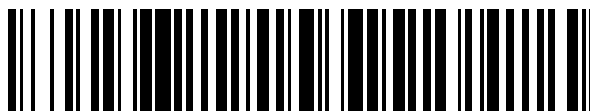


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 970**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2015 PCT/KR2015/002551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15142021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2015 E 15764058 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3119874**

54 Título: **Microorganismos que tienen una productividad de L-aminoácidos potenciada y proceso de producción de L-aminoácidos en el que se usan los mismos**

30 Prioridad:

21.03.2014 KR 20140033698

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

29.10.2019

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
Dongho-ro 330, Ssangnim-dong, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**KOH, EUN SUNG;
KWON, SU YON;
LEE, KWANG HO;
LEE, JI SUN;
JANG, JUNO;
LEE, KEUN CHEOL y
HONG, HYEONG PYO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 728 970 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

Microorganismos que tienen una productividad de L-aminoácidos potenciada y proceso de producción de L-aminoácidos en el que se usan los mismos

Campo técnico

La presente invención se refiere a un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tiene una capacidad de producción potenciada de una L-treonina o un L-triptófano, y a un método de producción de L-treonina o L-triptófano en el que se usa el microorganismo.

Técnica antecedente

La adenosina-5'-trifosfato (ATP) tiene enlaces fosfato de alta energía y genera energía cuando la ATP se hidroliza a adenosina difosfato (ADP) y un fosfato. La ATP es la principal fuente de energía para todos los organismos vivos. La ATP se sintetiza mediante un sistema de transporte de electrones dentro de un microorganismo, una fosforilación a nivel de sustrato o similar. La ATP suministra la energía que requieren las células cuando se degradan, y luego, se recicla de manera continua a través de un proceso de glucólisis o fosforilación oxidativa. Además, se sabe que los microorganismos que producen metabolitos útiles mediante fermentación demandan más energías de tipo ATP de acuerdo con la potenciación de la biosíntesis de la ATP. Morrison *et al.* (*Biol Lett.* 2008, 23;4(1):53-56) se refiere a una desactivación del gen de la AMP nucleosidasa en *Escherichia coli* que eleva los niveles de ATP intracelular y aumenta la tolerancia al frío. Hara *et al.* (*Metab Eng.* 2009; 11(1):1 -7) se refiere a la exploración sistemática de todo el genoma de los genes que participan en la generación de ATP en *Escherichia coli*. El documento WO 2012/099396 se refiere a un microorganismo que tiene una productividad de L-aminoácidos potenciada y a un proceso para producir L-aminoácidos en el que se usa el mismo. Kaleta *et al.* (*Biotechnol J.* 2013; 8(9): 1105-14) se refiere a los costes metabólicos de la producción de aminoácidos y proteínas en *Escherichia coli*.

Los inventores de la presente invención aumentan una proporción de la ATP, que es la fuente de energía más usada para producir un L-aminoácido, dentro de una célula, a fin de confirmar los efectos de la ATP en la producción del L-aminoácido.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un microorganismo recombinante que tiene una capacidad de producción potenciada de un L-aminoácido, en el que se elimina o se disminuye la actividad de al menos una de entre adenosina desaminasa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y AMP nucleosidasa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, perteneciendo el microorganismo recombinante al género *Escherichia*, y siendo el L-aminoácido L-treonina o L-triptófano.

La presente invención también proporciona un método de producción de un L-aminoácido, comprendiendo el método: cultivar el microorganismo recombinante de la invención; y recoger un L-aminoácido del cultivo, en el que el L-aminoácido es L-treonina o L-triptófano.

Se desvela un microorganismo recombinante que tiene una capacidad de producción potenciada de un L-aminoácido, en el que se elimina o disminuye la actividad de al menos una de entre adenosina desaminasa y AMP nucleosidasa.

La expresión "adenosina desaminasa (Add)", como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima que está presente en el citosol y que participa en una parte del metabolismo de la purina. La Add puede actuar en una posición C-6 de la adenosina, de modo que se desamine un grupo amino unido a la posición C-6, y en este sentido, la Add puede tener un papel en la catalización de una reacción de conversión de adenosina +H₂O→inosina+NH₃, dando lugar a la producción de inosina y amonio.

Una base de datos conocida, tal como la base de datos GenBank del NCBI, puede proporcionar una secuencia de aminoácidos de la Add, pero la base de datos no se limita a la misma. La Add puede incluir, en detalle, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, o una secuencia de aminoácidos que tenga aproximadamente el 80 % o más, 90 % o más, o 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Además, dicha secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia incluye una secuencia de aminoácidos en la que una parte de la secuencia se elimina, se modifica, se sustituye o se añade. La secuencia de Add puede incluir una secuencia de polinucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. La secuencia de polinucleótidos codificante de la proteína Add puede denominarse gen add (ID del gen del NCBI: 12931257). Por ejemplo, una secuencia del gen add que codifica la proteína Add puede incluir una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 13, o una secuencia de polinucleótidos que tenga aproximadamente el 80 % o más, el 90 % o más, o el 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 13. Dicha secuencia de bases que tiene identidad de secuencia incluye una secuencia de bases en la que una parte de la secuencia se elimina, se modifica, se sustituye o se añade.

La expresión "AMP nucleosidasa (Amn)" usada en el presente documento se refiere a una enzima que pertenece a la familia de las hidrolasas, por ejemplo, las glicosilasas que hidrolizan los compuestos de N-glicosilo, y también se denomina adenilato nucleosidasa. La Amn puede participar en una parte del metabolismo de la purina. Por ejemplo, la Amn puede tener un papel en la catalización de una reacción de conversión de $\text{AMP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{D-ribosa-5-fosfato} + \text{adenina}$. Además, cuando un gen amn codificante de la Amn se desactiva, los niveles de ATP dentro de la célula pueden aumentar.

Una base de datos conocida, tal como la base de datos GenBank del NCBI, puede proporcionar una secuencia de aminoácidos de la Amn, pero la base de datos no se limita a la misma. La Amn puede incluir, en detalle, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, o una secuencia de aminoácidos que tenga aproximadamente el 80 % o más, 90 % o más, o 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. Además, dicha secuencia de aminoácidos que tiene identidad de secuencia incluye una secuencia de aminoácidos en la que una parte de la secuencia se elimina, se modifica, se sustituye o se añade. La secuencia de Amn puede incluir una secuencia de polinucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. La secuencia de polinucleótidos codificante de la proteína Amn puede denominarse gen amn (ID del gen del NCBI: 12931407). Por ejemplo, una secuencia del gen amn que codifica la proteína Amn puede incluir una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 15, o una secuencia de polinucleótidos que tenga aproximadamente el 80 % o más, el 90 % o más, o el 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 15. Dicha secuencia de bases que tiene identidad de secuencia incluye una secuencia de bases en la que una parte de la secuencia se elimina, se modifica, se sustituye o se añade.

Como se usa en el presente documento, la identidad de secuencia se refiere a un grado de similitud en las secuencias de bases de los genes que codifican proteínas o en las secuencias de aminoácidos. En el caso de una alta identidad de los genes, los productos de expresión de los genes pueden tener la misma actividad o similar entre sí.

Es posible eliminar o reducir la actividad de la Add o la Amn en un microorganismo, y usarse el microorganismo para producir el L-aminoácido. En el microorganismo recombinante que tiene una capacidad de producción potenciada del L-aminoácido, es posible eliminar o reducir la actividad de la Add y la Amn por separado o en conjunto. Por ejemplo, en el microorganismo recombinante, se puede eliminar o disminuir la actividad de ambas proteínas. El microorganismo recombinante que tiene eliminada o disminuida la actividad de Add o Amn da lugar a una capacidad de producción potenciada del L-aminoácido en comparación con un microorganismo en el que la actividad de las proteínas no se elimina ni se disminuye.

La expresión "L-aminoácido", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad estructural básica de una proteína que constituye el cuerpo de un organismo y que tiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico que están unidos al mismo átomo de carbono. El L-aminoácido se selecciona de entre L-triptófano o L-treonina.

La expresión "microorganismo recombinante", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo que está genéticamente modificado. El microorganismo recombinante puede ser un microorganismo diseñado genéticamente y, por ejemplo, se puede introducir un ácido nucleico exógeno en un microorganismo de acuerdo con los métodos de ingeniería genética, o se puede transformar una secuencia o ubicación de un gen endógeno en un microorganismo.

La expresión "actividad eliminada" de una enzima o de un polipéptido, como se usa en el presente documento, se refiere a un caso en el que la proteína descrita anteriormente no se expresa en absoluto en un microorganismo, o un caso en el que se expresa la proteína descrita anteriormente, pero que no tiene ninguna actividad. La expresión "actividad disminuida" de una enzima o de un polipéptido, como se usa en el presente documento, se refiere a un caso en el que la proteína descrita anteriormente se expresa, pero su actividad es débil en comparación con la actividad intrínseca. La expresión "actividad eliminada" o "actividad disminuida" se puede reemplazar por el término "inactivación" o la expresión "debilidad de la actividad". La expresión "actividad intrínseca", como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad de un microorganismo en un estado natural, es decir, la actividad que existe originalmente en un microorganismo, o la actividad de una proteína que no ha sido modificada genéticamente.

La eliminación o reducción de la actividad de la Add o de la Amn puede estar causada por la eliminación o modificación de los genes que codifican la Add o la Amn. La expresión "eliminación o modificación de genes" usada en el presente documento se refiere a un caso en el que una parte o la totalidad de los genes o factores reguladores de las regiones promotoras o terminadoras de los genes está mutada, sustituida, eliminada o insertada con al menos una base, por lo que los genes no se expresan o los genes se expresan en una pequeña cantidad, o los genes se expresan sin mostrar actividad enzimática o con una actividad enzimática disminuida. La eliminación o alteración de los genes se puede lograr mediante la manipulación genética, tal como la recombinación homóloga, la mutagénesis o la evolución molecular. Cuando una célula incluye una pluralidad de los mismos genes o al menos dos genes homólogos de diferentes polipéptidos, se pueden eliminar o alterar uno o más genes en la célula. En una realización ilustrativa, el gen add que codifica la Add o el gen amn que codifica la Amn puede eliminarse del genoma del microorganismo mediante recombinación homóloga, o puede tener un codón de inicio modificado.

La expresión "microorganismo recombinante que tiene una capacidad de producción potenciada del L-aminoácido", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo del género *Escherichia* capaz de producir y acumular el L-aminoácido a partir de una fuente de carbono contenida en un medio. El microorganismo recombinante que tiene eliminada o disminuida la actividad de Add o Amn da lugar a una capacidad de producción

potenciada del L-aminoácido en comparación con un microorganismo en el que la actividad de las enzimas no está modificada. En una realización ilustrativa, se confirmó que una cepa productora de treonina y una cepa productora de triptófano que tienen enzimas inactivadas descritas anteriormente tuvieron una capacidad de producción

potenciada de treonina y triptófano en comparación con cepas madre de la cepa productora de treonina y la cepa productora de triptófano.

Otro microorganismo recombinante adecuado puede ser un microorganismo del género *Enterbacter*, del género *Erwinia*, del género *Serratia*, del género *Providencia*, del género *Corynebacterium* y del género *Brevibacterium*. El microorganismo del género *Escherichia* puede ser *Escherichia coli* (*E. coli*), por ejemplo, KCCM0000P de *E. coli*. La KCCM0000P de *E. coli* es una cepa KCCM10910PΔaddΔamn preparada usando una cepa productora de treonina (KCCM10 910P) como cepa madre y realizando la eliminación de los genes *add* y *amn*. En este caso, la producción de treonina en la KCCM0000P de *E. coli* ha resultado ser mayor que en la cepa madre (KCCM10910P).

La KCCM0000P de *E. coli* se nombró "CA03-8254P", y luego, se depositó en el Centro de Cultivo de Microorganismos coreano (de aquí en adelante, "KCCM") el 9 de diciembre de 2013, en virtud del Tratado de Budapest. La KCCM0000P de *E. coli* recibió el número de registro KCCM11494P.

En el presente documento, se desvela una composición para producir el L-aminoácido, en la que la composición incluye el microorganismo recombinante. La expresión "composición para producir el L-aminoácido", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición capaz de producir el L-aminoácido como un metabolito usando el microorganismo recombinante que produce el L-aminoácido o un producto de cultivo del microorganismo recombinante. El microorganismo recombinante que produce el L-aminoácido se define de la misma manera que se ha descrito anteriormente. El L-aminoácido se puede seleccionar del grupo que consiste en L-treonina o L-triptófano. La expresión "producto de cultivo", como se usa en el presente documento, se refiere a un cultivo en caldo que contiene el microorganismo recombinante, un sobrenadante del cultivo del que se elimina una célula microbiana, o una solución diluida del producto de cultivo. La composición puede incluir además un ingrediente para aumentar la productividad del L-aminoácido. Por ejemplo, la composición puede incluir además fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno o ingredientes de elementos traza. Las fuentes de carbono pueden incluir, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcohol, tal como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, o una combinación de los mismos. El cultivo del microorganismo recombinante se puede realizar mediante el uso de glucosa como fuente de carbono. Las fuentes de nitrógeno pueden incluir, por ejemplo, fuentes de nitrógeno orgánico, tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maíz (CSL) y harina de soja; y fuentes de nitrógeno inorgánico, tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio; o una combinación de los mismos. La composición puede incluir, como fuente de fósforo, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato de potasio. Además, la composición puede incluir láminas que contienen sodio correspondientes a la fuente de fósforo, y sales metálicas, tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, un medio de cultivo puede incluir aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados.

En el presente documento, también se desvela un método para producir los L-aminoácidos L-treonina o L-triptófano, incluyendo el método: cultivar el microorganismo recombinante que produce el L-aminoácido; y recoger el L-aminoácido del producto del cultivo.

El microorganismo recombinante que produce el L-aminoácido se define de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

El L-aminoácido se puede seleccionar del grupo que consiste en L-treonina o L-triptófano. El cultivo del microorganismo recombinante se puede lograr de acuerdo con un medio de cultivo apropiado y las condiciones de cultivo que son bien conocidas en la técnica. Además, un experto en la materia puede ajustar adecuadamente un medio de cultivo y las condiciones de cultivo de acuerdo con el microorganismo seleccionado. El método de cultivo puede incluir un cultivo discontinuo, un cultivo continuo, un cultivo alimentado por lotes o una combinación de los mismos.

El medio de cultivo puede incluir una variedad de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno e ingredientes de elementos traza.

Las fuentes de carbono pueden incluir, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcohol, tal como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, o una combinación de los mismos. El cultivo del microorganismo recombinante se puede realizar mediante el uso de glucosa como fuente de carbono. Las fuentes

de nitrógeno pueden incluir, por ejemplo, fuentes de nitrógeno orgánico, tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maíz (CSL) y harina de soja; y fuentes de nitrógeno inorgánico, tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio; o una combinación de los mismos. El medio de cultivo puede incluir, como fuente de fósforo, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato de potasio. Además, el medio de cultivo puede incluir láminas que contienen sodio correspondientes a la fuente de fósforo, y sales metálicas, tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, el medio de cultivo puede incluir aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. El medio o los ingredientes individuales del medio se pueden añadir al medio de cultivo en forma discontinua o continua.

Además, se pueden añadir compuestos, tales como hidróxido de amonio, hidróxido potásico, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico al medio de cultivo durante el cultivo del microorganismo recombinante de una manera apropiada, a fin de ajustar el pH del medio de cultivo. Además, se pueden usar agentes antiespumantes, tales como poliglicoléster de ácido graso, durante el cultivo del microorganismo recombinante, para suprimir la producción de burbujas de aire. Para mantener las condiciones aeróbicas del medio de cultivo, se puede inyectar oxígeno o gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) en el medio de cultivo. En este caso, una temperatura del medio de cultivo puede estar normalmente en un intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C. Un período de cultivo del microorganismo recombinante puede durar hasta que se obtenga una cantidad deseada de L-aminoácido, y por ejemplo, el cultivo del microorganismo recombinante puede durar de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 160 horas.

La recogida del L-aminoácido del producto de cultivo se puede realizar mediante métodos de cultivo apropiados conocidos en la técnica, tal como un cultivo discontinuo, un cultivo continuo o un cultivo alimentado por lotes, para recoger o recuperar el L-aminoácido producido en el producto de cultivo.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con un aspecto, un microorganismo que tiene eliminada o disminuida la actividad de al menos una proteína seleccionada de entre adenosina desaminasa y AMP nucleosidasa puede usarse para producir L-treonina o L-triptófano.

De acuerdo con otro aspecto, se puede usar un método de producción de un L-aminoácido para producir L-treonina o L-triptófano de una manera eficaz.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un gráfico que muestra los niveles de ATP en una cepa productora de L-treonina tras la eliminación del gen realizada de acuerdo con la presente divulgación.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra los niveles de ATP en una cepa productora de L-triptófano tras la eliminación del gen realizada de acuerdo con la presente divulgación.

Modo de la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son para fines únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de la cepa productora de L-treonina y la cepa productora de L-triptófano, teniendo cada una de ellas una actividad debilitada de una proteína codificada por un gen add o un gen amn

En las cepas productoras de L-treonina, es decir, KCICM10910P (patente coreana n.º 2009-0076389) y KCCM-10132 (patente coreana n.º 2000-0013853), y la cepa productora de L-triptófano, es decir, KCCM10812P (publicación de patente coreana n.º 10-0792095), se eliminaron genes que codifican la Add y la Amn mediante recombinación homóloga. Cada uno de los genes add y amn que se eliminarán incluye una secuencia de bases de SEQ ID NO: 13 y una secuencia de bases de SEQ ID NO: 15.

En detalle, se usó una inactivación por etapas, que es una técnica para construir un mutante usando lambda Red recombinasa desarrollada por Datsenko KA *et al.* (*Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, (2000) 97:6640-6645). Para confirmar la inserción del producto de amplificación en el gen, se usó como marcador un gen resistente al cloranfenicol de pUCprmflox (patente coreana n.º 2009-007554). Luego, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (en adelante, "PCR") usando pUCprmflox como molde, un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 2 que tienen una parte de las secuencias de bases de estos dos genes y una parte de la secuencia de bases del gen resistente al cloranfenicol de pUCprmflox, y un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 7 y 8 en las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, y el alargamiento a 72 °C durante 1 minuto, lo que resulta en la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 1.200 pb.

El fragmento de ADN obtenido mediante la amplificación por PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, se eluyó y se usó como molde para la PCR secundaria. La PCR secundaria se realizó usando el producto de la PCR primario eluido como molde, un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 3 y 4 que tienen 20 pb de una secuencia complementaria a las regiones 5' y 3' del fragmento de ADN primario y además tienen las regiones 5' y 3' de los genes, un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 9 y 10 en las siguientes condiciones: 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos, y el alargamiento a 72 °C durante 1 minuto, lo que da lugar a la amplificación de 4 tipos de un fragmento de gen de aproximadamente 1.300 pb. Se sometieron los fragmentos de ADN obtenidos a partir de ello a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, se eluyeron y se usaron en la recombinación.

E. coli, que se transformó con un plásmido pKD46 de acuerdo con el método desarrollado por Datsenko K. A. *et al* (*Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, (2000) 97:6640-6645), se preparó como una cepa competente, y la transformación se realizó mediante la introducción del fragmento del gen de 1.300 pb que se obtuvo por PCR. Las cepas obtenidas se seleccionaron en un medio LB complementado con cloranfenicol. Por consiguiente, se confirmó una eliminación de los genes mediante un producto de PCR de aproximadamente 1.440 pb y 2.104 pb obtenido mediante PCR usando un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 5 y 6, y un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 11 y 12.

Tras la eliminación del plásmido pKD46, se introdujo la cepa recombinante primaria de *E. coli* que tiene resistencia al cloranfenicol con un plásmido pJW168 para eliminar el gen marcador del cloranfenicol de la cepa (*Gene*, (2000) 247, 255-264). En las células microbianas que se obtuvieron finalmente, se confirmó una eliminación de los genes mediante un producto de PCR de aproximadamente 340 pb y 1.004 pb obtenido mediante PCR usando un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 5 y 6, y un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 11 y 12.

Se realizó una eliminación del gen *amm* de la misma manera que se ha descrito anteriormente mediante el uso de una cepa en la que se eliminó el gen *add*, un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 5 y 6, y un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 11 y 12, y por consiguiente, se confirmó una doble eliminación de estos dos genes.

De acuerdo con el método descrito anteriormente, se prepararon 6 tipos de cepas productoras de L-treonina, es decir, una cepa KCCM10910PΔ*add*, una cepa KCCM10910PΔ*amn*, una cepa KCCM10910PΔ*add*Δ*amn*, una cepa KCCM-10132Δ*add*, una cepa KCCM-10132Δ*amn* y una cepa KCCM-10132Δ*add*Δ*amn*. Además, se prepararon 3 tipos de cepas productoras de L-triptófano, es decir, una cepa KCCM10812PΔ*add*, una cepa KCCM10812PΔ*amn* y una cepa KCCM10812PΔ*add*Δ*amn*.

Ejemplo 2. Medición de los niveles de ATP en la cepa productora de L-treonina y la cepa productora de L-triptófano

Para cuantificar los niveles reales de ATP encontrados en las cepas del Ejemplo 1, se usó el método de "Efficient Method for Quantitative determination of Cellular ATP Synthetic Activity" desarrollado por KIYOTAKA Y *et al* (*J Biom Scie*, (2006) V11: n.º 3: PP310-17) de acuerdo con el uso de la luciferasa. En un medio líquido LB que contiene glucosa, se cultivaron las cepas del Ejemplo 1 que tienen diferentes transformaciones genéticas durante la noche. Tras eliminar el sobrenadante por centrifugación, se lavaron las células microbianas con una solución de Tris-Cl 100 mM (pH 7,5) y luego se trataron con una solución tampón permeable (PB) (glucosa al 40 % [v/v], Triton X-100 al 0,8 % [v/v]) durante 30 minutos, transportando así el ATP intracelular hacia el exterior. Después de la separación del sobrenadante por centrifugación nuevamente, se mezcló el resultante con luciferina, que se usa como un sustrato de luciferasa. Después de 10 minutos de reacción, se midió el grado de desarrollo del color de la luciferasa usando un luminómetro para cuantificar los niveles de ATP. Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2. Todos los valores resultantes fueron valores medios obtenidos mediante experimentos que se repitieron 3 veces.

Como se muestra en las FIG. 1 y 2, en comparación con las cepas madre sin la eliminación del gen (es decir, la cepa productora de L-treonina y la cepa productora de L-triptófano) y las cepas del Ejemplo 1, se confirmó que los niveles de ATP de las cepas del Ejemplo 1 resultaron haber aumentado. Además, se confirmó que los niveles de ATP aumentaron aún más en las cepas que tenían la eliminación de los genes *add* y *amn* en combinaciones, en lugar de las cepas que tenían la eliminación de un solo gen.

Ejemplo 3. Confirmación de los efectos de la cepa productora de L-treonina que tiene actividad debilitada de las proteínas codificadas por los genes *add* y *amn* de *E. coli* en medio que contiene glucosa

En la cepa productora de L-treonina (KCCM10910P) del Ejemplo 1, se eliminaron los genes *add* y *amn* por separado o en combinación, para proceder a una prueba de potencia con respecto a las cepas que tenían niveles aumentados de ATP intracelular usando glucosa como fuente de carbono.

Las cepas que tenían diferentes transformaciones genéticas se cultivaron en el medio sólido LB durante una noche en una incubación a 33 °C. Posteriormente, se inoculó 1 bucle de platino de cada una de las células microbianas en 25 ml de medio de titulación que contenía glucosa como se muestra en la composición de la siguiente Tabla 1, y después, se cultivó en una incubadora a 33 °C y a 200 rpm durante 50 horas. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 2. Todos los valores resultantes eran valores medios obtenidos de 3 matraces.

[Tabla 1]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	5 mg
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	30 g
pH	6,8

[Tabla 2]

Cepa	DO	Consumo de glucosa (g/l)*	L-treonina (g/l)**
KCCM10910P	25,8	30,3	31,5
KCCM10910P Δ add	23,7	33,9	32,7
KCCCM10910P Δ amn	22,9	35,7	33,4
KCCM 10910P Δ add Δ amn	22,7	36,0	33,6
*Valor medido a las 30 h			
**Valor medido a las 50 h			

- 5 Como se muestra en la Tabla 2 anterior, se confirmó que las cepas que tenían la eliminación génica desvelada en el presente documento dieron lugar a un mayor consumo de glucosa en aproximadamente un 18,8 % en comparación con el consumo de glucosa de la cepa madre. También se confirmó que las cantidades de treonina producidas en las cepas aumentaron en aproximadamente un 6,6 % en comparación con la cantidad de treonina producida en la cepa madre. Estos resultados indican que, en consideración a los niveles de ATP mostrados en la FIG. 1, la actividad de las cepas transformadas se aumentó por el aumento de los niveles de ATP de las mismas, y por consiguiente, se mejoraron las tasas de consumo de glucosa o la capacidad de producción del aminoácido de las cepas transformadas.

- 15 En este sentido, la cepa KCCM10910P Δ add Δ amn de *E. coli* que tiene tasas de consumo de glucosa y capacidad de producción de treonina potenciadas se denominó "CA03-8254P" (Número de registro: KCCM11494P, depositada en el Centro de Cultivo de Microorganismos coreano (KCCM)) el 9 de diciembre de 2013).

Ejemplo 4. Confirmación de los efectos de la cepa productora de L-treonina que tiene actividad debilitada de las proteínas codificadas por los genes add y amn de *E. coli* en medio que contiene glucosa

- 20 En la cepa productora de L-treonina (KCCM-10132) del Ejemplo 1, se eliminaron los genes add y amn por separado o en combinación, para proceder a una prueba de potencia con respecto a las cepas que tenían niveles aumentados de ATP intracelular usando glucosa como fuente de carbono.

- 25 Las cepas que tenían diferentes transformaciones genéticas se cultivaron en el medio sólido LB durante una noche en una incubación a 33 °C. Posteriormente, se inoculó 1 bucle de platino de cada una de las células microbianas en 25 ml de medio de titulación que contenía glucosa como se muestra en la composición de la siguiente Tabla 1, y después, se cultivó en una incubadora a 33 °C y a 200 rpm durante 50 horas. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 3. Todos los valores resultantes eran valores medios obtenidos de 3 matraces.

30

[Tabla 3]

Cepa	DO	Consumo de glucosa (g/l)*	L-treonina (g/l)**
KCCM-10132	25,8	32,0	20,2
KCCM-10132 Δ add	22,7	34,0	21,0

(continuación)

Cepa	DO	Consumo de glucosa (g/l)*	L-treonina (g/l)**
KCCM-10132 Δ amn	22,7	35,5	21,5
KCCM-10132 Δ add Δ amn	23,0	36,2	21,5
*Valor medido a las 30 h **			
Valor medido a las 50 h			

Como se muestra en la Tabla 3 anterior, se confirmó que las cepas que tenían la eliminación génica desvelada en el presente documento dieron lugar a un mayor consumo de glucosa en aproximadamente un 13 % en comparación con el consumo de glucosa de la cepa madre. También se confirmó que las cantidades de treonina producidas en las cepas aumentaron en aproximadamente un 6,4 % en comparación con la cantidad de treonina producida en la cepa madre.

Ejemplo 5. Confirmación de los efectos de la cepa productora de L-triptófano que tiene actividad debilitada de las proteínas codificadas por los genes add y amn de *E. coli* en medio que contiene glucosa

En la cepa productora de L-triptófano (KCCM10812P) del Ejemplo 1, se eliminaron los genes add y amn por separado o en combinación, para proceder a una prueba de potencia con respecto a las cepas que tenían niveles aumentados de ATP intracelular usando glucosa como fuente de carbono.

Para proceder con la prueba de potencia, se inoculó 1 bucle de platino de cada una de las células microbianas en 25 ml de medio de titulación que contenía glucosa como se muestra en la composición de la siguiente Tabla 4, y después, se cultivó en una incubadora a 37 °C y a 200 rpm durante 48 horas. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 5. Todos los valores resultantes eran valores medios obtenidos de 3 matraces.

[Tabla 4]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	60 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g
Citrato de sodio	5 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	40 g
Fenilalanina	0,15 g
Tirosina	0,1 g
pH	6,8

[Tabla 5]

Cepa	DO	Consumo de glucosa (g/l)*	L-triptófano (g/l)**
KCCM10812P	18,2	34,5	5,92
KCCM10812P Δ add	17,7	36,8	6,90
KCCM10812P Δ amn	17,9	38,0	7,15
KCCM10812P Δ add Δ amn	18,0	38,0	7,50
*Valor medido a las 33 h			
Valor medido a las 48 h			

Como se muestra en la Tabla 5 anterior, se confirmó que las cepas que tenían la eliminación génica desvelada en el presente documento dieron lugar a un mayor consumo de glucosa en aproximadamente un 10 % en comparación

con el consumo de glucosa de la cepa madre. También se confirmó que las cantidades de triptófano producidas en las cepas aumentaron en aproximadamente un 26,6 % en comparación con la cantidad de triptófano producida en la cepa madre. Estos resultados indican que, en consideración a los niveles de ATP mostrados en la FIG. 2, la actividad de las cepas transformadas se aumentó por el aumento de los niveles de ATP de las mismas, y por consiguiente, se mejoraron las tasas de consumo de glucosa o la capacidad de producción del aminoácido de las cepas transformadas.

Se ha de entender que las realizaciones ilustrativas descritas en el presente documento deben considerarse solo en un sentido descriptivo y no con fines limitantes. Las descripciones de características o aspectos dentro de cada realización deben considerarse normalmente disponibles para otras características o aspectos similares en otras realizaciones. Si bien una o más realizaciones de la presente invención se han descrito con referencia a las figuras, los expertos en la materia entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la presente invención según lo definido por las siguientes reivindicaciones.

[Número de registro]

Institución depositaria: Centro de Cultivo de Microorganismos coreano (internacional)

Número de registro: KCCM11494P

Fecha del depósito: lunes 9 de diciembre de 2013

<110> CJ CheilJedang Coporation

<120> Microorganismos que tienen una productividad de L-aminoácidos potenciada y proceso de producción de L-aminoácidos en el que se usan los mismos

<130> PX048448

<150> KR 2014/033698

<151> 21/03/2014

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

caacattcgt cccagacca ttcttgaact tggccgccag tataatatct aggtgacact 60

atagaacgcg 70

<210> 2

<211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

ggaaagccat ttccagacca ttaatctgtg cctggcggat ttgctcgcgg tagtgatct 60

gatgggtacc 70

<210> 3

<211> 70

ES 2 728 970 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> cebador		
	<400> 3		
	atgattgata ccaccctgcc attaactgat atccatcgcc accttgatgg caacattcgt	60	
	ccccagacca	70	
10			
	<210> 4		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15			
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 4		
20			
	ttacttcgcg ggcacttttt ctgcagtgcc gcgtttttcc tcagcgtga ggaaagccat	60	
	ttccagacca	70	
	<210> 5		
	<211> 26		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
30			
	<400> 5		
	tgtggctgga ttaattaacg ccatcc	26	
35			
	<210> 6		
	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
40			
	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 6		
45	gcgcgacttt gtccttgca tg	22	
	<210> 7		
	<211> 70		
	<212> ADN		
50	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
55	<400> 7		

ES 2 728 970 T3

		agcctggcga agatcatccg atcttcgcct tacacttttg tttcacattt ctgtgacata	60
		ctatcggatg	70
5	<210> 8 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> cebador		
	<400> 8		
		gaaatagcgc cttcataaaa acggttagcc tggccgggaa gtttaatctc gccatgcaac	60
		ggtttatctg	70
15	<210> 9 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Cebador		
	<400> 9		
		ctgtgacata ctatcggatg tgcggttaatt gtatggaaca ggagacacac aggtgacact	60
25		atagaacgcg	70
30	<210> 10 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> cebador		
35	<400> 10		
		gccatgcaac ggtttatctg aaacacacag tagtgtcccg tatggcacgc tagtggatct	60
		gatgggtacc	70
40	<210> 11 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> cebador		
	<400> 11		
	cattgcgcat gacatggtgg t	21	
50	<210> 12 <211> 21		

ES 2 728 970 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 12
 gtgcctgctt tgcacgttca a 21

 10 <210> 13
 <211> 1002
 <212> ADN
 <213> *E.coli*

 15 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1002)
 <223> add

 20 <400> 13

 atgattgata ccaccctgcc attaactgat atccatcgcc accttgatgg caacattcgt 60
 cccagacca ttcttgaact tggccgccag tataatatct cgcttcctgc acaatccctg 120
 gaaacactga ttccccacgt tcaggtcatt gccaacgaac ccgatctggt gagctttctg 180
 accaaaacttg actggggcgt taaagtcttc gcctctcttg atgcctgtcg ccgcgtggca 240
 tttgaaaaca ttgaagatgc agcccgtcac ggcctgcact atgtcgagct gcgtttttca 300
 ccaggctaca tggcaatggc acatcagctg cctgtagcgg gtgttgctga agcgggtgatc 360
 gatggcgtag gtgaagggtg ccgcaccttt ggtgtgcagg cgaagcttat cggcattatg 420
 agccggacct tcggcgaagc cgcctgtcag caagagctgg aggccttttt agcccaccgt 480
 gaccagatta ccgcacttga tttagccggt gatgaacttg gtttcccggg aagtctgttc 540
 ctttctcact tcaaccgcgc gcgtgatgcg ggctggcata ttaccgtcca tgcaggcgaa 600
 gctgccgggc cggaaagcat ctggcaggcg attcgtgaac tgggtgcgga gcgtattgga 660
 catggcgtaa aagccattga agatcgggcg ctgatggatt ttctcgccga gcaacaaatt 720
 ggtattgaat cctgtctgac ctccaatatt cagaccagca ccgtagcaga gctggctgca 780
 catccgctga aaacgttcct tgagcatggc attcgtgcca gcattaacac tgacgatccc 840
 ggcgtacagg gagtggatat cattcacgaa tataaccgttg ccgcgccagc tgctgggtta 900
 tcccgcgagc aaatccgccg ggcacagatt aatggtctgg aaatggcttt cctcagcgct 960
 gagggaaaaac gcgcactgcg agaaaaagtc gccgcgaagt aa 1002

 <210> 14
 25 <211> 333
 <212> PRT
 <213> *E.coli*

 <400> 14
 30

Met Ile Asp Thr Thr Leu Pro Leu Thr Asp Ile His Arg His Leu Asp
1 5 10 15

Gly Asn Ile Arg Pro Gln Thr Ile Leu Glu Leu Gly Arg Gln Tyr Asn
20 25 30

Ile Ser Leu Pro Ala Gln Ser Leu Glu Thr Leu Ile Pro His Val Gln
35 40 45

Val Ile Ala Asn Glu Pro Asp Leu Val Ser Phe Leu Thr Lys Leu Asp
50 55 60

Trp Gly Val Lys Val Leu Ala Ser Leu Asp Ala Cys Arg Arg Val Ala
65 70 75 80

Phe Glu Asn Ile Glu Asp Ala Ala Arg His Gly Leu His Tyr Val Glu
85 90 95

Leu Arg Phe Ser Pro Gly Tyr Met Ala Met Ala His Gln Leu Pro Val
100 105 110

Ala Gly Val Val Glu Ala Val Ile Asp Gly Val Arg Glu Gly Cys Arg
115 120 125

Thr Phe Gly Val Gln Ala Lys Leu Ile Gly Ile Met Ser Arg Thr Phe
130 135 140

Gly Glu Ala Ala Cys Gln Gln Glu Leu Glu Ala Phe Leu Ala His Arg
145 150 155 160

Asp Gln Ile Thr Ala Leu Asp Leu Ala Gly Asp Glu Leu Gly Phe Pro
165 170 175

Gly Ser Leu Phe Leu Ser His Phe Asn Arg Ala Arg Asp Ala Gly Trp
180 185 190

His Ile Thr Val His Ala Gly Glu Ala Ala Gly Pro Glu Ser Ile Trp
195 200 205

Gln Ala Ile Arg Glu Leu Gly Ala Glu Arg Ile Gly His Gly Val Lys
210 215 220

Ala Ile Glu Asp Arg Ala Leu Met Asp Phe Leu Ala Glu Gln Gln Ile
225 230 235 240

Gly Ile Glu Ser Cys Leu Thr Ser Asn Ile Gln Thr Ser Thr Val Ala
245 250 255

Glu Leu Ala Ala His Pro Leu Lys Thr Phe Leu Glu His Gly Ile Arg
260 265 270

Ala Ser Ile Asn Thr Asp Asp Pro Gly Val Gln Gly Val Asp Ile Ile
275 280 285

His Glu Tyr Thr Val Ala Ala Pro Ala Ala Gly Leu Ser Arg Glu Gln
290 295 300

Ile Arg Gln Ala Gln Ile Asn Gly Leu Glu Met Ala Phe Leu Ser Ala
305 310 315 320

Glu Glu Lys Arg Ala Leu Arg Glu Lys Val Ala Ala Lys
325 330

ES 2 728 970 T3

<210> 15
<211> 1455
<212> ADN
<213> *E.coli*

5

<220>
<221> gen
<222> (1)..(1455)
<223> amn

10

<400> 15

```

atgaataata agggctccgg tctgacccca gctcaggcac tggataaaact cgacgcgctg      60
tatgagcaat ctgtagtcgc attacgcaac gccattggca actatattac aagtggcgaa      120
ttacctgatg aaaacgcccg caaacaaggt ctttttgtct atccatcact gaccgtaacc      180
tgggacggta gcacaaccaa tcccccaaaa acgcgcgcat ttggtcgctt taccacgca      240
ggcagctaca ccaccacgat tactcgccct actctctttc gttcgtatct taatgaacaa      300
cttacgttgc tgtatcagga ttatggtgcg catatctcag tgcaaccctc gcagcatgaa      360
atcccttata cttatgtcat cgatggctct gaattgacac ttgatcgctc aatgagcgct      420
gggttaactc gctacttccc gacaacagaa ctggcgcaaa ttggcgatga aactgcagac      480
ggcatttata atccaactga attctcccg ctatcgcat ttgatgcgcg ccgcgtcgat      540
ttttccctcg cacggttgcg ccattatacc ggtacgccag ttgaacattt tcagccgttc      600
gtcttggtta ccaactacac acgttatgtg gatgaattcg ttcgttgggg atgcagccag      660
atcctcgatc ctgatagtc ctaattgcc cttctctgtg ctggcgggaa ctggatcacc      720
gccgaaaccg aagcgccaga agaagccatt tccgacctg catggaaaaa acatcagatg      780
ccagcatggc atttaattac cgccgatggc cagggtatta ctctggtgaa tattggcggtg      840
ggaccgtcaa atgctaaaac catctcgcat catctggcag tgctacgcc ggatgtctgg      900
ttgatgattg gtcactgtgg cggattacgt gaaagtcagg ccattggcga ttatgtactt      960
gcacacgctt atttacgca tgaccacgtt cttgatgcgg ttctgccgcc cgatattct      1020
attccagca ttgctgaagt gcaacgtgcg ctttatgacg ccaccaagct ggtgagcggc      1080
aggcccgggt aggaagtcaa acagcggtc cgtactggta ctgtggtaac cacagatgac      1140
aggaactggg aattacgtta ctacgcttct gcacttcgtt ttaacttaag ccgggccgta      1200
gcaattgata tggaaagtgc aaccattgcc gcgcaaggat atcgtttccg cgtgccatac      1260
gggacactac tgtgtgtttc agataaacgg ttgcatggcg agattaaact tcccggccag      1320
gctaaccgtt tttatgaagg cgctatttcc gaacatctgc aaattggcat tcgggcgcat      1380
gatttgctgc gcgcagaagg cgaccgactg cattcgcgta aattacgaac ctttaatgag      1440
ccgccgttcc gataa

```

15

<210> 16
<211> 484
<212> PRT
<213> *E.coli*

20

<400> 16

ES 2 728 970 T3

```

Met Asn Asn Lys Gly Ser Gly Leu Thr Pro Ala Gln Ala Leu Asp Lys
 1           5           10           15

Leu Asp Ala Leu Tyr Glu Gln Ser Val Val Ala Leu Arg Asn Ala Ile
 20           25           30

Gly Asn Tyr Ile Thr Ser Gly Glu Leu Pro Asp Glu Asn Ala Arg Lys
 35           40           45

Gln Gly Leu Phe Val Tyr Pro Ser Leu Thr Val Thr Trp Asp Gly Ser
 50           55           60

Thr Thr Asn Pro Pro Lys Thr Arg Ala Phe Gly Arg Phe Thr His Ala
 65           70           75           80

Gly Ser Tyr Thr Thr Thr Ile Thr Arg Pro Thr Leu Phe Arg Ser Tyr
 85           90           95

Leu Asn Glu Gln Leu Thr Leu Leu Tyr Gln Asp Tyr Gly Ala His Ile
100           105           110

Ser Val Gln Pro Ser Gln His Glu Ile Pro Tyr Pro Tyr Val Ile Asp
115           120           125

Gly Ser Glu Leu Thr Leu Asp Arg Ser Met Ser Ala Gly Leu Thr Arg
130           135           140

Tyr Phe Pro Thr Thr Glu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Thr Ala Asp
145           150           155           160

Gly Ile Tyr His Pro Thr Glu Phe Ser Pro Leu Ser His Phe Asp Ala
165           170           175

Arg Arg Val Asp Phe Ser Leu Ala Arg Leu Arg His Tyr Thr Gly Thr
180           185           190

Pro Val Glu His Phe Gln Pro Phe Val Leu Phe Thr Asn Tyr Thr Arg
195           200           205

Tyr Val Asp Glu Phe Val Arg Trp Gly Cys Ser Gln Ile Leu Asp Pro
210           215           220

Asp Ser Pro Tyr Ile Ala Leu Ser Cys Ala Gly Gly Asn Trp Ile Thr
225           230           235           240

Ala Glu Thr Glu Ala Pro Glu Glu Ala Ile Ser Asp Leu Ala Trp Lys
245           250           255

Lys His Gln Met Pro Ala Trp His Leu Ile Thr Ala Asp Gly Gln Gly
260           265           270

Ile Thr Leu Val Asn Ile Gly Val Gly Pro Ser Asn Ala Lys Thr Ile
275           280           285

Cys Asp His Leu Ala Val Leu Arg Pro Asp Val Trp Leu Met Ile Gly
290           295           300

His Cys Gly Gly Leu Arg Glu Ser Gln Ala Ile Gly Asp Tyr Val Leu
305           310           315           320

Ala His Ala Tyr Leu Arg Asp Asp His Val Leu Asp Ala Val Leu Pro
325           330           335

Pro Asp Ile Pro Ile Pro Ser Ile Ala Glu Val Gln Arg Ala Leu Tyr
340           345           350

Asp Ala Thr Lys Leu Val Ser Gly Arg Pro Gly Glu Glu Val Lys Gln
355           360           365

```

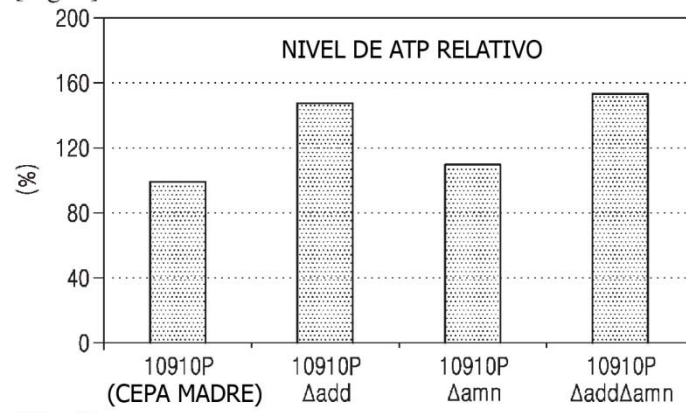
ES 2 728 970 T3

Arg	Leu	Arg	Thr	Gly	Thr	Val	Val	Thr	Thr	Asp	Asp	Arg	Asn	Trp	Glu
370						375					380				
Leu	Arg	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ala	Leu	Arg	Phe	Asn	Leu	Ser	Arg	Ala	Val
385					390					395					400
Ala	Ile	Asp	Met	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Ala	Ala	Gln	Gly	Tyr	Arg	Phe
				405					410					415	
Arg	Val	Pro	Tyr	Gly	Thr	Leu	Leu	Cys	Val	Ser	Asp	Lys	Pro	Leu	His
			420					425					430		
Gly	Glu	Ile	Lys	Leu	Pro	Gly	Gln	Ala	Asn	Arg	Phe	Tyr	Glu	Gly	Ala
		435					440					445			
Ile	Ser	Glu	His	Leu	Gln	Ile	Gly	Ile	Arg	Ala	Ile	Asp	Leu	Leu	Arg
	450					455					460				
Ala	Glu	Gly	Asp	Arg	Leu	His	Ser	Arg	Lys	Leu	Arg	Thr	Phe	Asn	Glu
465					470					475					480
Pro	Pro	Phe	Arg												

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo recombinante que tiene capacidad de producción potenciada de un L-aminoácido, en el que se elimina o se disminuye la actividad de al menos una de entre adenosina desaminasa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y AMP nucleosidasa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, perteneciendo el microorganismo recombinante al género *Escherichia*, y siendo el L-aminoácido L-treonina o L-triptófano.
- 10 2. El microorganismo recombinante de la reivindicación 1, siendo el microorganismo recombinante *Escherichia coli*.
3. Un método de producción de L-aminoácidos, comprendiendo el método:
cultivar el microorganismo recombinante de las reivindicaciones 1 o 2; y
15 recoger un L-aminoácido del cultivo, en el que el L-aminoácido es L-treonina o L-triptófano.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

