estadounidense n.º 6.040.160) en la cepa WC196 Δ cadA Δ ldc. La cepa WC196 Δ cadA Δ ldc, denominada AJ110692, se depositó ante la agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Depositario del Organismo Internacional de Patentes (actualmente, agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Tecnología y Evaluación, Depositario del Organismo Internacional de Patentes, n.º 120, 2-5-8 Kazusakamatar, Kisarazu-shi, Chiba-ken, 292-0818, Japón) el 7 de octubre de 2008 como depósito internacional, y se le asignó el número de registro de FERM BP-11027. El plásmido pCABD2 contiene un gen *dapA* mutante derivado de *Escherichia coli* y que codifica una dihidrodipicolinato sintasa (DDPS) que tienen una mutación para desensibilización a inhibición de retroalimentación mediante L-lisina, un gen *lysC* mutante derivado de *Escherichia coli* y que codifica aspartocinasa III que tiene una mutación para desensibilización a inhibición de retroalimentación mediante L-lisina, el gen *dapB* derivado de *Escherichia coli* y que codifica dihidrodipicolinato reductasa, y el gen *dhh* derivado de *Brevibacterium lactofermentum* y que codifica diaminopimelato deshidrogenasa.

<Bacterias productoras de L-arginina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-arginina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-arginina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, N-acetilglutamato sintasa (*argA*), N-acetilglutamato fosfato reductasa (*argC*), ornitina acetil transferasa (*argJ*), N-acetilglutamato cinasa (*argB*), acetilornitina transaminasa (*argD*), acetilornitina desacetilasa (*argE*), ornitina carbamoilo transferasa (*argF*), argininosuccinato sintetasa (*argG*), argininosuccinato liasa (*argH*) y carbamoilo fosfato sintetasa (*carAB*). Como gen de N-acetilglutamato sintasa (*argA*), por ejemplo, puede usarse preferiblemente un gen que codifica una N-acetilglutamato sintasa mutante desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante L-arginina por sustitución para los residuos de aminoácido correspondientes a las posiciones 15 a 19 de la enzima de tipo natural (patente europea abierta a consulta por el público n.º 1170361).

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-arginina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, la cepa *E. coli* 237 (VKPM B-7925) (solicitud publicada de patente estadounidense n.º 2002/058315A1), cepas derivadas de las mismas introducidas con el gen *argA* que codifica una N-acetilo glutamato sintasa mutante (solicitud de patente rusa n.º 2001112869, documento EP 1170361 A1), cepa *E. coli* 382 derivada de la cepa 237 y que tiene una capacidad de asimilación de ácido acético mejorada (VKPM B-7926, documento EP 1170358 A1), y cepa *E. coli* 382ilvA+, que es una cepa obtenida de la cepa 382 introduciendo el gen *ilvA* de tipo natural a partir de la cepa *E. coli* K-12 de la misma. La cepa *E. coli* 237 se depositó ante la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscú 117545, Rusia) el 10 de abril de 2000 con el número de registro de VKPM B-7925, y se convirtió el depósito en un depósito internacional con arreglo a lo dispuesto en el Tratado de Budapest el 18 de mayo de 2001. La cepa *E. coli* 382 se depositó ante la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, 1 Dorozhny proezd., 1 Moscú 117545, Rusia) el 10 de abril de 2000 con el número de registro de VKPM B-7926.

Los ejemplos de bacterias productoras de L-arginina y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen cepas que tienen resistencia a análogos de aminoácidos, y así sucesivamente. Los ejemplos de tales cepas incluyen cepas

mutantes de *Escherichia coli* que tienen resistencia a α -metilmetionina, p-fluorofenilalanina, D-arginina, hidroxamato de arginina, S-(2-aminoetil)-cisteína, α -metilserina, β -2-tienilalanina, o sulfaguanidina (remítase a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-106598).

5 <Bacterias productoras de L-citrulina y bacterias productoras de L-ornitina>

Las rutas biosintéticas de L-citrulina y L-ornitina son comunes a las de L-arginina. Por tanto, puede impartirse o potenciarse una capacidad para producir L-citrulina y/o L-ornitina aumentando la actividad o actividades de N-acetilglutamato sintasa (*argA*), N-acetilglutamato fosfato reductasa (*argC*), ornitina acetiltransferasa (*argJ*), N-acetilglutamato cinasa (*argB*), acetilornitina transaminasa (*argD*) y/o acetilornitina desacetilasa (*argE*) (documento WO2006/35831).

<Bacterias productoras de L-histidina>

15 Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-histidina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-histidina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, ATP fosforibosiltransferasa (*hisG*), fosforibosilo AMP ciclohidrolasa (*hisI*), fosforibosil-ATP pirofosfohidrolasa (*hisI*), fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribótido isomerasa (*hisA*), amidotransferasa (*hisH*), histidinol fosfato aminotransferasa (*hisC*), histidinol fosfatasa (*hisB*) e histidinol deshidrogenasa (*hisD*).

Entre estas enzimas, se sabe que las enzimas de biosíntesis de L-histidina codificadas por *hisG* y *hisBHAFI* se inhiben mediante L-histidina. Por tanto, la capacidad para producir L-histidina puede impartirse o potenciarse, por ejemplo, introduciendo una mutación para conferir resistencia a inhibición de retroalimentación en el gen que codifica ATP fosforibosiltransferasa (*hisG*) (patentes rusas n.ºs 2003677 y 2119536).

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-histidina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tal como la cepa *E. coli* 24 (VKPM B-5945, RU 2003677), *E. coli* NRRL B-12116 a B-12121 (patente estadounidense n.º 4.388.405), *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675) y H-9343 (FERM BP-6676, patente estadounidense n.º 6.344.347), *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674, documento EP 1085087), *E. coli* AI80/pFM201 (patente estadounidense n.º 6.258.554), *E. coli* FERM P-5038 y FERM P-5048, que se han introducido con un vector que porta un ADN que codifica una enzima de biosíntesis de L-histidina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-005099), cepas *E. coli* introducidas con un gen para el transporte de aminoácido (documento EP 1016710 A), y cepa *E. coli* 80, a las que se les ha importado resistencia a sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina, y estreptomycinina (VKPM B-7270, patente rusa n.º 2119536).

<Bacterias productoras de L-cisteína>

40 Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-cisteína incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-cisteína. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, serina acetiltransferasa (*cysE*) y 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (*serA*). La actividad de serina acetiltransferasa puede potenciarse, por ejemplo, introduciendo un gen *cysE* mutante que codifica una serina acetiltransferasa mutante resistente a inhibición de retroalimentación mediante cisteína en una bacteria. Una serina acetiltransferasa mutante de este tipo se divulga en, por ejemplo, la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 11-155571 y solicitud publicada de patente estadounidense n.º 20050112731. Además, la actividad de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa puede potenciarse, por ejemplo, introduciendo un gen *serA* mutante que codifica una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa mutante resistente a inhibición de retroalimentación mediante serina en una bacteria. Una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa mutante de este tipo se divulga en, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.180.373.

Además, los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-cisteína también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades reducidas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas que catalizan una reacción que se ramifica de la ruta de biosíntesis de L-cisteína para generar un compuesto distinto de L-cisteína. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, por ejemplo, enzimas implicadas en la descomposición de L-cisteína. Los ejemplos de las enzimas implicadas en la descomposición de L-cisteína incluyen, pero no se limitan particularmente a, cistationina- β -liasa (*metC*, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 11-155571; Chandra *et al.*, *Biochemistry*, 21 (1982) 3064-3069), triptofanasa (*tnaA*, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2003-169668; Austin Newton *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1211-1218), O-acetilserina sulfhidrilasa B (*cysM*, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2005-245311), el producto génico *malY* (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2005-245311), y el producto génico *d0191* de *Pantoea ananatis* (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2009-232844).

Además, los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-cisteína también

incluyen, por ejemplo, un método de potenciar el sistema excretor de L-cisteína, y un método de potenciar el sistema de transporte de sulfato/tiosulfato. Los ejemplos de proteínas del sistema excretor de L-cisteína incluyen la proteína codificada por el gen *ydeD* (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2002-233384), la proteína codificada por el gen *yfiK* (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2004-49237), las proteínas codificadas por los genes *emrAB*, *emrKY*, *yojIH*, *acrEF*, *bcr* y *cusA* (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2005-287333), y la proteína codificada por el gen *yeaS* (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2010-187552). Los ejemplos de las proteínas del sistema de transporte de sulfato/tiosulfato incluyen las proteínas codificadas por la agrupación génica *cysPTWAM*.

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-cisteína y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, *E. coli* JM15 transformada con diferentes alelos de *cysE* que codifican serina acetiltransferasas resistentes a retroalimentación (patente estadounidense n.º 6.218.168, solicitud de patente rusa 2003121601), *E. coli* W3110 que tienen un gen sobreexpresado que codifica una proteína adecuada para la secreción de una sustancia citotóxica (patente estadounidense n.º 5.972.663), cepas de *E. coli* que tienen una actividad de cisteína desulfhidrasa reducida (documento JP11155571A2), y *E. coli* W3110 que tiene una actividad aumentada de un regulador de la transcripción positivo por regulón de cisteína codificado por el gen *cysB* (documento WO0127307A1).

<Bacterias productoras de L-metionina>

Los ejemplos de bacterias productoras de L-metionina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen cepas auxotróficas de L-treonina y cepas mutantes resistentes a norleucina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2000-139471). Los ejemplos de bacterias productoras de L-metionina y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen una cepa que contiene una homoserina transsuccinilasa mutante resistente a inhibición de retroalimentación mediante L-metionina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2000-139471, solicitud publicada de patente estadounidense n.º 20090029424). Puesto que la L-metionina se biosintetiza por medio de L-cisteína como producto intermedio, la capacidad de producción de L-metionina también puede mejorarse mejorando la capacidad de producción de L-cisteína (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2000-139471, solicitud publicada de patente estadounidense n.º 20080311632).

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-metionina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, *E. coli* AJ11539 (NRRL B-12399), *E. coli* AJ11540 (NRRL B-12400), *E. coli* AJ11541 (NRRL B-12401), *E. coli* AJ11542 (NRRL B-12402, patente británica n.º 2075055), la cepa *E. coli* 218 (VKPM B-8125, patente rusa n.º 2209248) y la cepa 73 (VKPM B-8126, patente rusa n.º 2215782), que son resistentes a norleucina, que es un análogo de L-metionina, y *E. coli* AJ13425 (FERMP-16808, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2000-139471). La cepa AJ13425 es una cepa auxotrófica de L-treonina derivada de la *E. coli* W3110, en la que el represor de metionina se elimina, la actividad de S-adenosilmetionina sintetasa intracelular se atenúa, y la actividad de homoserina transsuccinilasa intracelular, actividad de cistationina γ -sintasa, y actividad de aspartocinasa-homoserina deshidrogenasa II se potencian.

<Bacterias productoras de L-leucina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-leucina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-leucina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, las enzimas codificadas por los genes del operón *leuABCD*. Además, para potenciar la actividad de una enzima de este tipo, por ejemplo, puede usarse preferiblemente el gen *leuA* mutante que codifica una isopropil maleato sintasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante L-leucina (patente estadounidense n.º 6.403.342).

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-leucina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como cepas de *E. coli* resistentes a leucina (por ejemplo, la cepa 57 (VKPM B-7386, patente estadounidense n.º 6.124.121)), cepas de *E. coli* resistentes a un análogo de leucina tal como β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina y 5,5,5-trifluoroleucina (publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º 62-34397 y patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 8-70879), cepas de *E. coli* obtenidas mediante una técnica de modificación por ingeniería genética descrita en el documento WO96/06926, y *E. coli* H-9068 (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 8-70879).

<Bacterias productoras de L-isoleucina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-isoleucina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene actividad o actividades aumentadas de una o más enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-isoleucina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, treonina desaminasa y ácido acetohidroxi sintasa (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2-458, FR 0356739, patente estadounidense n.º 5.998.178).

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-isoleucina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, bacterias de *Escherichia* tales como cepas mutantes que tienen resistencia a 6-dimetilaminopurina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 5-304969), cepas mutantes que tienen resistencia a un análogo de isoleucina tal como hidroxamato de isoleucina y tiaisoleucina, y cepas mutantes que tienen resistencia a un análogo de isoleucina de este tipo y que tienen además resistencia a DL-etionina y/o hidroxamato de arginina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 5-130882).

<Bacterias productoras de L-valina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-valina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-valina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, las enzimas codificadas por los genes del operón *ilvGMEDA* y las enzimas codificadas por el operón *ilvBNC*. El gen *ilvBN* codifica ácido acetohidroxi sintasa, y el gen *ilvC* codifica isomerorreductasa (documento WO00/50624). Las expresiones del operón *ilvGMEDA* y el operón *ilvBNC* se suprimen (atenúan) mediante L-valina, L-isoleucina y/o L-leucina. Por tanto, para potenciar la actividad de una enzima de este tipo, se prefiere que la supresión de expresión mediante la L-valina producida se libere eliminando o modificando una región requerida para la atenuación. Además, la treonina desaminasa codificada por el gen *ilvA* es una enzima que cataliza la reacción de desaminación de L-treonina que da como resultado ácido 2-cetobutírico, que es la etapa limitante de la velocidad del sistema de biosíntesis de L-isoleucina. Por tanto, para la producción de L-valina, se prefiere que el gen *ilvA*, por ejemplo, se altere, y de ese modo se disminuye la actividad de treonina desaminasa.

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-valina también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades reducidas de uno o más tipos de enzimas seleccionadas de las enzimas que catalizan una reacción que se ramifica de la ruta de biosíntesis de L-valina para generar un compuesto distinto de L-valina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, treonina deshidratasa implicada en la síntesis de L-leucina, y las enzimas implicadas en la síntesis de ácido D-pantoténico (documento WO00/50624).

Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-valina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, cepas de *E. coli* modificadas para sobreexpresar el operón *ilvGMEDA* (patente estadounidense n.º 5.998.178).

Los ejemplos de bacterias productoras de L-valina y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen cepas mutantes que tienen una mutación en aminoacil ARNt sintetasa (patente estadounidense n.º 5.658.766). Los ejemplos de tales cepas incluyen, por ejemplo, *E. coli* VL1970, que tiene una mutación en el gen *ileS* que codifica isoleucina ARNt sintetasa. Se depositó *E. coli* VL1970 ante la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, 1 Dorozhny Proezd, 1 Moscú 117545, Rusia) el 24 de junio de 1988 con el número de registro de VKPM B-4411. Los ejemplos de bacterias productoras de L-valina y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen cepas mutantes que requieren ácido lipoico para el crecimiento y/o que carecen de H⁺-ATPasa (documento WO96/06926).

<Bacterias productoras de L-triptófano, bacterias productoras de L-fenilalanina y bacterias productoras de L-tirosina>

Los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-triptófano, capacidad de producción de L-fenilalanina y/o capacidad de producción de L-tirosina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de una o más enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-triptófano, L-fenilalanina y/o L-tirosina.

Los ejemplos de enzimas comunes a los sistemas de biosíntesis de estos aminoácidos aromáticos incluyen, pero no se limitan particularmente a, 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa (*aroG*), 3-deshidroquinato sintasa (*aroB*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), shikimato cinasa (*aroL*), 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (*aroA*) y corismato sintasa (*aroC*) (patente europea n.º 763127). Las expresiones de los genes que codifican estas enzimas se controlan mediante el represor de tirosina (*tyrR*), y las actividades de estas enzimas pueden potenciarse delecionando el gen *tyrR* (patente europea n.º 763127).

Los ejemplos de las enzimas de biosíntesis de L-triptófano incluyen, pero no se limitan particularmente a, antranilato sintasa (*trpE*), triptófano sintasa (*trpAB*) y fosfoglicerato deshidrogenasa (*serA*). Por ejemplo, introduciendo un ADN que codifica el operón de triptófano, puede impartirse o potenciarse la capacidad de producción de L-triptófano. Triptófano sintasa consiste en las subunidades α y β codificadas por los genes *trpA* y *trpB*, respectivamente. Puesto que la antranilato sintasa se somete a inhibición de retroalimentación mediante L-triptófano, puede usarse un gen que codifica esta enzima introducido con una mutación para desensibilización a inhibición de retroalimentación para potenciar la actividad de esa enzima. Puesto que la fosfoglicerato deshidrogenasa se somete a inhibición de retroalimentación mediante L-serina, puede usarse un gen que codifica esta enzima introducida con una mutación para desensibilización a inhibición de retroalimentación para potenciar la actividad de esa enzima. Además,

aumentando la expresión del operón (operón *ace*) que consiste en el gen de maleato sintasa (*aceB*), gen de isocitrato liasa (*aceA*) y gen de isocitrato deshidrogenasa cinasa/fosfatasa (*aceK*), puede impartirse o potenciarse la capacidad de producción de L-triptófano (documento WO2005/103275).

5 Los ejemplos de las enzimas de biosíntesis de L-fenilalanina incluyen, pero no se limitan particularmente a, corismato mutasa y prefenato deshidratasa. La corismato mutasa y prefenato deshidratasa se codifican mediante el gen *pheA* como enzima bifuncional. Puesto que la corismato mutasa y prefenato deshidratasa se someten a inhibición de retroalimentación mediante L-fenilalanina, los genes que codifican estas enzimas introducidos con una mutación para desensibilización a inhibición de retroalimentación pueden usarse para potenciar las actividades de estas enzimas.

10 Los ejemplos de las enzimas de biosíntesis de L-tirosina incluyen, pero no se limitan particularmente a, corismato mutasa y prefenato deshidrogenasa. La corismato mutasa y prefenato deshidrogenasa se codifican mediante el gen *tyrA* como enzima bifuncional. Puesto que la corismato mutasa y prefenato deshidrogenasa se someten a inhibición de retroalimentación mediante L-tirosina, pueden usarse genes que codifican estas enzimas introducidos con una mutación para desensibilización a inhibición de retroalimentación para potenciar las actividades de estas enzimas.

15 Las bacterias productoras de L-triptófano, L-fenilalanina y/o L-tirosina pueden modificarse de modo que se reduce la biosíntesis de un aminoácido aromático distinto del aminoácido aromático objetivo. Además, las bacterias productoras de L-triptófano, L-fenilalanina y/o L-tirosina pueden modificarse de modo que se potencia un sistema de captación de subproducto. Los ejemplos del subproducto incluyen aminoácidos aromáticos distintos del aminoácido aromático objetivo. Los ejemplos del gen que codifica un sistema de captación de subproducto de este tipo incluyen, por ejemplo, *tnaB* y *mtr*, que son genes que codifican el sistema de captación de L-triptófano, *pheP*, que es un gen que codifica el sistema de captación de L-fenilalanina, y *tyrP*, que es un gen que codifica el sistema de captación de L-tirosina (documento EP 1484410).

20 Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) y JP6015/pMU91 (DSM10123), que tienen un gen *trpS* mutante que codifica una triptofanil-ARNt sintetasa parcialmente inactivada (patente estadounidense n.º 5.756.345), *E. coli* SV164, que tiene un alelo *trpE* que codifica una antranilato sintasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante triptófano, *E. coli* SV164 (pGH5), que tiene un alelo *serA* que codifica una fosfoglicerato deshidrogenasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante serina y un alelo *trpE* que codifica una antranilato sintasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante triptófano (patente estadounidense n.º 6.180.373), una cepa introducida con un operón de triptófano que contiene un alelo *trpE* que codifica una antranilato sintasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación mediante triptófano (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.os 57-71397 y 62-244382, patente estadounidense n.º 4.371.614), *E. coli* AGX17(pGX44) (NRRL B-12263) y AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), que son deficientes en triptofanasa (patente estadounidense n.º 4.371.614), *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps, que tiene una capacidad de producción de fosfoenolpiruvato aumentada (documento WO97/08333, patente estadounidense n.º 6.319.696), y cepas que pertenecen al género *Escherichia* que tienen una actividad aumentada de la proteína codificada por el gen *yedA* o *yddG* (solicitudes publicadas de patente estadounidense 2003/0148473 A1 y 2003/0157667 A1).

25 Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-fenilalanina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen, por ejemplo, *E. coli* AJ12739 (*tyrA::Tn10*, *tyrR*) (VKPM B-8197), que es deficiente en la corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa y el represor de tirosina (documento WO03/044191), *E. coli* HW1089 (ATCC 55371), que contiene un gen *pheA34* mutante que codifica una corismato mutasa-prefenato deshidratasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación (patente estadounidense n.º 5.354.672), *E. coli* MWEC101-b (KR8903681), *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 y NRRL B-12147 (patente estadounidense n.º 4.407.952). Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-fenilalanina y cepas progenitoras para derivarlas también incluyen, por ejemplo, *E. coli* K-12 <W3110(*tyrA*)/pPHAB> (FERM BP-3566), *E. coli* K-12 <W3110(*tyrA*)/pPHAD> (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 <W3110(*tyrA*)/pPHATerm> (FERM BP-12662), y *E. coli* K-12 AJ12604 <W3110(*tyrA*)/pBR-aroG4, pACMAB> (FERM BP-3579), que contiene un gen que codifica una corismato mutasa-prefenato deshidratasa desensibilizada a inhibición de retroalimentación (documento EP 488424 B1). Los ejemplos específicos de bacterias productoras de L-fenilalanina y cepas progenitoras para derivarlas incluyen además, por ejemplo, cepas que pertenecen al género *Escherichia* que tienen una actividad aumentada de la proteína codificada por el gen *yedA* o el gen *yddG* (solicitudes publicadas de patente estadounidense n.º 2003/0148473 y 2003/0157667, documento WO03/044192).

30 Además, los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácido incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad aumentada para secretar un L-aminoácido de una célula bacteriana. Una actividad de este tipo para secretar un L-aminoácido puede aumentarse, por ejemplo, aumentando la expresión de un gen que codifica una proteína responsable para la secreción del L-aminoácido. Los ejemplos de genes que codifican las proteínas responsables para la secreción de diversos aminoácidos incluyen, por ejemplo, gen *b2682* (*ygaZ*), gen *b2683* (*ygaH*), gen *b1242* (*yche*) y gen *b3434* (*yhgN*) (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2002-300874).

35 Además, los ejemplos de métodos para impartir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácido también

incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de una o más proteínas seleccionadas de proteínas implicadas en el glicometabolismo y proteínas implicadas en el metabolismo energético.

5 Los ejemplos de las proteínas implicadas en el glicometabolismo incluyen proteínas implicadas en la captación de sacáridos y las enzimas del sistema de glicolisis. Los ejemplos de genes que codifican una proteína implicada en el glicometabolismo incluyen el gen de glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*, documento WO01/02542), gen de fosfoenolpiruvato sintasa (*pps*, patente europea abierta a consulta por el público n.º 877090), gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*, documento WO95/06114), gen de piruvato carboxilasa (*pyc*, documento
10 WO99/18228, patente europea abierta a consulta por el público n.º 1092776), gen de fosfoglucomutasa (*pgm*, documento WO03/04598), gen de fructosa bisfosfato aldolasa (*pfkB*, *fbp*, documento WO03/04664), gen de piruvato cinasa (*pykF*, documento WO03/008609), gen de transaldolasa (*talB*, documento WO03/008611), gen de fumarasa (*fum*, documento WO01/02545), gen de captación de sacarosa no PTS (*csc*, patente europea abierta a consulta por el público n.º 149911), y gen de asimilación de sacarosa (operón *scrAB*, documento WO90/04636).

15 Los ejemplos de genes que codifican las proteínas implicadas en el metabolismo energético incluyen el gen de transhidrogenasa (*pntAB*, patente estadounidense n.º 5.830.716) y gen de citocromo tipo bo oxidasa (*cyoB*, patente europea abierta a consulta por el público n.º 1070376).

20 Los genes usados para la mejora genética de las bacterias productoras de L-aminoácidos mencionados anteriormente no se limitan a los genes ejemplificados anteriormente y genes que tienen una secuencia de nucleótidos conocida, y pueden ser una variante de los mismos, siempre que se mantenga su función original. Por ejemplo, los genes usados para la mejora genética de las bacterias productoras de L-aminoácidos pueden ser un gen que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de una proteína conocida, pero que incluye
25 sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios residuos de aminoácido en una o varias posiciones. Para las variantes de genes y proteínas, pueden aplicarse las descripciones para variantes de los genes *acpP* y *fabF*, y las proteínas codificadas de ese modo mencionadas a continuación, *mutatis mutandis*.

<1-2> Atenuación del operón *acpP-fabF*

30 La bacteria de la presente divulgación se ha modificado de modo que el operón *acpP-fabF* se atenúa. El operón *acpP-fabF* participa en la biosíntesis de ácido graso (documento no de patente 1). Por tanto, se asume que cuando se realiza cultivo de producción de L-aminoácido usando una bacteria en la que el operón *acpP-fabF* se ha atenuado, se disminuye la entrada de una fuente de carbono en la ruta de biosíntesis de ácido graso, y como
35 resultado, puede usarse fuente de carbono excedente y poder de reducción excedente para la producción de L-aminoácido para mejorar de ese modo la producción de L-aminoácido, en comparación con cuando se realiza cultivo de producción de L-aminoácido usando una cepa no modificada. La bacteria de la presente divulgación puede obtenerse modificando una bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido de modo que el operón *acpP-fabF* se atenúa. Además, la bacteria de la presente divulgación también puede obtenerse modificando una
40 bacteria de modo que el operón *acpP-fabF* se atenúa, y después impartiendo una capacidad de producción de L-aminoácido a la bacteria o potenciando una capacidad de producción de L-aminoácido de la bacteria. La bacteria de la presente divulgación también puede ser una bacteria que ha adquirido una capacidad de producción de L-aminoácido modificándose de modo que el operón *acpP-fabF* se atenúa. Las modificaciones para construir la bacteria de la presente divulgación pueden realizarse en un orden arbitrario.

45 La expresión que “el operón *acpP-fabF* se atenúa” significa que la actividad de una proteína codificada por un gen del operón *acpP-fabF* se reduce, y/o que la expresión de un gen del operón *acpP-fabF* se reduce. La expresión que “la expresión de un gen se reduce” significa que la cantidad de transcripción del gen (la cantidad de ARNm) se reduce, y/o que la cantidad de traducción del gen (la cantidad de la proteína) se reduce. El “gen del operón *acpP-fabF*” significa el gen *acpP* y/o el gen *fabF*. Es decir, la “proteína codificada por un gen del operón *acpP-fabF*” se refiere a una proteína codificada por el gen *fabF* y/o una proteína codificada por el gen *acpP*, es decir, proteína AcpP y/o proteína FabF. La actividad de una proteína puede reducirse, por ejemplo, atenuando la expresión de un gen que
50 codifica la proteína, o alterando un gen que codifica la proteína, tal como se describe a continuación. Es decir, la expresión que “el operón *acpP-fabF* se atenúa” también puede significar que, por ejemplo, la expresión de un gen del operón *acpP-fabF* se atenúa. En la presente invención, por ejemplo, la expresión de o bien uno o bien ambos del gen *acpP* y el gen *fabF* puede atenuarse. Es decir, la expresión de todo el operón *acpP-fabF* puede atenuarse también.

60 El gen *acpP* es un gen que codifica la proteína portadora de acilo (ACP). “ACP” es una proteína que tiene una función de unión con una cadena de ácido graso por medio del grupo 4'-fosfopanteteína, y que porta de ese modo la cadena de ácido graso en el momento de biosíntesis de ácido graso. Esta función también se denomina “actividad de ACP”. ACP se traduce como una apo-ACP inactiva, entonces se añade 4'-fosfopanteteína como cofactor al residuo de serina de la posición 36 (en el caso de *Escherichia coli*) de apo-ACP mediante la ACP sintasa, y apo-ACP se convierte de ese modo en holo-ACP activa.

65 El gen *fabF* es un gen que codifica β-cetoacil-ACP sintasa II. La “β-cetoacil-ACP sintasa II” se refiere a una enzima

que cataliza la reacción que genera una 3-oxoacil-ACP (número de carbono = $n + 2$) a partir de una acil-ACP (número de carbono = n) y malonil-ACP (EC 2.3.1.41). La actividad de catalizar esta reacción también se denomina “actividad de β -cetoacil-ACP sintasa II”.

5 El gen *acpP* de la cepa *Escherichia coli* K-12 MG1655 se corresponde con la secuencia de las posiciones 1150838 a 1151074 en la secuencia genómica registrada en la base de datos de NCBI como registro de GenBank NC_000913 (VERSIÓN NC_000913.2 GI: 49175990). El gen *acpP* de la cepa MG1655 es sinónimo con *ECK1080* y *JW1080*. Además, la proteína AcpP de la cepa MG1655 se registra como registro de GenBank NP_415612 (versión NP_415612.1 GI: 16129057, locus_tag”b1094”).

10 El gen *fabF* de la cepa de *Escherichia coli* K-12 MG1655 se corresponde con la secuencia de las posiciones 1151162 a 1152403 en la secuencia genómica registrada en la base de datos de NCBI como registro de GenBank NC_000913 (VERSIÓN NC_000913.2 GI: 49175990). El gen *fabF* de la cepa MG1655 es sinónimo con *ECK1081* y *JW1081*. Además, la proteína FabF de la cepa MG1655 se registra como registro de GenBank NP_415613 (versión NP_415613.1 GI: 16129058, locus_tag”b1095”).

15 La secuencia de nucleótidos del operón *acpP-fabF* (que incluye en dirección 5’ 210 pb del mismo) de la cepa MG1655 se muestra como SEQ ID NO: 7. En SEQ ID NO: 7, la secuencia de nucleótidos del gen *acpP* se corresponde con las posiciones 211 a 447, y la secuencia de nucleótidos del gen *fabF* se corresponde con las posiciones 535 a 1776. Además, las secuencias de aminoácidos de la proteína AcpP y proteína FabF de la cepa MG1655 se muestran como SEQ ID NO: 8 y 9, respectivamente.

20 El gen *acpP* de la cepa *Pantoea ananatis* AJ13355 se corresponde con la secuencia de las posiciones 986154 a 986528 en la secuencia genómica registrada en la base de datos de NCBI como registro de GenBank NC_017531 (VERSIÓN NC_017531.1 GI: 386014600). Además, la proteína AcpP de la cepa AJ13355 se registra como registro de GenBank YP_005933706 (versión YP_005933706.1 GI: 386015425).

25 El gen *fabF* de la cepa *Pantoea ananatis* AJ13355 se corresponde con la secuencia de las posiciones 986650 a 987855 en la secuencia genómica registrada en la base de datos de NCBI como registro de GenBank NC_017531 (VERSIÓN NC_017531.1 GI: 386014600). Además, la proteína FabF de la cepa AJ13355 se registra como registro de GenBank YP_005933707 (versión YP_005933707.1 GI: 386015426).

30 La secuencia de nucleótidos del operón *acpP-fabF* (que incluye en dirección 5’ 210 pb del mismo) de la cepa AJ13355 se muestra como SEQ ID NO: 10. En SEQ ID NO: 10, la secuencia de nucleótidos del gen *acpP* se corresponde con las posiciones 211 a 585, y la secuencia de nucleótidos del gen *fabF* se corresponde con las posiciones 707 a 1912. Además, las secuencias de aminoácidos de la proteína AcpP y la proteína FabF de la cepa AJ13355 se muestran como SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente.

35 La proteína AcpP o proteína FabF puede ser una variante de la proteína AcpP o proteína FabF mencionada anteriormente, siempre que se mantenga la función original de cada proteína. De manera similar, el gen *acpP* o gen *fabF* puede ser una variante del gen *acpP* gene o gen *fabF* mencionados anteriormente, siempre que se mantenga la función original de cada gen. Una variante de este tipo de la cual la función original se mantiene también puede denominarse “variante conservadora”. El término “proteína AcpP” o “proteína FabF” no se limita a la proteína AcpP o proteína FabF mencionada anteriormente, sino que también incluye variantes conservadoras de las mismas. De manera similar, el término “gen *acpP*” o “gen *fabF*” no se limita al gen *acpP* o gen *fabF* mencionado anteriormente, sino que también incluye variantes conservadoras de los mismos. Los ejemplos de una variante conservadora de este tipo incluyen, por ejemplo, variantes homólogas y artificialmente modificadas de la proteína AcpP o proteína FabF mencionada anteriormente, o del gen *acpP* o gen *fabF* mencionado anteriormente.

40 La expresión que “la función original de la proteína se mantiene” significa que una variante de la proteína o el gen tiene una función (es decir, actividad o propiedad) correspondiente a la función (es decir, actividad o propiedad) de la proteína original o el gen original. Concretamente, por ejemplo, la expresión que “la función original de la proteína se mantiene” usada para la proteína AcpP significa que la proteína tiene la actividad de ACP, y la expresión que “la función original de la proteína se mantiene” usada para la proteína FabF significa que la proteína tiene la actividad de β -cetoacil-ACP sintasa II. Además, por ejemplo, la expresión que “la función original del gen se mantiene” usada para el gen *acpP* significa que el gen que codifica una proteína que tiene la actividad de ACP, y la expresión que “la función original del gen se mantenga” usada para el gen *fabF* significa que el gen codifica una proteína que tiene la actividad de β -cetoacil-ACP sintasa II.

45 La expresión que “la función original de la proteína se mantiene” significa que una variante de la proteína o el gen tiene una función (es decir, actividad o propiedad) correspondiente a la función (es decir, actividad o propiedad) de la proteína original o el gen original. Concretamente, por ejemplo, la expresión que “la función original de la proteína se mantiene” usada para la proteína AcpP significa que la proteína tiene la actividad de ACP, y la expresión que “la función original de la proteína se mantiene” usada para la proteína FabF significa que la proteína tiene la actividad de β -cetoacil-ACP sintasa II. Además, por ejemplo, la expresión que “la función original del gen se mantiene” usada para el gen *acpP* significa que el gen que codifica una proteína que tiene la actividad de ACP, y la expresión que “la función original del gen se mantenga” usada para el gen *fabF* significa que el gen codifica una proteína que tiene la actividad de β -cetoacil-ACP sintasa II.

50 Un gen que codifica un homólogo de la proteína AcpP o proteína FabF mencionada anteriormente se obtiene fácilmente a partir de una base de datos pública mediante, por ejemplo, búsqueda BLAST o búsqueda FASTA usando cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente del gen *acpP* o gen *fabF* como una secuencia de consulta. Además, un gen que codifica un homólogo de la proteína AcpP o proteína FabF mencionada anteriormente puede obtenerse mediante, por ejemplo, PCR usando el cromosoma de un organismo tal como una bacteria como molde, y oligonucleótidos preparados basándose en una secuencia génica conocida de los mismos como cebadores.

5 El gen *acpP* o gen *fabF* puede ser un gen que codifica una variante conservadora de la proteína AcpP o proteína FabF mencionada anteriormente. Por ejemplo, el gen *acpP* o gen *fabF* puede ser, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que tiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, 11 o 12) que incluyen sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios residuos de aminoácido en una o varias posiciones, siempre que codifique para una proteína que tiene la función original. En tal caso, puede mantenerse habitualmente el 70 % o más, preferiblemente el 80 % o más, más preferiblemente el 90 % o más, de la actividad correspondiente de la proteína (es decir la actividad de ACP o la actividad de β -cetoacil-ACP sintasa II) con respecto a la proteína que no incluye adición, delección, inserción o adición de uno o varios residuos de aminoácido. Aunque el número de "uno o varios" puede diferir según las posiciones de residuos de aminoácido en la estructura tridimensional de la proteína o tipos de residuos de aminoácido, específicamente, es de 1 a 50, de 1 a 40, o de 1 a 30, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10, todavía más preferiblemente de 1 a 5, de manera particularmente preferible de 1 a 3.

15 La sustitución, delección, inserción o adición mencionada anteriormente de uno o varios residuos de aminoácido es una mutación conservadora que mantiene la función normal de la proteína. Ejemplos típicos de la mutación conservadora son sustituciones conservadoras. La sustitución conservadora es una mutación en la que tiene lugar una sustitución mutuamente entre Phe, Trp y Tyr, si el sitio de sustitución es un aminoácido aromático; entre Leu, Ile y Val, si es un aminoácido hidrófobo; entre Gln y Asn, si es un aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, si es un aminoácido básico; entre Asp y Glu, si es un aminoácido ácido; y entre Ser y Thr, si es un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo. Los ejemplos de sustituciones consideradas sustituciones conservadoras incluyen, específicamente, sustitución de Ser o Thr por Ala, sustitución de Gln, His o Lys por Arg, sustitución de Glu, Gln, Lys, His o Asp por Asn, sustitución de Asn, Glu o Gln por Asp, sustitución de Ser o Ala por Cys, sustitución de Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg por Gln, sustitución de Gly, Asn, Gln, Lys o Asp por Glu, sustitución de Pro por Gly, sustitución de Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr por His, sustitución de Leu, Met, Val o Phe por Ile, sustitución de Ile, Met, Val o Phe por Leu, sustitución de Asn, Glu, Gln, His o Arg por Lys, sustitución de Ile, Leu, Val o Phe por Met, sustitución de Trp, Tyr, Met, Ile o Leu por Phe, sustitución de Thr o Ala por Ser, sustitución de Ser o Ala por Thr, sustitución de Phe o Tyr por Trp, sustitución de His, Phe o Trp por Tyr, y sustitución de Met, Ile o Leu por Val. Además, tal sustitución, delección, inserción, adición, inversión, o similar de residuos de aminoácido tal como se mencionó anteriormente incluye una mutación que se produce de manera natural debido a una diferencia individual, o una diferencia de especies del organismo a partir del cual se deriva el gen (mutante o variante).

35 Además, el gen que tiene una mutación conservadora de este tipo tal como se mencionó anteriormente puede ser un gen que codifica una proteína que muestra una homología del 80 % o más, preferiblemente del 90 % o más, más preferiblemente del 95 % o más, todavía más preferiblemente del 97 % o más, de manera particularmente preferible del 99 % o más, con respecto a la secuencia de aminoácidos total de cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente, y que tiene la función original. En esta memoria descriptiva, "homología" significa "identidad".

40 Además, el gen *acpP* o gen *fabF* puede ser un ADN que es capaz de hibridarse con un sonda que puede prepararse a partir de una secuencia génica conocida, tal como una secuencia complementaria a la totalidad o una parte de cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente (por ejemplo, secuencias de nucleótidos de las posiciones 211 a 447 de SEQ ID NO: 7, las posiciones 535 a 1776 de SEQ ID NO: 7, las posiciones 211 a 585 de SEQ ID NO: 10, o las posiciones 707 a 1912 de SEQ ID NO: 10), en condiciones rigurosas, y codifica una proteína que tiene la función original. Además, el operón *acpP-fabF* puede ser un ADN que es capaz de hibridarse con un sonda que puede prepararse a partir de una secuencia génica conocida, tal como una secuencia complementaria a la totalidad o una parte de cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente (por ejemplo, secuencia de nucleótidos total de SEQ ID NO: 7, secuencia de nucleótidos de las posiciones 211 a 1776 de SEQ ID NO: 7, secuencia de nucleótidos total de SEQ ID NO: 10, o secuencia de nucleótidos de las posiciones 211 a 1912 de SEQ ID NO: 10), en condiciones rigurosas, y codifica una proteína que tiene la función original. Las "condiciones rigurosas" se refieren a condiciones en las que se forma un denominado híbrido específico, y no se forma un híbrido inespecífico. Los ejemplos de las condiciones rigurosas incluyen aquellas en las que ADN muy homólogos se hibridan entre sí, por ejemplo, ADN de no menos del 80 % homólogos, preferiblemente no menos del 90 % homólogos, más preferiblemente no menos del 95 % homólogos, todavía más preferiblemente no menos del 97 % homólogos, de manera particularmente preferible no menos del 99 % homólogos, se hibridan entre sí, y ADN menos homólogos que los anteriores no se hibridan entre sí, o condiciones de lavado de hibridación de tipo Southern típica, es decir, condiciones de lavado una vez, preferiblemente 2 o 3 veces, a una concentración de sal y temperatura correspondiente a 1 x SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C, preferiblemente 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C, más preferiblemente 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % a 68 °C.

60 Tal como se describió anteriormente, la sonda usada para la hibridación mencionada anteriormente puede ser parte de una secuencia que es complementaria al gen mencionado anteriormente. Puede prepararse una sonda de este tipo mediante PCR usando oligonucleótidos preparados basándose en una secuencia génica conocida como cebadores y un fragmento de ADN que contiene cualquiera de las secuencias de nucleótidos como molde. Como sonda, por ejemplo, puede usarse un fragmento de ADN que tiene una longitud de aproximadamente 300 pb. Cuando se usa un fragmento de ADN que tiene una longitud de aproximadamente 300 pb como sonda, las

condiciones de lavado de la hibridación pueden ser, por ejemplo, 50 °C, 2 x SSC y SDS al 0,1 %.

Además, en el gen *acpP* o gen *fabF*, puede reemplazarse un codón arbitrario por un codón equivalente, siempre que el gen codifique para una proteína que tiene la función original. Por ejemplo, el gen *acpP* o gen *fabF* puede modificarse de modo que tiene codones óptimos según frecuencias de codones observadas en un huésped que va a usarse.

Las descripciones anteriores que se refieren a variantes de los genes y proteínas también pueden aplicarse *mutatis mutandis* a unas proteínas arbitrarias tales como enzimas de biosíntesis de L-aminoácidos y genes que codifican las mismas.

<1-3> Método para reducir la actividad de una proteína

A continuación, se explicarán métodos para reducir la actividad de una proteína tal como la proteína AcpP y la proteína FabF.

La expresión "la actividad de una proteína se reduce" significa que la actividad de la proteína por célula se disminuye en comparación con la de una cepa no modificada tal como una cepa de tipo natural o cepa progenitora, e incluye un estado en el que la actividad ha desaparecido completamente. Específicamente, la expresión "la actividad de una proteína se reduce" significa que el número de moléculas de la proteína por célula se reduce, y/o la función de cada molécula de la proteína se reduce en comparación con la de una cepa no modificada. Es decir, el término "actividad" en la expresión "la actividad de una proteína se reduce" no se limita a la actividad catalítica de la proteína, sino que puede significar la cantidad de transcripción de un gen (la cantidad de ARNm) que codifica la proteína o la cantidad de traducción de la proteína (la cantidad de la proteína). El estado que "el número de moléculas de la proteína por célula se reduce" incluye un estado en el que la proteína no existe para nada. El estado que "la función de cada molécula de la proteína se reduce" incluye un estado en el que la función de cada molécula de proteína desaparece completamente. Aunque el grado de reducción en la actividad de una proteína no está particularmente limitado siempre que la actividad se reduzca en comparación con la de una cepa no modificada, puede reducirse hasta, por ejemplo, el 90 % o menos, el 80 % o menos, el 70 % o menos, el 60 % o menos, el 55 % o menos, el 50 % o menos, el 30 % o menos, el 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, o el 0 % de la de una cepa no modificada.

La modificación para reducir la actividad de una proteína puede lograrse, por ejemplo, reduciendo la expresión de un gen que codifica la proteína. El estado que "la expresión de un gen se reduce" incluye un estado en el que el gen no se expresa para nada. El estado que "la expresión de un gen se reduce" también se denomina "la expresión de un gen se atenúa". La expresión de un gen puede reducirse hasta el 90 % o menos, el 80 % o menos, el 70 % o menos, el 60 % o menos, el 55 % o menos, el 50 % o menos, el 30 % o menos, el 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, o el 0 % de la de una cepa no modificada.

Además, se sabe que, por ejemplo, en *E. coli*, el gen *acpP* es indispensable (esencial). Por tanto, cuando la actividad de la proteína AcpP se reduce, la actividad de la proteína AcpP se hace permanecer hasta tal medida que, cuando la bacteria de la presente divulgación se cultiva en un medio, la bacteria de la presente divulgación puede proliferar, y se produzca un L-aminoácido objetivo. Es decir, la actividad de la proteína AcpP no se reducirá hasta el 0 % de la de una cepa no modificada. Por ejemplo, puede permanecer el 1 % o más, el 5 % o más, el 10 % o más, el 15 % o más, el 17 % o más, el 20 % o más, el 30 % o más, o el 50 % o más de la actividad de la proteína AcpP en comparación con la de una cepa no modificada. Específicamente, la actividad de la proteína AcpP también puede reducirse hasta, por ejemplo, del 1 % al 90 %, del 5 % al 80 %, del 10 % al 70 %, del 15 % al 60 %, o del 17 % al 55 % de la de una cepa no modificada. Además, la cantidad de expresión del gen *acpP* no se reducirá hasta el 0 % de la de una cepa no modificada. Por ejemplo, puede permanecer el 1 % o más, el 5 % o más, el 10 % o más, el 15 % o más, el 17 % o más, el 20 % o más, el 30 % o más, o el 50 % o más de la cantidad de expresión del gen *acpP* en comparación con la de una cepa no modificada. Específicamente, la cantidad de expresión del gen *acpP* también puede reducirse hasta, por ejemplo, del 1 % al 90 %, del 5 % al 80 %, del 10 % al 70 %, del 15 % al 60 %, o del 17 % al 55 % de la de una cepa no modificada. Tales descripciones que se refieren al caso en el que la actividad de la proteína AcpP se reduce también pueden aplicarse *mutatis mutandis* a un caso en el que la actividad de la proteína FabF se reduce.

La reducción en la expresión génica puede deberse a, por ejemplo, una reducción en la eficacia de transcripción, una reducción en la eficacia de traducción, o una combinación de las mismas. La expresión de un gen puede reducirse modificando una secuencia de control de la expresión del gen tal como un promotor, secuencia Shine-Dalgarno (SD) (también denominado sitio de unión a ribosomas (RBS)), y una región espaciadora entre RBS y el codón de inicio. Se sabe que la proteína AcpP es una proteína abundante en las células, y por tanto, se sugiere que promotor de tipo natural del gen *acpP* muestra una alta actividad (documento no de patente 1). Por tanto, la expresión del gen *acpP* puede reducirse, por ejemplo, reemplazando un promotor de tipo natural del gen *acpP* por un promotor que muestra una actividad más débil. Los ejemplos del promotor que muestra una actividad más débil que la del promotor de tipo natural del gen *acpP* incluyen, por ejemplo, el promotor lac y promotor P_{lac84} divulgados en la solicitud de patente rusa publicada n.º 2006/134574. Cuando se modifica una secuencia de control de la expresión, preferiblemente uno o más nucleótidos, más preferiblemente dos o más nucleótidos, de manera

particularmente preferible tres o más nucleótidos, de la secuencia de control de la expresión se modifican. Además, puede deleccionarse una parte o la totalidad de una secuencia de control de la expresión. La expresión de un gen también puede reducirse, por ejemplo, manipulando un factor responsable del control de la expresión. Los ejemplos del factor responsable del control de expresión incluyen moléculas pequeñas responsables del control de la transcripción o la traducción (inductores, inhibidores, etc.), proteínas responsables del control de la transcripción o la traducción (factores de transcripción etc.), ácidos nucleicos responsables del control de la transcripción o la traducción (ARNip etc.), y así sucesivamente. Además, la expresión de un gen también puede reducirse, por ejemplo, introduciendo una mutación que reduce la expresión del gen en la región codificante del gen. Por ejemplo, la expresión de un gen puede reducirse reemplazando un codón en la región codificante del gen por un codón sinónimo usado con menor frecuencia en un huésped. Además, por ejemplo, la expresión génica en sí puede reducirse mediante alteración de un gen tal como se describe a continuación.

El gen *acpP* y el gen *fabF* se transcriben conjuntamente como el operón *acpP-fabF*. El gen *fabF* también se transcribe independientemente con su propio promotor. Además, el gen *acpP* también puede transcribirse conjuntamente a partir del gen *fabD* y el gen *fabG* en la agrupación génica *yceD-rpmF-plsX-fabH-DG-acpP-fabF*. Por tanto, por ejemplo, modificando el promotor que controla la cotranscripción del operón *acpP-fabF*, puede reducirse la expresión total del gen *acpP* y gen *fabF*. Alternativamente, por ejemplo, modificando el propio promotor del gen *fabF*, la expresión del gen *fabF* puede reducirse independientemente. Además, por ejemplo, modificando el promotor del gen *fabD* y/o el *fabG*, la expresión del gen *acpP* puede reducirse junto con la expresión del gen *fabD* y/o el gen *fabG*. Además, por ejemplo, introduciendo una mutación que reduce la expresión de un gen en la región codificante del gen *acpP* y/o el gen *fabF*, la expresión del gen *acpP* y/o el gen *fabF* puede reducirse.

Además, los ejemplos específicos de la mutación que reduce la expresión el gen *acpP* y/o el gen *fabF* incluyen, por ejemplo, una mutación tal que la citosina (C) en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* se reemplaza por otra base. La otra base es preferiblemente adenina (A).

La "posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP*" a la que se hace referencia anteriormente significa la posición 34.^a en el lado en dirección 5' contada desde A del codón de inicio (ATG) del gen *acpP* en la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7. La posición de A del codón de inicio (ATG) se corresponde con la posición +1, y la posición al lado de esa posición en el lado en dirección 5' es la posición -1. Es decir, la "posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP*" significa una posición correspondiente a la posición 177 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7 (concretamente, la posición 1150804 de la secuencia genómica de la cepa *Escherichia coli* K-12 MG1655 registrada como registro de GenBank NC_000913). La "posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP*" representa una posición relativa basándose en la secuencia de SEQ ID NO: 7, y la posición absoluta puede desplazarse hacia delante o hacia atrás debido a deleción, inserción, adición, o similar de uno o más nucleótidos. Es decir, cuando un nucleótido se delecciona en la secuencia de SEQ ID NO: 7 entre el nucleótido de la posición 177 y A del codón de inicio, la "posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP*" significa la posición 33.^a en el lado en dirección 5' contada desde A del codón de inicio del gen *acpP*. Cuando se inserta un nucleótido en la secuencia de SEQ ID NO: 7 entre el nucleótido de la posición 177 y A del codón de inicio, la "posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP*" significa la posición 35.^a en el lado en dirección 5' contada desde A del codón de inicio del gen *acpP*.

Qué nucleótido se corresponde con el nucleótido de la "posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP*" puede determinarse en el operón *acpP-fabF* de una bacteria arbitraria, por ejemplo, alineando la secuencia en dirección 5' del gen *acpP* de la bacteria y la secuencia en dirección 5' del gen *acpP* mostrada como SEQ ID NO: 7. Tal alineación puede realizarse, por ejemplo, usando software de análisis génico conocido. Los ejemplos específicos de tal software incluyen DNASIS producido por Hitachi Solutions, GENETYX producido por Genetyx, y así sucesivamente (Elizabet C. Tiler *et al.*, Computers and Biomedical Research, 24 (1) 72-96, 1991; Barton GJ *et al.*, Journal of Molecular Biology, 198 (2), 327-37, 1987).

La modificación para reducir la actividad de una proteína también puede lograrse, por ejemplo, alterando un gen que codifica la proteína. La alteración de un gen puede lograrse, por ejemplo, deleccionando una parte o la totalidad de la región codificante del gen en un cromosoma. Además, puede deleccionarse la totalidad de un gen que incluye secuencias en dirección 5' y en dirección 3' del gen en un cromosoma. La región que va a deleccionarse puede ser cualquier región tal como una región de extremo N-terminal, una región interna, o una región de extremo C-terminal, siempre que la actividad de la proteína pueda reducirse. La deleción de una región más larga puede, habitualmente, inactivar más ciertamente el gen. Además, se prefiere que los marcos de lectura de las secuencias en dirección 5' y aguas debajo de la región que va a deleccionarse no sean iguales.

La alteración de un gen también puede lograrse, por ejemplo, introduciendo una mutación para una sustitución de aminoácidos (mutación de sentido alterado), un codón de terminación (mutación sin sentido), una mutación de desplazamiento de marco que añade o delecciona uno o dos residuos de nucleótido, o similar en la región codificante del gen 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, 26 116, 20833-20839 (1991)).

La alteración de un gen también puede lograrse, por ejemplo, insertando otra secuencia en una región codificante del gen en un cromosoma. El sitio de la inserción puede estar en cualquier región del gen, y la inserción de una región más larga puede, habitualmente, inactivar más ciertamente el gen. Se prefiere que los marcos de lectura de las secuencias en dirección 5' y en dirección 3' del sitio de inserción no sean iguales. La otra secuencia no está particularmente limitada siempre que se elija una secuencia que reduce o elimina la actividad de la proteína codificada, y los ejemplos de la misma incluyen, por ejemplo, un gen marcador tal como genes de resistencia a antibióticos, y un gen útil para la producción de la sustancia objetivo.

Tal modificación de un gen en un cromosoma tal como se describió anteriormente puede lograrse, por ejemplo, preparando un gen de tipo deficiente en el que una secuencia parcial del gen se elimina de modo que no puede producir una proteína que funciona normalmente, y transformando un huésped con un ADN recombinante que contiene el gen de tipo deficiente para provocar la recombinación de homólogos entre el gen de tipo deficiente y el gen de tipo natural en un cromosoma y sustituir de ese modo el gen de tipo deficiente por el gen de tipo natural en el cromosoma. En este procedimiento, si está contenido un gen marcador seleccionado según las características del huésped tal como auxotrofia en el ADN recombinante, la operación se vuelve sencilla. La proteína codificada por el gen de tipo deficiente tiene una conformación diferente de la de la proteína de tipo natural, incluso si se produce, y por tanto la función del mismo se reduce o se elimina. Tal alteración génica basada en la sustitución de genes usando recombinación de homólogos ya se ha establecido, y existen métodos de uso de un ADN lineal tal como un método denominado "integración impulsada por Red (*Red driven integration*)" (Datsenko, K.A, y Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645 (2000)), y un método que usa la integración impulsada por Red en combinación con un sistema de escisión derivado de fago λ (Cho, E.H., Gumpert, R.I., Gardner, J.F., J. Bacteriol., 184:5200-5203 (2002)) (remítase al documento WO2005/010175), un método de uso de un plásmido que tiene un origen de replicación sensible a la temperatura, un método de uso de un plásmido capaz de transferencia conjugativa, un método de uso de un vector suicida que no tiene un origen de replicación que funciona en un huésped (patente estadounidense n.º 6.303.383, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 05-007491), y así sucesivamente.

La modificación para reducir la actividad de una proteína también puede lograrse, por ejemplo, mediante un tratamiento de mutagénesis. Los ejemplos del tratamiento de mutagénesis incluyen irradiación de rayos X, irradiación ultravioleta, y un tratamiento con un agente de mutación tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), metanosulfonato de etilo (EMS) y metanosulfonato de metilo (MMS).

Cuando una proteína funciona como un complejo que consiste en una pluralidad de subunidades, puede modificarse una parte o la totalidad de la pluralidad de subunidades, siempre que la actividad de la proteína se reduzca eventualmente. Es decir, por ejemplo, puede alterarse una parte o la totalidad de una pluralidad de genes que codifican las subunidades respectivas o similar. Además, cuando hay una pluralidad de isozimas de una proteína, puede reducirse una parte o la totalidad de las actividades de la pluralidad de isozimas, siempre que la actividad de la proteína se reduzca eventualmente. Es decir, por ejemplo, puede alterarse una parte o la totalidad de una pluralidad de genes que codifican las isozimas respectivas o similar.

Puede confirmarse una reducción en la actividad de una proteína midiendo la actividad de la proteína.

También puede confirmarse una reducción en la actividad de una proteína confirmando una reducción en la expresión de un gen que codifica la proteína. Puede confirmarse una reducción en la expresión de un gen confirmando una reducción en la cantidad de transcripción del gen o una reducción en la cantidad de la proteína expresada del gen.

Puede confirmarse una reducción en la cantidad de transcripción de un gen comparando la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen con la observada en una cepa no modificada. Los ejemplos del método para evaluar la cantidad de ARNm incluyen hibridación de tipo Northern, RT-PCR, y así sucesivamente (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE. UU.), 2001). La cantidad de ARNm puede disminuirse hasta, por ejemplo, el 90 % o menos, el 80 % o menos, el 70 % o menos, el 60 % o menos, el 55 % o menos, el 50 % o menos, el 30 % o menos, el 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, o el 0 %, de la observada en una cepa no modificada. Sin embargo, la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen *acpP* no se reducirá hasta el 0 % de la de una cepa no modificada. Por ejemplo, cuando la expresión del gen *acpP* se reduce, el 1 % o más, el 5 % o más, el 10 % o más, el 15 % o más, el 17 % o más, el 20 % o más, el 30 % o más, o el 50 % o más de la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen también puede permanecer en comparación con la observada en una cepa no modificada. Específicamente, cuando la expresión del gen *acpP* se reduce, la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen *acpP* puede reducirse hasta, por ejemplo, del 1 % al 90 %, del 5 % al 80 %, del 10 % al 70 %, del 15 % al 60 %, o del 17 % al 55 % de la de una cepa no modificada.

Puede confirmarse una reducción en la cantidad de una proteína mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE. UU.) 2001). La cantidad de la proteína puede disminuirse hasta, por ejemplo, el 90 % o menos, el 80 % o menos, el 70 % o menos, el 60 % o menos, el 55 % o menos, el 50 % o menos, el 30 % o menos, el 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, o el 0 %, de la observada en una cepa no modificada. Sin embargo, la cantidad de la proteína AcpP

no se reducirá hasta el 0 % de la de una cepa no modificada. Por ejemplo, cuando la expresión del gen *acpP* se reduce, el 1 % o más, el 5 % o más, el 10 % o más, el 15 % o más, el 17 % o más, el 20 % o más, el 30 % o más, o el 50 % o más de la cantidad de la proteína AcpP también puede permanecer en comparación con la observada en una cepa no modificada. Específicamente, cuando la expresión del gen *acpP* se reduce, la cantidad de la proteína AcpP puede reducirse hasta, por ejemplo, del 1 % al 90 %, del 5 % al 80 %, del 10 % al 70 %, del 15 % al 60 %, o del 17 % al 55 % de la de una cepa no modificada.

La alteración de un gen puede confirmarse determinando la secuencia de nucleótidos de una parte o la totalidad del gen, mapa enzimático de restricción, longitud completa, o similar del gen según los medios usados para la alteración.

Los métodos mencionados anteriormente para reducir la actividad de una proteína pueden aplicarse a, además de la atenuación del operón *acpP-fabF*, reducción en la actividad de una proteína arbitraria tal como enzimas que catalizan una reacción que se ramifica de la ruta biosintética de un L-aminoácido objetivo para generar un compuesto distinto del L-aminoácido objetivo, y reducción en la expresión de un gen arbitrario tal como genes que codifican esas proteínas arbitrarias.

<1-4> Métodos para aumentar la actividad de una proteína

A continuación, se explicarán métodos para aumentar la actividad de una proteína.

La expresión "la actividad de una proteína se aumenta" significa que la actividad de la proteína por célula se aumenta en comparación con la de una cepa no modificada tal como una cepa de tipo natural y cepa progenitora. El estado que "la actividad de una proteína se aumenta" también se expresa como "la actividad de una proteína se potencia". Específicamente, la expresión "la actividad de una proteína se aumenta" significa que el número de moléculas de la proteína por célula se aumenta, y/o la función de cada molécula de la proteína se aumenta en comparación con las de una cepa no modificada. Es decir, el término "actividad" en la expresión "la actividad de una proteína se aumenta" no se limita a la actividad catalítica de la proteína, sino que puede significar la cantidad de transcripción de un gen (la cantidad de ARNm) que codifica la proteína, o la cantidad de traducción del gen (la cantidad de la proteína). Además, el estado que "la actividad de una proteína se aumenta" incluye no o un estado en el que la actividad de una proteína objetivo se aumenta en una cepa que tiene de manera inherente la actividad de la proteína objetivo, sino también un estado en el que la actividad de una proteína objetivo se imparte a una cepa que no tiene de manera inherente la actividad de la proteína objetivo. Además, siempre que la actividad de la proteína se aumente eventualmente, la actividad de la proteína objetivo contenida de manera inherente en un huésped puede reducirse o eliminarse, y entonces puede impartirse un tipo apropiado de la proteína a la misma.

Aunque el grado del aumento en la actividad de una proteína no está particularmente limitado siempre que la actividad de la proteína se aumente en comparación con una cepa no modificada, la actividad de la proteína puede aumentarse, por ejemplo, 1,5 veces o más, 2 veces o más, o 3 veces o más, en comparación con la de una cepa no modificada. Además, cuando la cepa no modificada no tiene la actividad de la proteína objetivo, es suficiente que la proteína se produzca introduciendo el gen que codifica la proteína, y por ejemplo, la proteína puede producirse hasta tal grado que actividad enzimática puede medirse.

La modificación que aumenta la actividad de una proteína se logra, por ejemplo, aumentando la expresión de un gen que codifica la proteína. El estado que "la expresión de un gen se aumenta" también se denomina "la expresión de un gen se potencia". La expresión de un gen puede aumentarse 1,5 veces o más, 2 veces o más, o 3 veces o más, en comparación con la observada en una cepa no modificada. Además, el estado que "la expresión de un gen se aumenta" incluye no o un estado en el que la cantidad de expresión de un gen diana se aumenta en una cepa que expresa de manera inherente el gen diana, sino también un estado en el que el gen se introduce en una cepa que no expresa de manera inherente el gen diana, y se expresa en la misma. Es decir, la frase "la expresión de un gen se aumenta" también significa, por ejemplo, que el gen diana se introduce en una cepa que no tiene el gen, y se expresa en la misma.

La expresión de un gen puede aumentarse, por ejemplo, aumentando el número de copias del gen.

El número de copias de un gen puede aumentarse introduciendo el gen en el cromosoma de un huésped. Un gen puede introducirse en un cromosoma, por ejemplo, usando recombinación de homólogos (Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory). Puede introducirse o una copia, o dos o más copias de un gen. Por ejemplo, realizando recombinación de homólogos usando una secuencia que está presente en múltiples copias en un cromosoma como diana, pueden introducirse múltiples copias de un gen en el cromosoma. Los ejemplos de una secuencia de este tipo que está presente en múltiples copias en un cromosoma incluyen ADN repetitivos, y repeticiones invertidas ubicadas en ambos extremos de un transposón. Alternativamente, puede realizarse recombinación de homólogos usando una secuencia apropiada en un cromosoma tal como un gen innecesario para la producción de la sustancia objetivo como diana. Puede realizarse recombinación de homólogos mediante, por ejemplo, un método de uso de un ADN lineal tal como integración impulsada por Red (Datsenko, K.A., y Wanner, B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6640-6645 (2000)), un método de uso de un plásmido que tiene un

origen de replicación sensible a la temperatura, un método de uso de un plásmido capaz de transferencia conjugativa, un método de uso de un vector suicida que no tiene un origen de replicación que funciona en un huésped, o un método de transducción usando un fago. Además, también puede introducirse aleatoriamente un gen en un cromosoma usando un transposón o Mini-Mu (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2-109985, patente estadounidense n.º 5.882.888, documento EP 805867 B1).

La introducción de un gen diana en un cromosoma puede confirmarse mediante hibridación de tipo Southern usando un sonda que tiene una secuencia complementaria a todo el gen o una parte del mismo, PCR usando cebadores preparados basándose en la secuencia del gen, o similar.

Además, el número de copias de un gen también puede aumentarse introduciendo un vector que contiene el gen en un huésped. Por ejemplo, el número de copias de un gen diana puede aumentarse ligando un fragmento de ADN que contiene el gen diana con un vector que funciona en un huésped para construir un vector de expresión del gen, y transformando el huésped con el vector de expresión. El fragmento de ADN que incluye el gen diana puede obtenerse mediante, por ejemplo, PCR usando el ADN genómico de un microorganismo que tiene el gen diana como molde. Como vector, puede usarse un vector replicable de manera autónoma en la célula del huésped. El vector es preferiblemente un vector multicopia. Además, el vector tiene preferiblemente un marcador tal como un gen de resistencia a antibióticos para la selección de un transformante. Además, el vector puede tener un promotor y/o terminador para expresar el gen introducido. El vector puede ser, por ejemplo, un vector derivado de un plásmido bacteriano, un vector derivado de un plásmido de levadura, un vector derivado de un bacteriófago, cósmido, fagómido, o similar. Los ejemplos específicos de vector replicable de manera autónoma en bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia coli* incluyen, por ejemplo, pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, pBR322, pSTV29 (todos estos están disponibles de Takara Bio), pACYC184, pMW219 (NIPPON GENE), pTrc99A (Pharmacia), vectores de la serie pPROK (Clontech), pKK233-2 (Clontech), vectores de la serie pET (Novagen), vectores de la serie pQE (QIAGEN), y vector de amplia variedad de huéspedes RSF1010.

Cuando se introduce un gen, es suficiente que el gen esté expresamente albergado por la bacteria de la presente divulgación. Específicamente, es suficiente que el gen se introduzca de modo que se expresa bajo el control mediante una secuencia de promotor que funciona en la bacteria de la presente divulgación. El promotor puede ser un promotor derivado del huésped, o un promotor heterogéneo. El promotor puede ser el promotor nativo del gen que va a introducirse, o un promotor de otro gen. Como promotor, por ejemplo, también puede usarse un promotor más fuerte de este tipo tal como se menciona a continuación. Además, por ejemplo, puede ubicarse un terminador para la terminación de la transcripción génica en dirección 3' del gen. El terminador no está particularmente limitado siempre que funcione en la bacteria de la presente divulgación. El terminador puede ser un terminador derivado del huésped, o un terminador heterogéneo. El terminador puede ser el terminador nativo del gen que va a introducirse, o un terminador de otro gen. Los ejemplos específicos de terminador incluyen, por ejemplo, terminador T7, terminador T4, terminador de fago fd, terminador tet y terminador *trpA*. Se divulgan en detalle vectores, promotores y terminadores disponibles en diversos microorganismos en "Fundamental Microbiology vol. 8, Genetic Engineering, KYORITSU SHUPPAN CO., LTD, 1987", y pueden usarse.

Además, cuando se introducen dos o más de genes, es suficiente que los genes estén expresamente albergados cada uno por la bacteria de la presente divulgación. Por ejemplo, todos los genes pueden llevarse por un único vector de expresión o cromosoma. Además, los genes pueden llevarse por separado por dos o más vectores de expresión, o llevarse por separado por un único o dos o más vectores de expresión y un cromosoma. También puede usarse un operón constituido por dos o más genes.

El gen que va a introducirse no está particularmente limitado siempre que codifique para una proteína que funciona en el huésped. El gen que va a introducirse puede ser un gen derivado del huésped, o puede ser un gen heterogéneo. El gen que va a introducirse puede obtenerse mediante, por ejemplo, PCR usando cebadores diseñados basándose en la secuencia de nucleótidos del gen y el ADN genómico de un organismo que tiene el gen o un plásmido que porta el gen como molde. El gen que va a introducirse también puede sintetizarse totalmente, por ejemplo, basándose en la secuencia de nucleótidos del gen (Gene, 60(1), 115-127 (1987)).

Además, cuando una proteína funciona como un complejo que consiste en una pluralidad de subunidades, puede modificarse una parte o la totalidad de la pluralidad de subunidades, siempre que la actividad de la proteína se aumente eventualmente. Es decir, por ejemplo, cuando la actividad de una proteína se aumenta aumentando la expresión de un gen, la expresión de una parte o la totalidad de la pluralidad de genes que codifican las subunidades puede potenciarse. Es habitualmente preferible potenciar la expresión de toda la pluralidad de genes que codifican las subunidades. Además, las subunidades que constituyen el complejo pueden derivarse de un único tipo de organismo o dos o más tipos de organismos, siempre que el complejo tenga una función de la proteína objetivo. Es decir, por ejemplo, pueden introducirse genes del mismo organismo que codifica una pluralidad de subunidades en un huésped, o pueden introducirse genes de organismos diferentes que codifican una pluralidad de subunidades en un huésped.

Además, la expresión de un gen puede aumentarse mejorando la eficacia de transcripción del gen. La eficacia de transcripción de un gen puede mejorarse, por ejemplo, reemplazando el promotor del gen en un cromosoma por un

promotor más fuerte. El “promotor más fuerte” significa un promotor que proporciona una transcripción mejorada de un gen en comparación con un promotor de tipo natural que existe de manera inherente del gen. Los ejemplos de promotores más fuertes incluyen, por ejemplo, los promotores de alta expresión conocidos tales como promotor T7, promotor trp, promotor lac, promotor tac, promotor thr, promotor trc, promotor tet, promotor araBAD, promotor rpoH, promotor PR y promotor PL. Además, como promotor más fuerte, también puede obtenerse un tipo muy activo de un promotor existente usando diversos genes indicadores. Por ejemplo, haciendo que las regiones -35 y -10 en una región de promotor estén más próximas a la secuencia de consenso, la actividad del promotor puede potenciarse (documento WO00/18935). Los ejemplos de promotor de tipo muy activo incluyen diversos promotores similares a tac (Katashkina JI *et al.*, solicitud de patente de la Federación Rusa n.º 2006134574) y promotor pnp8 (documento WO2010/027045). Se describen métodos para evaluar la fuerza de promotores y ejemplos de promotores fuertes en el artículo de Goldstein *et al.* (Prokaryotic Promoters in Biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)), y así sucesivamente.

Además, la expresión de un gen también puede aumentarse mejorando la eficacia de traducción del gen. La eficacia de traducción de un gen puede mejorarse, por ejemplo, reemplazando la secuencia Shine-Dalgarno (SD) (también denominada sitio de unión a ribosomas (RBS)) por el gen en un cromosoma con una secuencia SD más fuerte. La “secuencia SD más fuerte” significa una secuencia SD que proporciona una traducción mejorada de ARNm en comparación con la secuencia SD de tipo natural que existe de manera inherente del gen. Los ejemplos de secuencia SD más fuertes incluyen, por ejemplo, RBS del gen *10* derivado de fago T7 (Olins P.O. *et al.*, Gene, 1988, 73, 227-235). Además, se sabe que la sustitución, inserción, o delección de varios nucleótidos en una región espaciadora entre RBS y el codón de inicio, especialmente en una secuencia inmediatamente en dirección 5' del codón de inicio (5'-UTR), afecta significativamente a la estabilidad y eficacia de traducción de ARNm, y por tanto, la eficacia de traducción de un gen también puede mejorarse modificándolas.

En la presente invención, sitios que afectan a la expresión génica, tales como un promotor, secuencia SD y región espaciadora entre RBS y el codón de inicio, también se denominan conjuntamente “región de control de la expresión”. Una región de control de la expresión puede identificarse usando un software de búsqueda de vector de promotor o análisis génico tal como GENETYX. Una región de control de la expresión de este tipo puede modificarse mediante, por ejemplo, un método de uso de un vector sensible a la temperatura o el método de integración impulsada por Red (documento WO2005/010175).

La eficacia de traducción de un gen también puede mejorarse, por ejemplo, modificando codones. En *Escherichia coli* etc., existe un sesgo de codón claro entre los 61 codones de aminoácidos encontrados dentro de la población de moléculas de ARNm, y el nivel de ARNt relacionado aparece directamente proporcional a la frecuencia de uso de codón (Kane, J.F., Curr. Opin. Biotechnol., 6 (5), 494-500 (1995)). Es decir, si hay una gran cantidad de ARNm que contiene una cantidad en exceso de codones raros, puede surgir un problema de traducción. Según las últimas investigaciones, se sugiere que agrupaciones de codones AGG/AGA, CUA, AUA, CGA o CCC puedan reducir especialmente tanto la cantidad como la calidad de una proteína sintetizada. Se produce un problema de este tipo especialmente en el momento de expresión de un gen heterólogo. Por tanto, en el caso de expresión heterogénea de un gen o similar, la eficacia de traducción del gen puede mejorarse reemplazando un codón raro presente en el gen con un codón sinónimo usado con mayor frecuencia. Los codones pueden reemplazarse por, por ejemplo, el método de mutación específica del sitio para introducir una mutación objetivo en un sitio objetivo de ADN. Los ejemplos del método de mutación específica del sitio incluyen el método que usa PCR (Higuchi, R., 61, en PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press (1989); Carter, P., Met. in Enzymol., 154, 382 (1987)), y el método que usa fago (Kramer, W. y Frits, H.J., Met. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T.A. *et al.*, Met. in Enzymol., 154, 367 (1987)). Alternativamente, puede sintetizarse totalmente un fragmento génico en el que codones objetivos se reemplazan. Se divulgan las frecuencias de codones en diversos organismos en la “base de datos de uso de codones” (<http://www.kazusa.or.jp/codon>; Nakamura, Y. *et al.*, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)).

Además, la expresión de un gen también puede aumentarse amplificando un regulador que aumenta la expresión del gen, o delecionando o atenuando un regulador que reduce la expresión del gen.

Tales métodos para aumentar la expresión génica tal como se mencionó anteriormente pueden usarse independientemente o en una combinación arbitraria.

Además, la modificación que aumenta la actividad de una proteína también puede lograrse, por ejemplo, potenciando la actividad específica de la enzima. La potenciación de la actividad específica también incluye reducción o eliminación de inhibición de retroalimentación. Puede obtenerse una proteína que muestra una actividad específica potenciada, por ejemplo, buscando diversos organismos. Además, un tipo muy activo de una proteína existente también puede obtenerse introduciendo una mutación en la proteína existente. La mutación que va a introducirse puede ser, por ejemplo, sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios residuos de aminoácido en una o varias posiciones de la proteína. La mutación puede introducirse mediante, por ejemplo, un método de mutación específica del sitio de este tipo tal como se mencionó anteriormente. La mutación también puede introducirse mediante, por ejemplo, un tratamiento de mutagénesis. Los ejemplos del tratamiento de mutagénesis incluyen irradiación de rayos X, irradiación de ultravioleta, y un tratamiento con un agente de mutación tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), metanosulfonato de etilo (EMS) y metanosulfonato de metilo

(MMS). Además, puede inducirse una mutación aleatoria tratando directamente ADN *in vitro* con hidroxilamina. La potenciación de la actividad específica puede usarse independientemente, o puede usarse en una combinación arbitraria con tales métodos para potenciar la expresión génica tal como se mencionó anteriormente.

5 El método para la transformación no está particularmente limitado, y pueden usarse métodos convencionalmente conocidos. Puede usarse, por ejemplo, un método de tratamiento de células receptoras con cloruro de calcio para aumentar la permeabilidad de las mismas para ADN, que se ha notificado para la cepa *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. y Higa, A., J. Mol. Biol., 1970, 53, 159-162), y un método de preparación de células competentes a partir de células que están en la fase de crecimiento, seguido por transformación con ADN, que se ha notificado para *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H., Wilson, G.A. y Young, F.E., Gene, 1977, 1:153-167). Alternativamente, también puede usarse un método de elaborar células receptoras de ADN en protoplastos o esferoplastos, que puede tomar fácilmente ADN recombinante, seguido por introducir un ADN recombinante en las células receptoras de ADN, que se sabe que es aplicable a *Bacillus subtilis*, actinomicetos y levaduras (Chang, S. y Choen, S.N., 1979, Mol. Gen. Genet., 168:111-115; Bibb, M.J., Ward, J.M. y Hopwood, O.A., 1978, Nature, 274:398-400; Hinnen, A., Hicks, J.B. y Fink, G.R., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929-1933). Además, también puede usarse el método de pulso eléctrico notificado para bacterias corineformes (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2-207791).

20 Un aumento en la actividad de una proteína puede confirmarse midiendo la actividad de la proteína.

Un aumento en la actividad de una proteína también puede confirmarse confirmando un aumento en la expresión de un gen que codifica la proteína. Un aumento en la expresión de un gen puede confirmarse confirmando un aumento en la cantidad de transcripción del gen, o confirmando un aumento en la cantidad de una proteína expresada del gen.

25 Un aumento de la cantidad de transcripción de un gen puede confirmarse comparando la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen con la observada en una cepa no modificada tal como una cepa de tipo natural o cepa progenitora. Los ejemplos del método para evaluar la cantidad de ARNm incluyen hibridación de tipo Northern, RT-PCR, y así sucesivamente (Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual/tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE. UU.), 2001). La cantidad de ARNm puede aumentar, por ejemplo, 1,5 veces o más, 2 veces o más, o 3 veces o más, en comparación con la de una cepa no modificada.

30 Un aumento en la cantidad de una proteína puede confirmarse mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE. UU.), 2001). La cantidad de la proteína puede aumentar, por ejemplo, 1,5 veces o más, 2 veces o más, o 3 veces o más, en comparación con la de una cepa no modificada.

40 Los métodos mencionados anteriormente para aumentar la actividad de una proteína pueden aplicarse a la potenciación de la actividad de una proteína arbitraria tal como enzimas de biosíntesis de L-aminoácido, y potenciación de la expresión de un gen arbitrario tal como genes que codifican las proteínas arbitrarias.

<2> Método para producir L-aminoácido de la presente invención

45 El método de la presente invención es un método para producir un L-aminoácido que comprende cultivar la bacteria de la presente divulgación en un medio para producir y acumular el L-aminoácido en el medio o células de la bacteria, y recoger el L-aminoácido del medio o las células tal como se especifica mediante las reivindicaciones. En la presente invención, puede producirse un único tipo de L-aminoácido, o pueden producirse dos o más tipos de L-aminoácidos.

50 El medio que va a usarse no está particularmente limitado, siempre que la bacteria de la presente divulgación pueda proliferar en él, y puede producirse un L-aminoácido objetivo. Como medio, por ejemplo, puede usarse un medio habitual usado para cultivo de microorganismos tales como bacterias. El medio puede contener una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, fuente de fósforo y fuente de azufre, así como componentes seleccionados de otros diversos componentes orgánicos y componentes inorgánicos, según se requiera. Los tipos y concentraciones de los componentes del medio pueden establecerse adecuadamente según diversas condiciones tales como el tipo de la bacteria que va a usarse, y el tipo del L-aminoácido que va a producirse.

60 La fuente de carbono no está particularmente limitada, siempre que la bacteria de la presente divulgación pueda utilizar la fuente de carbono elegida y producir un L-aminoácido. Los ejemplos específicos de la fuente de carbono incluyen, por ejemplo, sacáridos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa, xilosa, arabinosa, melaza negra, hidrolisados de almidón e hidrolisados de biomasa, ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido málico, alcoholes tales como glicerol, glicerol en bruto y etanol, y ácidos grasos. Como fuente de carbono, puede usarse un único tipo de fuente de carbono, o pueden usarse dos o más tipos de fuentes de carbono en combinación.

65 La concentración de la fuente de carbono en el medio no está particularmente limitada, siempre que la bacteria de la

5 presente divulgación pueda proliferar, y se produzca un L-aminoácido. Es preferible hacer la concentración de la fuente de carbono en el medio lo más alta posible en tal intervalo que la producción de L-aminoácido no se inhiba. La concentración inicial de la fuente de carbono en el medio puede estar habitualmente en el intervalo del 5 al 30 % (p/v), preferiblemente del 10 al 20 % (p/v). Además, según el consumo de la fuente de carbono que acompaña el avance de la fermentación, la fuente de carbono puede añadirse de manera complementaria.

10 Los ejemplos específicos de la fuente de nitrógeno incluyen, por ejemplo, sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio y fosfato de amonio, fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levaduras, extracto de carne y productos de descomposición de proteína de soja, amoniaco y urea. También pueden usarse gas amoniaco o amoniaco acuoso usados para el ajuste del pH como fuente de nitrógeno. Como fuente de nitrógeno, puede usarse un único tipo de fuente de nitrógeno, o pueden usarse dos o más tipos de fuentes de nitrógeno en combinación.

15 Los ejemplos específicos de la fuente de fosfato incluyen, por ejemplo, sales de ácido fosfórico tales como dihidrogenofosfato de potasio e hidrogenofosfato de dipotasio y polímeros de ácido fosfórico tales como ácido pirofosfórico. Como fuente de fosfato, puede usarse un único tipo de fuente de fosfato, o pueden usarse dos o más tipos de fuentes de fosfato en combinación.

20 Los ejemplos específicos de la fuente de azufre incluyen, por ejemplo, compuestos de azufre inorgánicos tales como sulfatos, tiosulfatos y sulfitos, y aminoácidos que contienen azufre tales como cisteína, cistina y glutatión. Como fuente de azufre, puede usarse un único tipo de fuente de azufre, o pueden usarse dos o más tipos de fuentes de azufre en combinación.

25 Los ejemplos específicos de otros diversos componentes orgánicos y componentes inorgánicos incluyen, por ejemplo, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio y cloruro de potasio; metales traza tales como hierro, manganeso, magnesio y calcio; vitaminas tales como vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, ácido nicotínico, nicotinamida y vitamina B12; aminoácidos; ácidos nucleicos; y componentes orgánicos que contienen aquellos tales como peptona, casaminoácido, extracto de levadura, y producto de descomposición de proteína de soja. Como otros diversos componentes orgánicos y componentes inorgánicos, puede usarse un único tipo de componente, o pueden usarse dos o más tipos de componentes en combinación.

35 Además, cuando se usa un mutante auxotrófico que requiere un aminoácido o similar para el crecimiento del mismo, es preferible complementar un nutriente requerido al medio. Por ejemplo, en muchas de las bacterias productoras de L-lisina, la ruta biosintética de L-lisina se potencia y la capacidad de degradación de L-lisina se atenúa. Por tanto, cuando se cultiva una bacteria productora de L-lisina de este tipo, por ejemplo, uno o más tipos de aminoácidos seleccionados de L-treonina, L-homoserina, L-isooleucina y L-metionina se añaden preferiblemente al medio.

40 Además, es preferible también añadir una cantidad apropiada de un antiespumante comercialmente disponible al medio, con el fin de suprimir la formación de espuma durante el cultivo.

45 Las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas siempre que la bacteria de la presente divulgación puede proliferar, y se produzca un L-aminoácido. El cultivo puede realizarse, por ejemplo, en condiciones habituales usadas para cultivar microorganismos tales como bacterias. Las condiciones de cultivo pueden establecerse apropiadamente según diversas condiciones tales como el tipo de bacteria que va a usarse, y el tipo de L-aminoácido que va a producirse.

50 El cultivo puede realizarse usando un medio líquido. Para el cultivo, la bacteria de la presente divulgación cultivada sobre un medio sólido tal como medio de agar puede inocularse directamente en un medio líquido, o la bacteria de la presente divulgación cultivada en un medio líquido como cultivo de siembra puede inocularse en un medio líquido para el cultivo principal. Es decir, el cultivo puede realizarse como cultivo de siembra diferenciado y cultivo principal. La cantidad de la bacteria de la presente divulgación contenida en el medio en el momento del inicio del cultivo no está particularmente limitada. Por ejemplo, puede añadirse cultivo de siembra que muestra una DO600 de 4 a 8 al medio para el cultivo principal en una cantidad del 0,1 al 30 % en masa, preferiblemente del 1 al 10 % en masa, en el momento del inicio del cultivo.

55 El cultivo puede realizarse como cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo, cultivo continuo, o una combinación de estos. Además, cuando el cultivo se realiza como cultivo de siembra diferenciado y cultivo principal, las condiciones de cultivo del cultivo de siembra y el cultivo principal pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, tanto el cultivo de siembra como el cultivo principal pueden realizarse como cultivo discontinuo. Alternativamente, por ejemplo, el cultivo de siembra puede realizarse como cultivo discontinuo, y el cultivo principal puede realizarse como cultivo semicontinuo o cultivo continuo.

60 El cultivo puede, por ejemplo, realizarse de manera aerobia. Por ejemplo, el cultivo puede realizarse como cultivo de aireación o cultivo de agitación. La concentración de oxígeno puede controlarse para que sea, por ejemplo, del 5 al 50 %, preferiblemente de manera aproximada del 10 %, de la concentración saturada de oxígeno. El pH del medio puede ser, por ejemplo, de 3 a 10, preferiblemente de 4,0 a 9,5. El pH del medio puede ajustarse según se requiera

durante el cultivo. El pH del medio puede ajustarse usando diversas sustancias alcalinas y ácidas tales como gas amoníaco, amoníaco acuoso, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de magnesio, hidróxido de sodio, hidróxido de calcio e hidróxido de magnesio. La temperatura del cultivo puede ser, por ejemplo, de 20 °C a 45 °C, preferiblemente de 25 °C a 37 °C. El tiempo de cultivo puede ser, por ejemplo, de 1 hora o más, 4 horas o más, 10 horas o más, o 15 horas o más, y puede ser de 168 horas o menos, 120 horas o menos, 90 horas o menos, o 72 horas o menos. Específicamente, el periodo de cultivo puede ser, por ejemplo, de 10 a 120 horas. El cultivo puede continuarse, por ejemplo, hasta que la fuente de carbono contenida en el medio se consuma, o hasta que la actividad de la bacteria por la presente divulgación se pierda. Cultivando la bacteria de la presente divulgación en tales condiciones, un L-aminoácido se acumula en las células y/o el medio.

Además, cuando se produce ácido L-glutámico, el cultivo puede realizarse mientras se precipita ácido L-glutámico en el medio usando un medio líquido ajustado para satisfacer una condición en la que precipita ácido L-glutámico. Los ejemplos de la condición en la que precipita ácido L-glutámico incluyen, por ejemplo, pH de 5,0 a 3,0, preferiblemente pH de 4,9 a 3,5, más preferiblemente pH de 4,9 a 4,0, de manera particularmente preferible aproximadamente pH 4,7 (patente europea abierta a consulta por el público n.º 1078989). El periodo total o periodo parcial del cultivo puede realizarse al pH mencionado anteriormente. El "periodo parcial" puede ser, por ejemplo, del 50 % o más, del 70 % o más, del 80 % o más, del 90 % o más, del 95 % o más, o del 99 % o más, del periodo total del cultivo.

Cuando se produce un aminoácido básico tal como L-lisina, puede emplearse un método en el que el aminoácido básico se produce mediante fermentación usando iones bicarbonato y/o iones carbonato como contraiones principales para el aminoácido básico (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2002-65287, solicitud publicada de patente estadounidense n.º 20020025564, documento EP 1813677 A). Mediante un método de este tipo, puede producirse un aminoácido básico mientras se reduce(n) la(s) cantidad(es) de iones sulfato y/o iones cloruro que van a usarse, que se han usado convencionalmente como contraiones para un aminoácido básico.

La producción del L-aminoácido puede confirmarse mediante métodos conocidos usados para la detección o identificación de compuestos. Los ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, HPLC, CL/EM, CG/EM y RMN. Estos métodos pueden usarse en una combinación apropiada.

El L-aminoácido producido puede recogerse mediante métodos conocidos usados para la separación y purificación de compuestos. Los ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, método de resina de intercambio iónico, método de tratamiento de membrana, método de precipitación y método de cristalización. Estos métodos pueden usarse en una combinación apropiada. Cuando el L-aminoácido se acumula en células, las células pueden alterarse con, por ejemplo, ondas ultrasónicas o similares, y entonces el L-aminoácido puede recogerse mediante el método de resina de intercambio iónico o similar a partir del sobrenadante obtenido retirando las células de la suspensión de células alterada mediante centrifugación. El L-aminoácido que va a recogerse puede ser un compuesto libre, una sal del mismo, o una mezcla del mismo. Los ejemplos de la sal incluyen, por ejemplo, sulfato, clorhidrato, carbonato, sal de amonio, sal de sodio y sal de potasio. L-lisina puede ser, por ejemplo, L-lisina en una forma libre, la sal de clorhidrato de L-lisina, la sal de carbonato de L-lisina, o una mezcla de los mismos. Además, el ácido L-glutámico puede ser, por ejemplo, ácido L-glutámico en una forma libre, L-glutamato de monosodio (MSG), L-glutamato de monoamonio, o una mezcla de los mismos.

Además, cuando el L-aminoácido precipita en el medio, puede recogerse mediante centrifugación, filtración o similar. El L-aminoácido precipitado en el medio y el L-aminoácido disuelto en el medio pueden aislarse juntos después de que el L-aminoácido disuelto en el medio se cristalice.

El L-aminoácido recogido puede contener, por ejemplo, células bacterianas, componentes del medio, humedad y metabolitos subproducto de la bacteria, además del L-aminoácido. La pureza del L-aminoácido recogido puede ser, por ejemplo, del 30 % (p/p) o más, el 50 % (p/p) o más, el 70 % (p/p) o más, el 80 % (p/p) o más, el 90 % (p/p) o más, o el 95 % (p/p) o más (documentos JP1214636B, USP5.431.933, USP4.956.471, USP4.777.051, USP4.946.654, USP5.840.358, USP6.238.714, US2005/0025878).

Una realización del método de la presente invención puede ser un método para producir L-lisina que comprende: cultivar *Escherichia coli* que tiene capacidad de producción de L-lisina en un medio para producir y acumular L-lisina en el medio o células de la *Escherichia coli*; y recoger L-lisina del medio o las células, en el que la expresión de un gen del operón *acpP-fabF* se ha atenuado en comparación con una cepa no modificada en la *Escherichia coli* modificando una secuencia de control de la expresión del gen. Una realización del método de la presente invención puede ser también un método para producir L-lisina que comprende: cultivar *Escherichia coli* que tiene capacidad de producción de L-lisina en un medio para producir y acumular L-lisina en el medio o células de la *Escherichia coli*; y recoger L-lisina del medio o las células, en el que la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* se ha reemplazado por otra base en la *Escherichia coli*, en el que la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* es una posición correspondiente a la posición 177 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7. Una realización del método de la presente invención puede ser también un método para producir L-lisina que comprende: cultivar *Escherichia coli* que tiene capacidad de producción de L-lisina en un medio para producir y acumular L-lisina en el medio o células de la *Escherichia coli*; y

recoger L-lisina del medio o las células, en el que la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* se ha reemplazado por adenina en la *Escherichia coli*, en el que la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* es una posición correspondiente a la posición 177 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7. Las descripciones mencionadas anteriormente que se refieren a la bacteria de la presente divulgación y el método de la presente invención pueden aplicarse *mutatis mutandis* a estas realizaciones.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se explicará más específicamente con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1: Construcción de bacteria productora de L-lisina que muestra expresión reducida de genes *acpP* y *fabF* (1)

Como bacteria productora de L-lisina, se usó la cepa *E. coli* WC196 Δ cadA Δ ldc (FERM BP-11027, documento WO2010/061890, en adelante denominada cepa WC196LC). Se introdujo una mutación puntual en dirección 5' del operón *acpP-fabF* que consiste en los genes *acpP* y *fabF* de la cepa usando el método denominado "integración impulsada por Red", que se desarrolló por primera vez por Datsenko y Wanner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, n.º 12, págs. 6640-6645). Según este método, puede construirse una cepa a la que se le ha introducido mutación en una etapa usando un producto de PCR obtenido usando oligonucleótidos sintéticos en los que una secuencia correspondiente a un gen diana se diseña en el lado de extremo 5', y una secuencia correspondiente a un gen de resistencia a antibióticos se diseña en el lado de extremo 3'. El procedimiento se muestra a continuación.

Se realizó PCR usando el ADN cromosómico de la cepa *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076) como molde, y los oligonucleótidos sintéticos mostrados como SEQ ID NO: 1 y 2 como cebadores. El cebador de SEQ ID NO: 1 tiene una secuencia correspondiente a la secuencia alrededor del sitio *BglII* del plásmido pMW118 (λ attL-Km^r- λ attR) (documento WO2006/093322) en el extremo 5' del cebador, y una secuencia correspondiente a una parte de secuencia en dirección 5' del gen *acpP* en el extremo 3' del cebador. El cebador de SEQ ID NO: 2 tiene una secuencia correspondiente a la secuencia alrededor del sitio *BglII* del plásmido pMW118 (λ attL-Km^r- λ attR) (documento WO2006/093322) en el extremo 5' del cebador, y una secuencia correspondiente a una parte de secuencia en dirección 3' del gen *fabF* en el extremo 3' del cebador. Se ligó el fragmento de ADN obtenido con el vector pMW118 (λ attL-Km^r- λ attR) tratado con la enzima de restricción *BglII* usando el kit de clonación In-Fusion HD (TAKARA BIO). Se transformó la cepa *E. coli* JM109 usando la mezcla de reacción In-Fusion. Se seleccionó un transformante sobre un medio de L-agar que contenía 50 mg/l de kanamicina. Se extrajo un plásmido del transformante, y se confirmó inserción del fragmento diana. Este plásmido se designó pMW118 (λ attL-Km^r- λ attR)-*acpP-fabF*.

Usando pMW118 (λ attL-Km^r- λ attR)-*acpP-fabF* como molde, los oligonucleótidos sintéticos mostrados como SEQ ID NO: 3 y 4 como cebadores, y kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Agilent Technologies), se construyó un plásmido introducido con una mutación puntual. Esta mutación reemplaza la citosina ubicada 34 bases en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* por adenina. Este plásmido se designó pMW118 (λ attL-Km^r- λ attR)-*acpP^{*}-fabF*.

Se realizó PCR usando pMW118 (λ attL-Km^r- λ attR)-*acpP^{*}-fabF* como molde, y los oligonucleótidos sintéticos mostrados como SEQ ID NO: 5 y 6 como cebadores. Se construyó la cepa WC196LC*acpP^{*}* a partir de la cepa *E. coli* WC196LC usando el fragmento de ADN obtenido según el método λ -Red descrito en la solicitud publicada de patente estadounidense n.º 2006/0160191 y el documento WO2005/010175. En la cepa WC196LC*acpP^{*}*, la citosina ubicada 34 bases en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* se reemplaza por adenina. En el método λ -red, se obtuvo un recombinante resistente a kanamicina realizando cultivo en placa sobre un medio de L-agar que contenía 50 mg/l de kanamicina a 37 °C, y seleccionando un recombinante resistente a kanamicina.

Se transformó la cepa WC196LC*acpP^{*}* con el plásmido pCABD2 (patente estadounidense n.º 6.040.160), y se seleccionó un transformante sobre el medio de L-agar que contenía 20 mg/l de estreptomina, para obtener la cepa WC196LC*acpP^{*}/pCABD2*. El plásmido pCABD2 contiene un gen *dapA* mutante derivado de *Escherichia coli* y que codifica una dihidrodipicolinato sintasa (DDPS) que tiene una mutación para desensibilización a inhibición de retroalimentación por L-lisina, un gen *lysC* mutante derivado de *Escherichia coli* y que codifica una aspartocinasa III que tiene una mutación para desensibilización a inhibición de retroalimentación por L-lisina, el gen *dapB* derivado de *Escherichia coli* y que codifica dihidrodipicolinato reductasa, y el gen *dhh* derivado de *Brevibacterium lactofermentum* y que codifica diaminopimelato deshidrogenasa.

Ejemplo 2: Cultivo de producción de L-Lisina (1)

Se realizó cultivo de producción de L-Lisina usando la cepa WC196LC*acpP^{*}/pCABD2* preparada. Se cultivó la cepa sobre el medio L que contenía 20 mg/l de estreptomina a 37 °C hasta que la DO600 se volvió de aproximadamente 0,6, y se añadió una disolución de glicerol al 40 % en un volumen igual al volumen del medio de cultivo, y se agitó la

mezcla. Entonces, se dividió la mezcla en volúmenes apropiados, y se almacenó a -80 °C como reserva de glicerol.

Se aplicó uniformemente la reserva de glicerol de la cepa WC196LCacpP*/pCABD2 al medio de L-agar que contenía 20 mg/l de estreptomina, y se cultivó a 37 °C durante 24 horas. La cepa WC196LC/pCABD2, que es una cepa de control obtenida introduciendo pCABD2 en la cepa WC196LC, se cultivó de manera similar sobre el medio de L-agar que contenía 20 mg/l de estreptomina. Se suspendieron las células hechas crecer en 3,0 ml del medio de producción de L-lisina (medio MS-Glc) mostrado en la tabla 1, y se diluyó la suspensión obtenida con el mismo medio de modo que la DO600 de la suspensión se volvió 15. Se inoculó la suspensión diluida obtenida en un volumen de 1,0 ml en 19 ml del medio de producción de L-lisina que contiene 20 mg/l de estreptomina y se contuvo en un matraz Sakaguchi de 500 ml de volumen, y se realizó el cultivo a 37 °C usando un aparato de cultivo de agitación recíproco. Cuarenta y ocho horas después del inicio del cultivo, se cuantificaron las cantidades de glucosa residual y L-lisina producida.

[Tabla 1]

Tabla 1: medio de producción de L-lisina (medio MS-Glc)

Glucosa	40,0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	24 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/l
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,008 g/l
Extracto de levadura	2,0 g/l
CaCO ₃ (farmacopea japonesa)	30 g/l

Se ajustó el medio a pH 7,0 con KOH, y se sometió a autoclave a 115 °C durante 10 minutos, siempre que la glucosa y MgSO₄·7H₂O se sometieron a autoclave por separado de los demás componentes. Se añadió CaCO₃ después de esterilización por aire caliente.

Las concentraciones de glucosa residual y concentraciones de acumulación de L-lisina obtenidas tras 48 horas de cultivo se muestran en la tabla 2. En comparación con la cepa de control WC196LC/pCABD2, el rendimiento de L-lisina se mejoró enormemente con la cepa WC196LCacpP*/pCABD2 en la que se redujo la expresión de los genes *acpP* y *fabF*.

[Tabla 2]

Tabla 2: Concentración de glucosa residual y concentración de acumulación de L-lisina obtenidas tras 48 horas de cultivo

	Acumulación de L-Lys (g/l)	Glucosa residual (g/l)
WC196LC/pCABD2	15,0	0
WC196LCacpP*/pCABD2	20,9	0

Ejemplo 3: Verificación de la cantidad de expresión de gen *acpP* mediante RT-PCR (1)

La cepa WC196LCacpP*/pCABD2 y la cepa WC196LC/pCABD2 se cultivaron cada una en la misma condición tal como se describió en el ejemplo 2, y se muestreó el caldo de cultivo después de 17 horas del cultivo. Se extrajo ARN del caldo de cultivo usando el reactivo RNAprotect Bacteria (Qiagen) y el mini kit RNeasy (Qiagen). Se realizó PCR de transcripción inversa usando el ARN obtenido como molde, y usando el kit de reactivos PrimeScript RT (Takara Bio). Se realizó PCR cuantitativa usando el ADNc como molde, y los oligonucleótidos sintéticos mostrados como SEQ ID NO: 13 y 14 y los oligonucleótidos sintéticos mostrados como SEQ ID NO: 15 y 16 como cebadores, y usando la mezcla Power SYBR Green PCR Master (Applied Biosystems). Los oligonucleótidos mostrados como SEQ ID NO: 13 y 14 se corresponden cada uno con la secuencia de nucleótidos del gen *acpP*. Los oligonucleótidos mostrados como SEQ ID NO: 15 y 16 se corresponden cada uno con la secuencia interna de ORF de *rrsA* (ARNr 16s). La cantidad de ARNm del gen *acpP* se calculó usando *rrsA* (ARNr 16s) como patrón estándar.

Las cantidades de ARNm del gen *acpP* obtenidas después de 17 horas de cultivo se mostraron en la tabla 3. Los datos se mostraron como el valor relativo a la cantidad de ARNm del gen *acpP* observada en la cepa WC196LC/pCABD2 establecido como 1. En comparación con la cepa de control WC196LC/pCABD2, la cantidad de ARNm de gen *acpP* se disminuyó enormemente en la cepa WC196LCacpP*/pCABD2.

[Tabla 3]

Tabla 3: Cantidad de ARNm de gen *acpP* obtenida después de 17 horas de cultivo

WC196LC/pCABD2	1
WC196LCacpP*/pCABD2	0,52

Ejemplo 4: Construcción de bacteria productora de L-lisina que muestra expresión reducida de los genes *acpP* y *fabF* (2)

5 Como bacteria productora de L-lisina, se usa la cepa WC196LC. La región en dirección 5' del operón *acpP-fabF* que consiste en los genes *acpP* y *fabF* de la cepa se reemplaza por el promotor P_{tac84} (solicitud publicada de patente rusa n.º 2006/134574) o promotor lac usando el método de "integración impulsada por Red". La región que va a reemplazarse puede ser una parte o la totalidad de la región de -200 a -1 en dirección 5' del inicio de la transcripción del operón *acpP-fabF*. Por ejemplo, puede reemplazarse la región de -100 a -1, de -50 a -1, de -30 a -1, o de -30 a -10 en dirección 5' desde el inicio de la transcripción del operón *acpP-fabF*.

15 A continuación, una cepa obtenida a partir de la cepa WC196LC reemplazando la región en dirección 5' del operón *acpP-fabF* con el promotor P_{tac84} se designa cepa WC196LC P_{tac84}acpP, y una cepa obtenida a partir de la cepa WC196LC reemplazando la región en dirección 5' del operón *acpP-fabF* con promotor lac se designa cepa WC196LC P_{lac} acpP.

20 La cepa WC196LC P_{tac84}acpP y la cepa WC196LC P_{lac} acpP se transforman con el plásmido pCABD2, y se seleccionan transformantes sobre el medio de L-agar que contiene 20 mg/l de estreptomina, para obtener la cepa WC196LC P_{tac84}acpP/pCABD2 y la cepa WC196LC P_{lac} acpP/pCABD2.

Ejemplo 5: Cultivo de producción de L-lisina (2)

25 Se realiza cultivo de producción de L-lisina según el método descrito en el ejemplo 2 usando la cepa WC196LC P_{tac84}acpP/pCABD2 y la cepa WC196LC P_{lac} acpP/pCABD2, que se obtienen en el ejemplo 4, y la cepa WC196LC/pCABD2 como cepa de control.

Ejemplo 6: Verificación de la cantidad de expresión de gen *acpP* mediante RT-PCR (2)

30 La cepa WC196LC P_{tac84}acpP/pCABD2 y la cepa WC196LC P_{lac} acpP/pCABD2, que se obtienen en el ejemplo 4, y la cepa WC196LC/pCABD2 se cultivan cada una en la condición descrita en el ejemplo 2, y la cantidad de ARNm de gen *acpP* se calcula usando el método descrito en el ejemplo 3.

Ejemplo 7: Construcción de bacteria productora de L-treonina que muestra expresión reducida de genes *acpP* y *fabF*

35 Como bacteria productora de L-treonina, se usa la cepa *E. coli* TDH-6 (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2001-346578). La cepa TDH-6 puede obtenerse a partir de la cepa *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) curando el plásmido pVIC40 (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2001-346578). La citosina ubicada 34 bases en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* de la cepa TDH-6 se reemplaza por adenina usando el método descrito en el ejemplo 1. Alternativamente, la región en dirección 5' del operón *acpP-fabF* de la cepa TDH-6 se reemplaza por el promotor P_{tac84} o promotor lac usando el método descrito en el ejemplo 4. La región que va a reemplazarse puede ser una parte o la totalidad de la región de -200 a -1 en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción del operón *acpP-fabF*. Por ejemplo, puede reemplazarse la región de -100 a -1, de -50 a -1, de -30 a -1, o de -30 a -10 en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción del operón *acpP-fabF*.

45 A continuación, una cepa obtenida a partir de la cepa TDH-6 reemplazando la citosina ubicada 34 bases en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* por adenina se designa TDH-6acpP*, una cepa obtenida a partir de la cepa TDH-6 reemplazando la región en dirección 5' del operón *acpP-fabF* por promotor P_{tac84} se designa cepa TDH-6 P_{tac84}acpP, y una cepa obtenida a partir de la cepa TDH-6 reemplazando la región en dirección 5' del operón *acpP-fabF* con promotor lac se designa cepa TDH-6 P_{lac} acpP.

50 La cepa TDH-6acpP*, la cepa TDH-6 P_{tac84}acpP y la cepa TDH-6 P_{lac} acpP se transforman con el plásmido pVIC40 (patente estadounidense n.º 5.705.371), para obtener la cepa TDH-6acpP*/pVIC40, cepa TDH-6 P_{tac84}acpP/pVIC40 y cepa TDH-6 P_{lac} acpP/pVIC40, respectivamente.

Ejemplo 8: Cultivo de producción de L-treonina

60 Se realiza cultivo de producción de L-treonina según el método descrito en la patente estadounidense n.º 7.915.018 usando la cepa TDH-6acpP*/pVIC40, la cepa TDH-6 P_{tac84}acpP/pVIC40 y la cepa TDH-6 P_{lac} acpP/pVIC40, que se obtienen en el ejemplo 7, y la cepa TDH-6/pVIC40 como cepa de control.

Ejemplo 9: Verificación de la cantidad de expresión del gen *acpP* mediante RT-PCR (3)

Se realiza cultivo de producción de L-treonina según el método descrito en la patente estadounidense n.º 7.915.018

usando la cepa TDH-6acpP*/pVIC40, la cepa TDH-6 P_{tac84}acpP/pVIC40 y la cepa TDH-6 P_{lac} acpP/pVIC40, que se obtienen en el ejemplo 7, y la cepa TDH-6/pVIC40 como cepa de control, y la cantidad de ARNm de gen *acpP* se calcula usando el caldo de cultivo según el método descrito en el ejemplo 3.

5 **Aplicabilidad industrial**

Según la presente invención, las capacidades de producción de L-aminoácido de bacterias pueden mejorarse, y pueden producirse eficazmente L-aminoácidos.

10 <Explicación de la lista de secuencias>

SEQ ID NO: 1 a 6, cebadores

15 SEQ ID NO: 7, secuencia de nucleótidos del operón *acpP-fabF* y secuencia en dirección 5' del mismo de *E. coli* MG1655

SEQ ID NO: 8, secuencia de aminoácidos de proteína AcpP de *E. coli* MG1655

20 SEQ ID NO: 9, secuencia de aminoácidos proteína FabF de *E. coli* MG1655

SEQ ID NO: 10: secuencia de nucleótidos del operón *acpP-fabF* y secuencia en dirección 5' del mismo de *Pantoea ananatis* AJ13355

25 SEQ ID NO: 11: secuencia de aminoácidos de proteína AcpP de *Pantoea ananatis* AJ13355

SEQ ID NO: 12: secuencia de aminoácidos de proteína FabF de *Pantoea ananatis* AJ13355

SEQ ID NO: 13 a 16, cebadores

30 **Lista de secuencias**

<110> Ajinomoto Co., Inc.

35 <120> Método para producir L-aminoácido

<130> D620-14228

<150> Documento JP2013-218221

40 <151> 21-10-2013

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> cebador

<400> 1

55 ttttttctg cgcgacgggt gaaactttgc atgtg

35

<210> 2

<211> 36

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

65 <400> 2

ES 2 694 011 T3

	aaaagcaggc ttcaaaaagc taagaaaaa ggcccc	36
	<210> 3	
	<211> 25	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 3	
	tacgaaaacc atagcgaaag cgagt	25
15	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 4	
25	actcgcttc gctatggtt tcgta	25
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
35	<400> 5	
	cgggtgaaac ttgcatgtg	20
	<210> 6	
40	<211> 68	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> cebador	
	<400> 6	
	cagagaattg ttagtggtggc agcatgttca ctacggaaca agtcggaata cgctcaagtt	60
	agtataaa	68
50	<210> 7	
	<211> 1776	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i> MG1655	
55	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (211)..(447)	
60	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (535)..(1776)	
	<400> 7	
65		

ES 2 694 011 T3

```

ccgcgatttg cacaaaatgc tcatgttgcg cgcagtctgc gtggttatga gtaataatta      60
gtgcaaaatg atttgcgta ttggggggta aggcctcaaa ataacgtaaa atcgtggtaa      120
gacctgccgg gatttagttg caaatttttc aacattttat acactacgaa aaccatcgcg      180
aaagcgagtt ttgataggaa atttaagagt atg agc act atc gaa gaa cgc gtt      234
                               Met Ser Thr Ile Glu Glu Arg Val
                               1           5

aag aaa att atc ggc gaa cag ctg ggc gtt aag cag gaa gaa gtt acc      282
Lys Lys Ile Ile Gly Glu Gln Leu Gly Val Lys Gln Glu Glu Val Thr
 10           15           20

aac aat gct tct ttc gtt gaa gac ctg ggc gcg gat tct ctt gac acc      330
Asn Asn Ala Ser Phe Val Glu Asp Leu Gly Ala Asp Ser Leu Asp Thr
 25           30           35           40

gtt gag ctg gta atg gct ctg gaa gaa gag ttt gat act gag att ccg      378
Val Glu Leu Val Met Ala Leu Glu Glu Glu Phe Asp Thr Glu Ile Pro
          45           50           55

gac gaa gaa gct gag aaa atc acc acc gtt cag gct gcc att gat tac      426
Asp Glu Glu Ala Glu Lys Ile Thr Thr Val Gln Ala Ala Ile Asp Tyr
          60           65           70

atc aac ggc cac cag gcg taa gtgaacatct ccaggcggtc gttcgaccgc      477
Ile Asn Gly His Gln Ala
          75

ctgagtttta tctttttgtc ccactagaat cattttttcc ctccctggag gacaaac      534
gtg tct aag cgt cgt gta gtt gtg acc gga ctg ggc atg ttg tct cct      582

```

ES 2 694 011 T3

Met	Ser	Lys	Arg	Arg	Val	Val	Val	Thr	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	Ser	Pro		
	80					85					90						
gtc	ggc	aat	acc	gta	gag	tct	acc	tgg	aaa	gct	ctg	ctt	gcc	ggt	cag		630
Val	Gly	Asn	Thr	Val	Glu	Ser	Thr	Trp	Lys	Ala	Leu	Leu	Ala	Gly	Gln		
95					100				105						110		
agt	ggc	atc	agc	cta	atc	gac	cat	ttc	gat	act	agc	gcc	tat	gca	acg		678
Ser	Gly	Ile	Ser	Leu	Ile	Asp	His	Phe	Asp	Thr	Ser	Ala	Tyr	Ala	Thr		
				115				120							125		
aaa	ttt	gct	ggc	tta	gta	aag	gat	ttt	aac	tgt	gag	gac	att	atc	tcg		726
Lys	Phe	Ala	Gly	Leu	Val	Lys	Asp	Phe	Asn	Cys	Glu	Asp	Ile	Ile	Ser		
				130				135							140		
cgc	aaa	gaa	cag	cgc	aag	atg	gat	gcc	ttc	att	caa	tat	gga	att	gtc		774
Arg	Lys	Glu	Gln	Arg	Lys	Met	Asp	Ala	Phe	Ile	Gln	Tyr	Gly	Ile	Val		
				145				150							155		
gct	ggc	ggt	cag	gcc	atg	cag	gat	tct	ggc	ctt	gaa	ata	acg	gaa	gag		822
Ala	Gly	Val	Gln	Ala	Met	Gln	Asp	Ser	Gly	Leu	Glu	Ile	Thr	Glu	Glu		
				160				165							170		
aac	gca	acc	cgc	att	ggt	gcc	gca	att	ggc	tcc	ggg	att	ggc	ggc	ctc		870
Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Gly	Ala	Ala	Ile	Gly	Ser	Gly	Ile	Gly	Gly	Leu		
175					180					185					190		
gga	ctg	atc	gaa	gaa	aac	cac	aca	tct	ctg	atg	aac	ggt	ggt	cca	cgt		918
Gly	Leu	Ile	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ser	Leu	Met	Asn	Gly	Gly	Pro	Arg		
					195					200					205		
aag	atc	agc	cca	ttc	ttc	ggt	ccg	tca	acg	att	gtg	aac	atg	gtg	gca		966
Lys	Ile	Ser	Pro	Phe	Phe	Val	Pro	Ser	Thr	Ile	Val	Asn	Met	Val	Ala		
				210						215					220		
ggt	cat	ctg	act	atc	atg	tat	ggc	ctg	cgt	ggc	ccg	agc	atc	tct	atc		1014
Gly	His	Leu	Thr	Ile	Met	Tyr	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Ser	Ile	Ser	Ile		
							230								235		
gcg	act	gcc	tgt	act	tcc	ggc	gtg	cac	aac	att	ggc	cat	gct	gcg	cgt		1062
Ala	Thr	Ala	Cys	Thr	Ser	Gly	Val	His	Asn	Ile	Gly	His	Ala	Ala	Arg		
						245									250		
att	atc	gcg	tat	ggc	gat	gct	gac	gtg	atg	ggt	gca	ggt	ggc	gca	gag		1110
Ile	Ile	Ala	Tyr	Gly	Asp	Ala	Asp	Val	Met	Val	Ala	Gly	Gly	Ala	Glu		
						260									270		
aaa	gcc	agt	acg	ccg	ctg	ggc	ggt	ggt	ggt	ttt	ggc	gcg	gca	cgt	gca		1158
Lys	Ala	Ser	Thr	Pro	Leu	Gly	Val	Gly	Gly	Phe	Gly	Ala	Ala	Arg	Ala		
						275				280					285		
tta	tct	acc	cgc	aat	gat	aac	ccg	caa	gcg	gcg	agc	cgc	ccg	tgg	gat		1206
Leu	Ser	Thr	Arg	Asn	Asp	Asn	Pro	Gln	Ala	Ala	Ser	Arg	Pro	Trp	Asp		
								295							300		
aaa	gag	cgt	gat	ggt	ttc	gta	ctg	ggc	gat	ggt	gcc	ggt	atg	ctg	gta		1254
Lys	Glu	Arg	Asp	Gly	Phe	Val	Leu	Gly	Asp	Gly	Ala	Gly	Met	Leu	Val		
								310							315		
ctt	gaa	gag	tac	gaa	cac	gcg	aaa	aaa	cgc	ggt	gcg	aaa	att	tac	gct		1302
Leu	Glu	Glu	Tyr	Glu	His	Ala	Lys	Lys	Arg	Gly	Ala	Lys	Ile	Tyr	Ala		
								325							330		
gaa	ctc	gtc	ggc	ttt	ggt	atg	agc	agc	gat	gct	tat	cat	atg	acg	tca		1350
Glu	Leu	Val	Gly	Phe	Gly	Met	Ser	Ser	Asp	Ala	Tyr	His	Met	Thr	Ser		
						340									350		
ccg	cca	gaa	aat	ggc	gca	ggc	gca	gct	ctg	gcg	atg	gca	aat	gct	ctg		1398
Pro	Pro	Glu	Asn	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Met	Ala	Asn	Ala	Leu		
						355									365		
cgt	gat	gca	ggc	att	gaa	gcg	agt	cag	att	ggc	tac	ggt	aac	gcg	cac		1446
Arg	Asp	Ala	Gly	Ile	Glu	Ala	Ser	Gln	Ile	Gly	Tyr	Val	Asn	Ala	His		
										375					380		
ggt	act	tct	acg	ccg	gct	ggc	gat	aaa	gct	gaa	gcg	cag	gcg	gtg	aaa		1494
Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Ala	Gly	Asp	Lys	Ala	Glu	Ala	Gln	Ala	Val	Lys		
										390					395		
acc	atc	ttc	ggt	gaa	gct	gca	agc	cgt	gtg	ttg	gta	agc	tcc	acg	aaa		1542
Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	Ala	Ala	Ser	Arg	Val	Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Lys		
															410		
tct	atg	acc	ggt	cac	ctg	tta	ggt	gcg	gcg	ggt	gca	gta	gaa	tct	atc		1590

ES 2 694 011 T3

Ser Met Thr Gly His Leu Leu Gly Ala Ala Gly Ala Val Glu Ser Ile
 415 420 425 430
 tac tcc atc ctg gcg ctg cgc gat cag gct gtt ccg cca acc atc aac 1638
 Tyr Ser Ile Leu Ala Leu Arg Asp Gln Ala Val Pro Pro Thr Ile Asn
 435 440 445
 ctg gat aac ccg gat gaa ggt tgc gat ctg gat ttc gta ccg cac gaa 1686
 Leu Asp Asn Pro Asp Glu Gly Cys Asp Leu Asp Phe Val Pro His Glu
 450 455 460
 gcg cgt cag gtt agc gga atg gaa tac act ctg tgt aac tcc ttc ggc 1734
 Ala Arg Gln Val Ser Gly Met Glu Tyr Thr Leu Cys Asn Ser Phe Gly
 465 470 475
 ttc ggt ggc act aat ggt tct ttg atc ttt aaa aag atc taa 1776
 Phe Gly Thr Asn Gly Ser Leu Ile Phe Lys Lys Ile
 480 485 490

<210> 8

<211> 78

5 <212> PRT

<213> *Escherichia coli* MG1655

<400> 8

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

10

<210> 9

<211> 413

<212> PRT

15 <213> *Escherichia coli* MG1655

<400> 9

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

ES 2 694 011 T3

	60		65		70		
gca tct ttc gta gaa gac ctg ggt gcc gat tct ctt gat acc gtt gag							474
Ala Ser Phe Val Glu Asp Leu Gly Ala Asp Ser Leu Asp Thr Val Glu							
	75		80		85		
ctg gta atg gct ctg gaa gaa gag ttt gat act gaa att cca gac gaa							522
Leu Val Met Ala Leu Glu Glu Glu Phe Asp Thr Glu Ile Pro Asp Glu							
	90		95		100		
gaa gct gag aaa atc act acc gtt cag gca gcg atc gac tat atc aat							570
Glu Ala Glu Lys Ile Thr Thr Val Gln Ala Ala Ile Asp Tyr Ile Asn							
105		110		115		120	
agc cat aaa ggc taa tgaatatctt caggcggtca tatgaccgcc tgagttttat							625
Ser His Lys Gly							
gtttgcccca caatagtcac ttttatccct ccctggagga cgaacgtgtc taagcgtcgt							685
gtagttgtga ctggtcttgg c atg ttg tct cct gtc ggc aat acc gta gag							736
		Met Leu Ser Pro Val Gly Asn Thr Val Glu					
		125			130		
tct acc tgg agt gct ctc ctt gcc ggt cag agc ggc att aac ctg atc							784
Ser Thr Trp Ser Ala Leu Leu Ala Gly Gln Ser Gly Ile Asn Leu Ile							
135		140		145		150	
gac cat ttt gat acc agc gcc tat gca aca cgt ttt gca ggt ctg gta							832
Asp His Phe Asp Thr Ser Ala Tyr Ala Thr Arg Phe Ala Gly Leu Val							
		155		160		165	
aga gat ttt aat tgc gat gac ttt atc tct cgt aaa gat caa cgc aag							880
Arg Asp Phe Asn Cys Asp Asp Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gln Arg Lys							
		170		175		180	
atg gat gac ttc att cag tac ggc atc gtg gca ggc att cag gcc atg							928
Met Asp Asp Phe Ile Gln Tyr Gly Ile Val Ala Gly Ile Gln Ala Met							
		185		190		195	
cag gac agc ggt ctg gtt gtg acc gac gaa aat gca ggc cgg gtt ggc							976
Gln Asp Ser Gly Leu Val Thr Asp Glu Asn Ala Gly Arg Val Gly							
		200		205		210	
gca gca att ggt tgc ggc atc ggg ggc ttg ggt ctt att gaa gac aac							1024
Ala Ala Ile Gly Ser Gly Ile Gly Gly Leu Gly Leu Ile Glu Asp Asn							
215		220		225		230	
cat acc tct ctg gtg aac ggt ggc ccg cgt aaa att agc cca ttc ttt							1072
His Thr Ser Leu Val Asn Gly Gly Pro Arg Lys Ile Ser Pro Phe Phe							
		235		240		245	
gtg cct tcc aca atc gtc aat atg gtg gcg ggg cat ctc acc atc atg							1120
Val Pro Ser Thr Ile Val Asn Met Val Ala Gly His Leu Thr Ile Met							
		250		255		260	
tat ggc ctg aaa ggc ccc agc atc tcc att gcg acc gcc tgt acg tct							1168
Tyr Gly Leu Lys Gly Pro Ser Ile Ser Ile Ala Thr Ala Cys Thr Ser							
		265		270		275	
ggc gtg cac aat atc ggt cat gct gca cgt atc atc gcc tat aac gat							1216
Gly Val His Asn Ile Gly His Ala Ala Arg Ile Ile Ala Tyr Asn Asp							
		280		285		290	
gcc gac gtg atg ctg gcg ggc ggt gcg gaa aaa gcc agt acg cca ctt							1264
Ala Asp Val Met Leu Ala Gly Gly Ala Glu Lys Ala Ser Thr Pro Leu							
295		300		305		310	
ggc gtt ggc gga ttc ggc gcg gca cgt gcg ctg tcg acg cgt aac gaa							1312
Gly Val Gly Gly Phe Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ser Thr Arg Asn Glu							
		315		320		325	
aat ccc cag gcg gca agc cgt cca tgg gat aaa gac cgt gat gga ttt							1360
Asn Pro Gln Ala Ala Ser Arg Pro Trp Asp Lys Asp Arg Asp Gly Phe							
		330		335		340	
gta ctg ggc gac ggc gct ggc att atc gta ctg gaa gag tat gag cat							1408
Val Leu Gly Asp Gly Ala Gly Ile Ile Val Leu Glu Glu Tyr Glu His							
		345		350		355	
gct aag aaa cgt ggc gca aaa atc tat gcg gaa att gtg ggc ttt ggg							1456
Ala Lys Lys Arg Gly Ala Lys Ile Tyr Ala Glu Ile Val Gly Phe Gly							
		360		365		370	
atg agc agc gat gct tat cac atg acc tca ccg ccg gaa gac ggt tca							1504

ES 2 694 011 T3

Met Ser Ser Asp Ala Tyr His Met Thr Ser Pro Pro Glu Asp Gly Ser
 375 380 385 390
 ggt gca gcc gct gcg atg atc aac gcg ctg cgt gat gcg cag atg acg 1552
 Gly Ala Ala Ala Ala Met Ile Asn Ala Leu Arg Asp Ala Gln Met Thr
 395 400 405
 cca gat aag att ggt tac gtc aat gca cac ggt acc tca acc cca gcc 1600
 Pro Asp Lys Ile Gly Tyr Val Asn Ala His Gly Thr Ser Thr Pro Ala
 410 415 420
 ggc gat aaa gcg gaa gcc cag gcg gtg aaa tcc gtt ttt ggt gca gca 1648
 Gly Asp Lys Ala Glu Ala Gln Ala Val Lys Ser Val Phe Gly Ala Ala
 425 430 435
 gcc agt acg gta atg gtc agc tcc acc aaa tcc atg acc ggc cat ctg 1696
 Ala Ser Thr Val Met Val Ser Ser Thr Lys Ser Met Thr Gly His Leu
 440 445 450
 ttg ggt gcg gcg ggc gcg gtt gag tcg atc tat tcg att ctg gcc ctg 1744
 Leu Gly Ala Ala Gly Ala Val Glu Ser Ile Tyr Ser Ile Leu Ala Leu
 455 460 465 470
 cgc gac cag gcg att cca ccg acg ctg aac ctg gat aat cct gat gaa 1792
 Arg Asp Gln Ala Ile Pro Pro Thr Leu Asn Leu Asp Asn Pro Asp Glu
 475 480 485
 ggt tgc gat ctt gat ttc gtt ccg cac acc gct cgt cag gtt tcg ggg 1840
 Gly Cys Asp Leu Asp Phe Val Pro His Thr Ala Arg Gln Val Ser Gly
 490 495 500
 ctg gaa tac acg ctg tgt aac tcc ttc ggc ttc ggc ggt acc aac ggc 1888
 Leu Glu Tyr Thr Leu Cys Asn Ser Phe Gly Phe Gly Gly Thr Asn Gly
 505 510 515
 tcg ctg att ttc cgt aaa atc taa 1912
 Ser Leu Ile Phe Arg Lys Ile
 520 525

<210> 11
 <211> 124
 5 <212> PRT
 <213> *Pantoea ananatis* AJ13355

<400> 11

Met His Tyr Leu Arg Ile Lys Pro His Asn Ser Val Lys Ser Trp Phe
 1 5 10 15
 Asp Gln Pro Gly Phe Cys Cys Ile Phe Phe Asn Ile Leu Tyr Thr Thr
 20 25 30
 Lys Thr Ile Ala Lys Ala Ser Phe Asp Arg Lys Leu Asn Ser Met Ser
 35 40 45
 Asp Ile Glu Gln Arg Val Lys Lys Ile Ile Ser Glu Gln Leu Gly Val
 50 55 60
 Lys Glu Glu Glu Val Thr Asn Ser Ala Ser Phe Val Glu Asp Leu Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Ser Leu Asp Thr Val Glu Leu Val Met Ala Leu Glu Glu Glu
 85 90 95
 Phe Asp Thr Glu Ile Pro Asp Glu Glu Ala Glu Lys Ile Thr Thr Val
 100 105 110
 Gln Ala Ala Ile Asp Tyr Ile Asn Ser His Lys Gly
 10 115 120

<210> 12
 <211> 401
 <212> PRT
 15 <213> *Pantoea ananatis* AJ13355

<400> 12

Met Leu Ser Pro Val Gly Asn Thr Val Glu Ser Thr Trp Ser Ala Leu
 1 5 10 15

ES 2 694 011 T3

Leu Ala Gly Gln Ser Gly Ile Asn Leu Ile Asp His Phe Asp Thr Ser
 20 25 30
 Ala Tyr Ala Thr Arg Phe Ala Gly Leu Val Arg Asp Phe Asn Cys Asp
 35 40 45
 Asp Phe Ile Ser Arg Lys Asp Gln Arg Lys Met Asp Asp Phe Ile Gln
 50 55 60
 Tyr Gly Ile Val Ala Gly Ile Gln Ala Met Gln Asp Ser Gly Leu Val
 65 70 75 80
 Val Thr Asp Glu Asn Ala Gly Arg Val Gly Ala Ala Ile Gly Ser Gly
 85 90 95
 Ile Gly Gly Leu Gly Leu Ile Glu Asp Asn His Thr Ser Leu Val Asn
 100 105 110
 Gly Gly Pro Arg Lys Ile Ser Pro Phe Phe Val Pro Ser Thr Ile Val
 115 120 125
 Asn Met Val Ala Gly His Leu Thr Ile Met Tyr Gly Leu Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ser Ile Ser Ile Ala Thr Ala Cys Thr Ser Gly Val His Asn Ile Gly
 145 150 155 160
 His Ala Ala Arg Ile Ile Ala Tyr Asn Asp Ala Asp Val Met Leu Ala
 165 170 175
 Gly Gly Ala Glu Lys Ala Ser Thr Pro Leu Gly Val Gly Gly Phe Gly
 180 185 190
 Ala Ala Arg Ala Leu Ser Thr Arg Asn Glu Asn Pro Gln Ala Ala Ser
 195 200 205
 Arg Pro Trp Asp Lys Asp Arg Asp Gly Phe Val Leu Gly Asp Gly Ala
 210 215 220
 Gly Ile Ile Val Leu Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys Lys Arg Gly Ala
 225 230 235 240
 Lys Ile Tyr Ala Glu Ile Val Gly Phe Gly Met Ser Ser Asp Ala Tyr
 245 250 255
 His Met Thr Ser Pro Pro Glu Asp Gly Ser Gly Ala Ala Ala Ala Met
 260 265 270
 Ile Asn Ala Leu Arg Asp Ala Gln Met Thr Pro Asp Lys Ile Gly Tyr
 275 280 285
 Val Asn Ala His Gly Thr Ser Thr Pro Ala Gly Asp Lys Ala Glu Ala
 290 295 300
 Gln Ala Val Lys Ser Val Phe Gly Ala Ala Ala Ser Thr Val Met Val
 305 310 315 320
 Ser Ser Thr Lys Ser Met Thr Gly His Leu Leu Gly Ala Ala Gly Ala
 325 330 335
 Val Glu Ser Ile Tyr Ser Ile Leu Ala Leu Arg Asp Gln Ala Ile Pro
 340 345 350
 Pro Thr Leu Asn Leu Asp Asn Pro Asp Glu Gly Cys Asp Leu Asp Phe
 355 360 365
 Val Pro His Thr Ala Arg Gln Val Ser Gly Leu Glu Tyr Thr Leu Cys
 370 375 380
 Asn Ser Phe Gly Phe Gly Gly Thr Asn Gly Ser Leu Ile Phe Arg Lys
 385 390 395 400
 Ile

<210> 13
 <211> 19
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

10 <400> 13

aacagctggg cgtaaagca

19

15 <210> 14

ES 2 694 011 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> cebador

<400> 14

10 gcccggtct tcaacgaaag 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

20 <400> 15

cctgggaact gcatctgata 20

<210> 16
25 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> cebador

<400> 16

35 tctacgcatt tcaccgctac 20

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un L-aminoácido que comprende:
 - 5 cultivar una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y que tiene una capacidad de producción de L-aminoácido en un medio para producir y acumular un L-aminoácido en el medio o células de la bacteria; y
 - 10 recoger el L-aminoácido del medio o las células,
 - en el que la bacteria se ha modificado de modo que el operón *acpP-fabF* se atenúa en comparación con una cepa no modificada,
 - 15 en el que el operón *acpP-fabF* se atenúa atenuando la expresión de un gen del operón *acpP-fabF*,
 - en el que la expresión del gen del operón *acpP-fabF* se atenúa modificando una secuencia de control de la expresión del gen.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el gen del operón *acpP-fabF* consiste en el gen *acpP* y/o el gen *fabF*.
3. Método según la reivindicación 2, en el que el gen del operón *acpP-fabF* consiste en el gen *acpP* y el gen *fabF*.
- 25 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que la expresión del gen del operón *acpP-fabF* se atenúa reemplazando la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* por otra base,
- 30 en el que la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* es una posición correspondiente a la posición 177 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la expresión del gen del operón *acpP-fabF* se atenúa reemplazando la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* por adenina.
- 35 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la bacteria es una bacteria que pertenece a los géneros *Escherichia*, *Pantoea* o *Enterobacter*.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la bacteria es *Escherichia coli*.
- 40 8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cepa no modificada es la cepa *Escherichia coli* MG1655.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la cepa no modificada tiene la secuencia de nucleótidos del operón *acpP-fabF*, que incluye en dirección 5' 210 pb del mismo, mostrada como SEQ ID NO: 7.
- 45 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el L-aminoácido es L-lisina.
- 50 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cantidad de expresión del gen *acpP* no se reduce hasta el 0 %.
12. Método para producir L-lisina que comprende:
 - 55 cultivar *Escherichia coli* que tiene capacidad de producción de L-lisina en un medio para producir y acumular L-lisina en el medio o células de la *Escherichia coli*; y
 - recoger L-lisina del medio o las células,
 - 60 en el que la expresión de un gen del operón *acpP-fabF* se ha atenuado en la *Escherichia coli* en comparación con una cepa no modificada modificando una secuencia de control de la expresión del gen.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la cepa no modificada es la cepa *Escherichia coli* MG1655.
- 65 14. Método según la reivindicación 12 o 13, en el que la cepa no modificada tiene la secuencia de nucleótidos del operón *acpP-fabF*, que incluye en dirección 5' 210 pb del mismo, mostrada como SEQ ID NO: 7.

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que la cantidad de expresión del gen *acpP* no se reduce hasta el 0 %.
- 5 16. Método para producir L-lisina que comprende:
- cultivar *Escherichia coli* que tiene capacidad de producción de L-lisina en un medio para producir y acumular L-lisina en el medio o células de la *Escherichia coli*; y
- 10 recoger L-lisina del medio o las células,
- en el que la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* se ha reemplazado por otra base en la *Escherichia coli*,
- 15 en el que la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* es una posición correspondiente a la posición 177 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7.
17. Método para producir L-lisina según la reivindicación 16, en el que la citosina en la posición -34 en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción del gen *acpP* se ha reemplazado por adenina en la *Escherichia coli*.