

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 355**

51 Int. Cl.:

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2015 PCT/KR2015/003625**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15178586**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2015 E 15795904 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3147351**

54 Título: **Microorganismo que tiene un nivel de energía intracelular mejorado y procedimiento de producción de L-aminoácidos utilizando el mismo**

30 Prioridad:

23.05.2014 KR 20140062593

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

17.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JANG, JUNO;
PARK, HYE MIN;
LEE, KWANG HO;
LEE, KEUN CHEOL y
HONG, HYEONG PYO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 754 355 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

Microorganismo que tiene un nivel de energía intracelular mejorado y procedimiento de producción de L-aminoácidos utilizando el mismo

Campo técnico

- 5 La presente solicitud se refiere a un microorganismo recombinante que tiene un nivel de energía intracelular mejorado y a un procedimiento para producir L-aminoácidos utilizando el microorganismo.

Antecedentes de la técnica

- 10 Para la producción de un material deseado utilizando un microorganismo, se han utilizado principalmente planteamientos específicos del material deseado, tales como la mejora de la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la producción del material deseado o la eliminación de genes innecesarios. Por ejemplo, se han desarrollado varias cepas útiles que incluyen a *E. coli* capaces de producir un L-aminoácido deseado con un alto rendimiento mediante la mejora de una ruta biosintética del L-aminoácido. La producción de alto rendimiento de los materiales útiles deseados utilizando microorganismos requiere la producción y el mantenimiento de suficiente energía.

- 15 Para la biosíntesis *in vivo* de materiales tales como proteínas, ácidos nucleicos, etc., se utiliza energía conservada en forma de NADH, NADPH y ATP (adenosina-5'-trifosfato). Particularmente, el ATP es un portador de energía que transporta la energía química producida en reacciones metabólicas a diversas actividades de los organismos.

- 20 El ATP se produce principalmente en procesos metabólicos de microorganismos. Las principales vías de producción de ATP intracelular son la fosforilación a nivel de sustrato que tiene lugar a través de la glucólisis o la fosforilación oxidativa que produce ATP a través del sistema de transporte de electrones utilizando el poder reductor acumulado en el NADH, etc., a través de la glucólisis. El ATP generado se consume *in vivo* en actividades tales como la biosíntesis, movimiento, transducción de señales y división celular. Por lo tanto, los microorganismos industriales utilizados para la producción de los materiales útiles deseados generalmente muestran una alta demanda de ATP. Por consiguiente, se han realizado estudios para mejorar la productividad aumentando los niveles de energía intracelular en la
- 25 producción en masa de materiales útiles deseados (Biotechnol Adv (2009) 27:94-101).

- El hierro es uno de los elementos esenciales para el mantenimiento de la homeostasis de los microorganismos, y *E. coli* utiliza varias rutas para la absorción de hierro (Mol Microbiol (2006) 62:120-131). Una de las rutas de absorción de hierro es absorber hierro a través de canales complejos de FhuCDB formados por proteínas FhuC, FhuD y FhuB. Recientemente, se reveló que, en presencia de exceso de L-triptófano en las células, la proteína TrpR que regula la
- 30 expresión de genes implicados en la biosíntesis de L-triptófano forma un complejo con L-triptófano y, a su vez, este complejo se une a una región reguladora del operón fhuCDB, sugiriendo la posibilidad de una correlación entre la absorción de hierro a través del complejo proteico FhuCDB y la biosíntesis de L-triptófano. Sin embargo, la función del complejo proteico FhuCDB en la biosíntesis de L-triptófano, y su efecto sobre la absorción de hierro aún no se tiene clara (Nat Chem Biol (2012) 8:65-71).

- 35 El documento EP 1 829 965 se refiere a una cepa mutante de *E. coli* que tiene un ADN cromosómico que es al menos 470 kpb más corto que el de una cepa de *E. coli* de tipo salvaje, y que muestra la propiedad de que el número de células después de un cierto período en cultivo es mayor que el de una cepa de tipo salvaje.

- 40 El documento WO 2007/024756 se refiere a cepas de *E. coli* MGI 655 con el genoma reducido. El documento WO 2007/024756 menciona cepas que tienen una o más de una tasa de crecimiento, eficiencia de transformación, expresión de proteínas, producción de ADN, rendimiento de ADN y/o calidad de ADN igual o mejorada en comparación con la cepa parental y las cepas disponibles comercialmente.

Mademidis y col., 1998, Molecular and General Genetics, 258 (12): 156-165 se refiere a la actividad transportadora de derivados de FhuA, FhuC, FhuD y FhuB en un sistema libre de efectos polares y a la estequiometría de los componentes involucrados en la absorción de ferricromo.

- 45 El documento WO 02/077183 se refiere a secuencias de ácidos nucleicos antisentido que inhiben la proliferación de procariotas.

- Los presentes inventores han estudiado procedimientos para mejorar los niveles de ATP y aumentar la capacidad de producción de materiales deseados útiles tales como los L-aminoácidos, y descubrieron que los niveles de ATP intracelular pueden mejorarse mediante la inactivación de la función del complejo proteico FhuCDB mediante la
- 50 eliminación del gen fhuCDB y, como resultado, se puede aumentar la capacidad de producción de los materiales deseados, completando de esta forma la presente solicitud.

Descripción detallada de la invención**PROBLEMA TÉCNICO**

Un objeto de la presente solicitud es proporcionar un microorganismo que tiene un nivel de ATP intracelular mejorado.

Otro objeto de la presente solicitud es proporcionar un procedimiento para producir un material deseado utilizando el microorganismo que tiene el nivel de ATP intracelular mejorado.

SOLUCIÓN TÉCNICA

5 La invención es tal y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir L-aminoácidos, comprendiendo el procedimiento:

- 10 cultivar un microorganismo del género *Escherichia* en un medio y recuperar L-aminoácidos de los medios de cultivo o del microorganismo; en el que el microorganismo tiene un nivel de ATP intracelular aumentado, en comparación con una cepa no modificada, en el que una o más proteínas seleccionadas de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, que constituyen un sistema de absorción de hierro, están inactivadas en el microorganismo; en el que el microorganismo del género *Escherichia* tiene una capacidad mejorada para producir L-aminoácido, en comparación con una cepa no modificada; y
- 15 en el que el L-aminoácido es L-treonina o L-triptófano.

El microorganismo es un microorganismo en el cual las actividades de una o más de la proteína FhuC, la proteína FhuD y la proteína FhuB que constituyen el sistema de absorción de hierro, están inactivadas y, por lo tanto, tiene un mayor nivel de ATP intracelular, en comparación con una cepa no modificada.

20 El término "FhuCDB", como se usa en el presente documento, es un componente de un sistema de absorción de hierro (sistema fhu) que incluye productos de expresión de fhuA, fhuC, fhuD y fhuB dispuestos en un operón. El fhuA codifica el OMP multifuncional FhuA (79 kDa) que actúa como un receptor para ferricromo-hierro, bacteriófagos, toxinas bacterianas y antibióticos. FhuA es específico de Fe³⁺-ferricromo, y actúa como un canal de apertura específica de ligando (Protein Sci 7, 1636-1638). Las otras proteínas del sistema fhu, en concreto, FhuD, FhuC y FhuB también son esenciales para las funciones del sistema de absorción de hierro. Una proteína periplásmica, FhuD y proteínas asociadas a la membrana citoplasmática, FhuC y FhuB forman el complejo FhuCDB, que funciona para transportar ferricromo y otros compuestos de Fe³⁺-hidroxamato (Fe³⁺-aerobactina, Fe³⁺-coprogen) a través de la membrana citoplasmática desde el periplasma al citoplasma (J Bacteriol 169, 3844-3849). La absorción de hierro a través del complejo FhuCDB consume una molécula de ATP, y para este proceso de absorción de hierro, un complejo proteico, TonB-ExbB-ExbD proporciona energía (FEBS Lett 274, 85-88).

30 FhuC codifica una proteína asociada a la membrana citoplasmática de 29 kDa y forma un canal para la absorción de hierro, junto con FhuD y FhuB. FhuC puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y, específicamente, FhuC puede estar codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

35 FhuD codifica una proteína asociada a la membrana citoplasmática de 31 kDa y forma un canal para la absorción de hierro, junto con FhuC y FhuB. FhuD puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y, específicamente, FhuD puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.

FhuB codifica una proteína asociada a la membrana citoplasmática de 41 kDa y forma un canal para la absorción de hierro, junto con FhuC y FhuB. FhuB puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y, específicamente, FhuB puede estar codificado por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3.

40 Específicamente, aunque las proteínas tienen actividades idénticas, hay pequeñas diferencias en las secuencias de aminoácidos entre los sujetos. Por lo tanto, FhuC, FhuD y FhuB pueden tener las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente. Además, en las secuencias de nucleótidos, se pueden hacer varias modificaciones en la región codificante siempre que no cambien las secuencias de aminoácidos de las proteínas expresadas a partir de la región codificante, debido a la degeneración de codones o teniendo en cuenta los codones preferentes por el organismo en el que se van a expresar. La secuencia de nucleótidos descrita anteriormente se proporciona solo como un ejemplo de varias secuencias de nucleótidos elaboradas mediante un procedimiento bien conocido por los expertos en la materia, pero sin limitarse al mismo.

45 El término "homología", como se usa en el presente documento, se refiere a un grado de identidad entre bases o restos de aminoácidos después de que ambas secuencias se alinean para que coincidan mejor en ciertas regiones comparables en una secuencia de aminoácidos o nucleótidos de un gen que codifica una proteína. Si la homología es suficientemente alta, los productos de expresión de los genes correspondientes pueden tener una actividad idéntica o similar. El porcentaje de la identidad de secuencia puede determinarse usando un programa de comparación de secuencias conocido, por ejemplo, BLASTN (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc), etc.

55 El término "microorganismo", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo que tiene el nivel de ATP intracelular mejorado y que es del género *Escherichia*. Específicamente, el microorganismo puede ser *E. coli*.

La "cepa no modificada", como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo que no está modificado por una técnica de biología molecular tal como la mutación o la recombinación. Específicamente, la cepa no modificada se refiere a un microorganismo antes de aumentar el nivel de ATP intracelular, en el cual el nivel intracelular de ATP se aumenta al inactivar uno o más de uno de FhuC, FhuD y FhuB que constituyen el sistema de absorción de hierro, complejo FhuCDB, teniendo así una reducción del consumo intracelular de ATP. Es decir, la cepa no modificada se refiere a un microorganismo original del cual deriva el microorganismo recombinante.

El microorganismo incluye la inactivación de uno o más de uno de FhuC, FhuD y FhuB y, específicamente, la inactivación de una combinación de FhuC, FhuD y FhuB y, más específicamente, la inactivación de todo FhuC, FhuD y FhuB.

El término "inactivación", como se usa en el presente documento, significa que la actividad de la proteína correspondiente se elimina o debilita por mutación debido a la delección, sustitución o inserción de parte o la totalidad del gen que codifica la correspondiente proteína, por modificación de una secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del gen, por modificación de la secuencia del gen cromosómico para debilitar o eliminar la actividad de la proteína, o por combinaciones de las mismas.

Específicamente, la delección de parte o de la totalidad del gen que codifica la proteína puede realizarse mediante el reemplazo de un polinucleótido que codifica una proteína diana endógena en el cromosoma, con un polinucleótido del que se elimina una secuencia parcial o con un gen marcador a través de un vector de inserción en el cromosoma bacteriano. Además, se puede inducir una mutación usando un mutágeno tal como sustancias químicas o luz UV, obteniendo de este modo un mutante que tiene la delección del gen correspondiente, pero sin limitarse al mismo.

La expresión "secuencia reguladora de la expresión", como se usa en el presente documento, una secuencia de nucleótidos que regula una expresión génica, se refiere a un segmento capaz de aumentar o disminuir la expresión de un gen particular en un sujeto, y puede incluir un promotor, un sitio de unión del factor de transcripción, un sitio de unión a ribosomas, y una secuencia que regula la terminación de la transcripción y la traducción, pero sin limitarse al mismo.

Específicamente, la modificación de la secuencia reguladora de la expresión para causar una disminución en la expresión génica puede realizarse induciendo mutaciones en la secuencia reguladora de la expresión mediante delección, inserción, sustitución conservativa o no conservativa de la secuencia de nucleótidos o una combinación de las mismas para debilitar aún más la actividad de la secuencia reguladora de la expresión, o reemplazando la secuencia reguladora de la expresión con la secuencia que tiene una actividad más débil, pero sin limitarse al mismo.

El microorganismo es un microorganismo del género *Escherichia* que tiene una capacidad de producción mejorada de los L-aminoácidos L-treonina o L-triptófano, en comparación con una cepa no modificada. En el microorganismo del género *Escherichia* de la presente solicitud, una o más de las proteínas que constituyen el complejo FhuCDB se inactivan para inactivar la vía de absorción de hierro y, por lo tanto, la absorción de hierro a través de esta vía reduce el consumo de ATP. Como resultado, el microorganismo del género *Escherichia* tiene un nivel mejorado de ATP intracelular, en comparación con la cepa no modificada y, en consecuencia, el microorganismo tiene la capacidad de producción mejorada de los L-aminoácidos L-treonina o L-triptófano.

La expresión "microorganismo que tiene la capacidad de producción mejorada" se refiere a un microorganismo que tiene una capacidad de producción mejorada de los L-aminoácidos L-treonina o L-triptófano, en comparación con una cepa no modificada o una célula parental antes de la modificación.

En una realización específica, el microorganismo puede ser *E. coli* que tiene una capacidad de producción de L-triptófano mejorada, en el que dichas una o más de FhuC, FhuD y FhuB de *E. coli* que tienen una capacidad de producción de L-triptófano se inactivaron, y que tiene un nivel de ATP intracelular mejorado, en comparación con una cepa no modificada. La *E. coli* que tiene la capacidad de producción de L-triptófano se puede obtener aumentando la expresión de un gen del operón de L-triptófano, eliminando la inhibición por retroalimentación por producto final del L-triptófano, o eliminando la inhibición y la atenuación del gen del operón de L-triptófano a nivel transcripcional, pero sin limitarse al mismo.

En una realización específica de la presente solicitud, el microorganismo puede ser *E. coli* que tiene una capacidad de producción mejorada de L-treonina, en el que dichas una o más de FhuC, FhuD y FhuB de la *E. coli* que tiene una capacidad de producción de L-treonina se inactivaron y que tiene un nivel de ATP intracelular mejorado, en comparación con una cepa no modificada. La *E. coli* que tiene la capacidad de producción de L-treonina puede obtenerse aumentando la expresión de un gen del operón de L-treonina, eliminando la inhibición por retroalimentación por producto final de la L-treonina, o eliminando la inhibición y atenuación del gen del operón de L-treonina a nivel transcripcional, pero sin limitarse al mismo.

En el procedimiento para producir L-aminoácidos de acuerdo con una realización específica de la presente solicitud, el cultivo del microorganismo que tiene la capacidad de producción de L-aminoácidos puede realizarse de acuerdo con un medio apropiado y en condiciones de cultivo conocidas en la técnica. Los expertos en la materia pueden ajustar fácilmente los procedimientos de cultivo de acuerdo con el microorganismo seleccionado. Los ejemplos de los procedimientos de cultivo incluyen los de tipo discontinuo, tipo continuo y de tipo discontinuo alimentado, pero no se

limita a los mismos.

Un medio utilizado para el cultivo debe cumplir los requisitos para el cultivo de un microorganismo específico. Los medios de cultivo para diversos microorganismos se describen en una referencia ("Manual of Methods for General Bacteriology" por la American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, 1981.). Estos medios incluyen una variedad de fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y oligoelementos. La fuente de carbono incluye hidratos de carbono tales como la glucosa, lactosa, sacarosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; lípidos tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales como el ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como el ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden utilizarse solas o en conjunto, pero sin limitarse a las mismas. La fuente de nitrógeno incluye fuentes de nitrógeno orgánico, tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz (CSL) y harina de frijol y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden utilizarse solas o en conjunto, pero sin limitarse a las mismas. Adicionalmente, el medio puede incluir dihidrógeno fosfato de potasio, hidrogeno fosfato de dipotasio y las correspondientes sales que contienen sodio de los mismos como fuente de fósforo, pero sin limitarse al mismo. También, el medio puede incluir un metal tal como el sulfato de magnesio o el sulfato de hierro. Además, también se pueden agregar aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados.

Además, para mantener el cultivo en condiciones aeróbicas, se puede inyectar oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en el cultivo. La temperatura del cultivo puede ser generalmente de 20 °C-45 °C y, específicamente, de 25 °C-40 °C. El cultivo puede continuar hasta que la producción de L-aminoácidos tales como L-treonina o L-triptófano alcance el nivel deseado y, específicamente, un tiempo de cultivo puede ser de 10 horas-100 horas.

El procedimiento para producir L-aminoácidos de acuerdo con la presente solicitud incluye la recuperación de los L-aminoácidos L-treonina o L-triptófano a partir de los medios de cultivo o del microorganismo así obtenido. La recuperación de L-aminoácidos puede realizarse mediante un procedimiento apropiado conocido en la técnica, dependiendo del procedimiento de cultivo del microorganismo de la presente solicitud, por ejemplo, de tipo discontinuo, tipo continuo o de tipo discontinuo alimentado, con el fin de purificar o recuperar los L-aminoácidos deseados del cultivo del microorganismo, pero sin limitarse al mismo.

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente solicitud, cuando un microorganismo del género *Escherichia* tiene un nivel mejorado de ATP intracelular, en comparación con una cepa no modificada, y se usa un procedimiento para producir un material deseado usando el mismo, el alto nivel de ATP intracelular mejora la expresión génica, la biosíntesis, el transporte de materiales, etc., produciendo eficientemente de esta manera el material útil deseado incluyendo proteínas, L-aminoácidos, etc.

Descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los niveles de ATP intracelular de *E. coli* de acuerdo con una realización específica de la presente solicitud, en comparación con una cepa no modificada;
 La figura 2 muestra los niveles de ATP intracelular de *E. coli* derivada del tipo salvaje que tiene una capacidad de producción de L-triptófano de acuerdo con una realización específica de la presente solicitud, en comparación con una cepa no modificada;
 La figura 3 muestra los niveles intracelulares de ATP de *E. coli* que tiene una capacidad de producción de L-treonina de acuerdo con una realización específica de la presente solicitud, en comparación con una cepa no modificada;
 La figura 4 muestra los niveles intracelulares de ATP de la *E. coli* que tiene una capacidad de producción de L-triptófano de acuerdo con una realización específica de la presente solicitud, en comparación con una cepa no modificada;
 La figura 5 muestra la capacidad de producción de L-treonina de *E. coli* que tiene una capacidad de producción de L-treonina de acuerdo con una realización específica de la presente solicitud, en comparación con una cepa no modificada; y
 La figura 6 muestra la capacidad de producción de L-triptófano de *E. coli* que tiene una capacidad de producción de L-triptófano de acuerdo con una realización específica de la presente solicitud, en comparación con una cepa no modificada.

Descripción de la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente solicitud se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no se pretende que el ámbito de la presente solicitud esté limitado por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de *E. coli* W3110 de tipo salvaje que tiene inactivación de proteínas codificadas por los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB*

En este ejemplo, los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* de *E. coli* W3110 (ATCC® 39936™) de tipo salvaje se eliminaron mediante recombinación homóloga, respectivamente.

Los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* que van a ser eliminados tienen secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente, y estos genes existen en la forma del operón de la SEQ ID NO: 4.

- 5 Para eliminar a *fhuC*, *fhuD* y *fhuB*, se realizó una inactivación en un solo paso utilizando la recombinasa lambda Red desarrollada por Datsenko KA, y col. (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97:6640-6645). A modo de marcador para confirmar la inserción en el gen, se utilizó un gen de cloranfenicol de pUCprmfloxC, que se preparó ligando un promotor *rmf* a pUC19 (New England Biolabs (USA)) y ligando un casete mutado *loxP*-CmR-*loxP* obtenido de pACYC184 (New England Biolab) al mismo (solicitud de patente coreana N.º 2009-0075549).
- 10 Primero, la reacción primaria en cadena de la polimerasa (más adelante denominada 'PCR') se realizó usando el pUCprmfloxC como una plantilla y combinaciones de cebadores de las SEQ ID NO: 8 y 9, 10 y 11, 12 y 13, y 8 y 13 que tienen una parte de los genes *fhuC* y *fhuB* y una secuencia parcial del gen de resistencia al cloranfenicol del gen pUCprmfloxC bajo las condiciones de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto, obteniendo de esta manera productos de PCR de
- 15 aproximadamente 1,2 kb, Δ*fhuC*1st, Δ*fhuD*1st, Δ*fhuB*1st y Δ*fhuCDB*1st.

A continuación, los productos de PCR de 1,2 kb, Δ*fhuC*1st, Δ*fhuD*1st, Δ*fhuB*1st y Δ*fhuCDB*1st obtenidos por PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % y luego se eluyeron y se usaron como plantilla para la PCR secundaria. La PCR secundaria se realizó usando los productos eluidos de la PCR primaria como plantillas y las combinaciones de cebadores de las SEQ ID NO: 14 y 15, 16 y 17, 18 y 19, 14 y 19 que contienen secuencias de

20 nucleótidos de 20 pb de las regiones 5' y 3' de los productos de PCR obtenidos en la PCR primaria bajo las condiciones de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto, obteniendo de esta manera productos de PCR de aproximadamente 1,3 kb, Δ*fhuC*, Δ*fhuD*, Δ*fhuB* y Δ*fhuCDB*. Los productos de PCR obtenidos de este modo se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, luego se eluyeron y se usaron en recombinación.

- 25 La *E. coli* W3110, que se transformó con un vector pKD46 de acuerdo con el procedimiento de inactivación en un paso desarrollado por Datsenko KA y col. (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97:6640-6645), se preparó a modo de cepa competente, y la transformación se realizó introduciendo el fragmento de gen de 1,3 kb obtenido mediante la PCR primaria y secundaria. Las cepas se cultivaron en el medio LB suplementado con cloranfenicol y se seleccionaron los transformantes que tienen resistencia al cloranfenicol. La eliminación de alguno o de la totalidad de *fhuC*, *fhuD* y *fhuB*
- 30 se confirmó mediante los productos de PCR de aproximadamente 4,4 kb, aproximadamente 4,3 kb, aproximadamente 3,3 kb, y aproximadamente 1,6 kb que se amplificaron por PCR utilizando genomas obtenidos de las cepas seleccionadas como plantillas y los cebadores de las SEQ ID NO: 20 y 21.

Después de la eliminación de pKD46 de las cepas recombinantes primarias que tienen resistencia al cloranfenicol obtenidas de este modo, se introdujo un vector pJW168 (Gene, (2000) 247, 255-264) en las cepas recombinantes

35 primarias que tienen resistencia al cloranfenicol para eliminar el gen marcador de cloranfenicol de las cepas (Gene, (2000) 247, 255-264). Se realizó una PCR utilizando cebadores de las SEQ ID NO: 20 y 21 para obtener productos de PCR de aproximadamente 3,4 kb, aproximadamente 3,3 kb, aproximadamente 2,2 kb y aproximadamente 0,6 kb, manifestando que las cepas finalmente obtenidas tenían delección de alguno o de la totalidad de los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB*. Las cepas se designaron como *E. coli* W3110_Δ*fhuC*, W3110_Δ*fhuD*, W3110_Δ*fhuB* y W3110_Δ*fhuCDB*,

40 respectivamente.

Ejemplo 2: Medición de los niveles de ATP intracelular en el derivado de *E. coli* de tipo salvaje con los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* eliminados

En este ejemplo, Los niveles intracelulares de ATP en las cepas preparadas en el ejemplo 1 se midieron de manera práctica.

- 45 Para este fin, se empleó "An Efficient Method for Quantitative determination of Cellular ATP Synthetic Activity" ("Un Procedimiento Eficaz para la determinación Cuantitativa de la Actividad Sintética de ATP Celular") desarrollado por Kiyotaka Y. Hara y col., en el que se usa la luciferasa, (J Biom Scie, (2006) Vol. 11, N.º 3, p. 310-17). En resumen, La *E. coli* W3110, que es una cepa no modificada utilizada en el ejemplo 1 y la *E. coli* W3110_Δ*fhuCDB* obtenida por delección génica se cultivaron respectivamente durante la noche en un medio líquido LB que contiene glucosa. Después
- 50 del cultivo, los sobrenadantes se retiraron por centrifugación, las células obtenidas de este modo se lavaron con Tris-Cl 100 mM (pH 7,5) y luego se trataron con tampón PB (tampón permeable: 40 % [v/v] de glucosa, 0,8% [v/v] de Triton X-100) durante 30 minutos para liberar el ATP intracelular de las células. A continuación, los sobrenadantes se retiraron mediante centrifugación y se añadió luciferina como sustrato para la luciferasa a las células. Las células se dejaron reaccionar durante 10 minutos. La producción de color por la luciferasa se midió usando un luminómetro para
- 55 determinar cuantitativamente los niveles de ATP. Los resultados se proporcionan en la figura 1. Los resultados de la figura 1 se registraron como el promedio de tres experimentos repetidos.

Como se muestra en la figura 1, los niveles intracelulares de ATP se incrementaron en *E. coli* W3110_Δ*fhuC*, W3110_Δ*fhuD*, W3110_Δ*fhuB* y W3110_Δ*fhuCDB* preparados en el ejemplo 1, y en cualesquiera o en la totalidad de

los derivados de *E. coli* de tipo salvaje, en los que *fhuC*, *fhuD*, y *fhuB* fueron eliminados, en comparación con la cepa no modificada, *E. coli* W3110.

Ejemplo 3: Preparación de la cepa productora de L-triptófano derivada del tipo salvaje que tiene inactivación de proteínas codificadas por los genes *fhuC*, *fhuD*, y *fhuB* y medición de los niveles de ATP intracelular

5 En este ejemplo, alguno o la totalidad los genes de *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* de una cepa productora de L-triptófano derivada del tipo salvaje, *E. coli* W3110 trpΔ2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA (publicación de patente coreana N.º 10-2013-0082121) fue/fueron eliminado/eliminados mediante recombinación homóloga como en el ejemplo 1 para preparar las cepas W3110 trpΔ2_ΔfhuC/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA, W3110 trpΔ2_ΔfhuD/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA, W3110 trpΔ2_ΔfhuB/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA y W3110 trpΔ2_ΔfhuCDB/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA. En estas cepas preparadas de este modo, se midieron los niveles intracelulares de ATP de la misma manera que en el ejemplo 2 y los resultados se proporcionan en la figura 2.

Como se muestra en la figura 2, se incrementaron los niveles intracelulares de ATP en las cepas, que se prepararon mediante la eliminación de alguno o de la totalidad de los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* en la cepa productora de L-triptófano de tipo salvaje, en comparación con una cepa no modificada y una cepa control.

15 **Ejemplo 4: Examen de titulación de la cepa productora de L-triptófano derivada del tipo salvaje que tiene inactivación de proteínas codificadas por los genes *fhuC*, *fhuD* y *thub***

Como se describe en el ejemplo 3, la cepa productora de L-triptófano derivada del tipo salvaje, W3110 trpΔ2/pCL-Dtrp_atttrpEDCBA y las cepas con niveles mejorados de ATP intracelular preparadas mediante la eliminación de cualquiera o de la totalidad de los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* se sometieron a titulación utilizando glucosa como fuente de carbono.

20 Cada una de las cepas se inoculó mediante un asa de platino en un medio sólido LB y se cultivó en una incubadora a 37 °C durante la noche, y luego se inoculó mediante un asa de platino en 25 ml de un medio de titulación que contenía glucosa que contenía la composición de la tabla 1. Después, Las cepas se cultivaron en una incubadora a 37 °C y a 200 rpm durante 48 horas. Los resultados se proporcionan en la tabla 2. Todos los resultados se registraron como el promedio de tres experimentos repetidos.

[Tabla 1]

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	60 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g
Citrato de sodio	5 g
Extracto de levadura	2 g
CaCO ₃	40 g
L-fenilalanina	0,15 g
L-tirosina	0,1 g
pH	6,8

[Tabla 2]

Cepa	Cantidad de producción de L-triptófano (mg/l)*
W3110 trpΔ2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA	562
W3110 trpΔ2_ΔfhuC/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA	781
W3110 trpΔ2_ΔfhuD/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA	816
W3110 trpΔ2_ΔfhuB/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA	779
W3110 trpΔ2_ΔfhuCDB/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA	796
* medida a las 48 horas	

30 Como se muestra en la tabla 2, se demostró que las cepas con niveles mejorados de ATP intracelular, preparadas en el ejemplo 3 mediante la eliminación de alguno o de la totalidad de los genes *fhuC*, *fhuD*, y *fhuB* en la cepa W3110 trpΔ2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA de tipo salvaje productora de L-triptófano, incrementaron la producción de L-triptófano hasta aproximadamente el 63%, en comparación con la cepa no modificada trpΔ2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA. En vista de los niveles intracelulares de ATP constatados en la figura 2, estos resultados indican que las capacidades de producción de L-triptófano de las cepas se incrementaron por los niveles incrementados de ATP intracelular.

Ejemplo 5: Preparación de la cepa productora de L-treonina y la cepa productora de L-triptófano que tienen

inactivación de proteínas codificadas por los genes *fhuC*, *fhuD* and *fhuB*

En este ejemplo, los genes *fhuC*, *fhuD*, y *fhuB* de la cepa productora de L-triptófano KCCM10812P (patente coreana N.º 0792095) y de la cepa productora de L-treonina KCCM10541 (patente coreana N.º 0576342) se eliminaron respectivamente mediante recombinación homóloga, como en el ejemplo 1.

- 5 La cepa no modificada que tiene capacidad de producción de L-triptófano, *E. coli* KCCM10812P es una cepa derivada de una variante de *E. coli* (KFCC 10066) que tiene capacidad de producción de L-fenilalanina, y es una cepa de *E. coli* recombinante que tiene capacidad de producción de L-triptófano, caracterizada porque la auxotrofia cromosómica de triptófano se desensibilizó o se eliminó, los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* and *tnaAB* se atenuaron y los genes *aroG* and *trpE* se modificaron.
- 10 Además, la cepa no modificada que tiene capacidad de producción de L-treonina, *E. coli* KCCM10541P, es una cepa derivada de *E. coli* KFCC10718 (publicación de patente coreana N.º 1992-0008365), y es una *E. coli* que tiene resistencia al análogo de L-metionina, un fenotipo auxotrófico para metionina, resistencia al análogo de L-treonina, un fenotipo auxotrófico para isoleucina obtenido por inactivación parcial, resistencia al análogo de L-lisina y resistencia al ácido α -aminobutírico, y capacidad de producción de L-treonina.
- 15 Los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* a eliminar se eliminaron de *E. coli* KCCM10812P y *E. coli* KCCM10541P respectivamente, de la misma manera que en el ejemplo 1. Como resultado, se prepararon una cepa productora de L-treonina, KCCM10541_AfhuCDB, y una cepa productora de L-triptófano, KCCM10812P_AfhuCDB.

Ejemplo 6: Medición de los niveles de ATP en cepas productoras de L-treonina y cepas productoras de L-triptófano que tienen inactivación de proteínas codificadas por los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB*

- 20 En este ejemplo, Los niveles intracelulares de ATP en las cepas preparadas en el ejemplo 5 se midieron de manera práctica.

Los niveles intracelulares de ATP se midieron de la misma manera que en el ejemplo 2. Los resultados se proporcionan en las figuras 3 y 4. Los resultados de las figuras 3 y 4 se registraron como el promedio de tres experimentos repetidos. Como grupos control, se usaron la cepa productora de L-treonina (*E. coli* KCCM10541P_ΔysaΔydaS) y la cepa productora de L-triptófano (*E. coli* KCCM10812P-ΔysaΔydaS), delecionadas con *ysa* e *ydaS*, que se sabe que tienen niveles de ATP intracelular más altos que las cepas no modificadas, *E. coli* KCCM10812P y *E. coli* KCCM10541P usadas en el ejemplo 3 (patente coreana N.º 1327093).

25

Como se muestra en las figuras 3 y 4, Las cepas con eliminación de *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* preparadas a partir de la cepa productora de L-treonina y de la cepa productora de L-triptófano en el ejemplo 3, mostraron niveles incrementados de ATP intracelular, en comparación con la cepa no modificada y con la cepa control.

30

Ejemplo 7: Examen de titulación de la cepa productora de L-treonina que tiene las proteínas inactivadas codificadas por los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB*

Como se describe en el ejemplo 5, las cepas con niveles mejorados de ATP intracelular, que se prepararon por eliminación de los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* en un microorganismo productor de L-treonina, *E. coli* KCCM10541P (patente coreana N.º 0576342), se sometieron a titulación usando glucosa como fuente de carbono. La cepa productora de L-treonina delecionada con *ysa* e *ydaS* (*E. coli* KCCM10541P_ΔysaΔydaS) se usó como grupo de control para comparar los resultados de la titulación.

35

Cada una de las cepas se cultivó en un medio sólido LB en una incubadora a 33 °C durante la noche, y luego se inoculó mediante un asa de platino en 25 ml de un medio de titulación que contiene glucosa que contiene la composición de la tabla 3. Después, Las cepas se cultivaron en una incubadora a 33 °C y a 200 rpm durante 50 horas. Los resultados se proporcionan en la tabla 4 y la figura 5. Todos los resultados se registraron como el promedio de tres experimentos repetidos.

40

[Tabla 3]

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

(continuación)

Composición	Concentración (por litro)
FeSO ₄ ·H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	5 mg
Extracto de levadura	2 g
CaCO ₃	30 g

[Tabla 4]

Cepa	DO ₅₆₂	Consumo de glucosa (g/l)*	Cantidad de producción de L-treonina (g/l) **
KCCM10541P	22,8	41,0	28,0 ± 0,5
KCCM10541P_Δ _{ysa} Δ _{ydaS}	23,9	42,1	29,8 ± 0,9
KCCM10541P_Δ _{fhuCDB}	23,1	41,8	30,5 ± 1
* medida a las 30 horas			
** medida a las 50 horas			

5 Como se muestra en la tabla 4, se demostró que la cepa de *E. coli* productora de L-treonina recombinante preparada de acuerdo con la presente solicitud mostró una actividad fisiológica similar a la de la cepa no modificada, y una producción de L-treonina incrementada hasta aproximadamente un 9%, en comparación con la cepa no modificada. En vista de los niveles intracelulares de ATP constatados en la figura 3, estos resultados indican que las capacidades de producción de L-treonina de las cepas se incrementaron por el aumento de los niveles intracelulares de ATP.

Ejemplo 8: Examen de titulación de la cepa productora de L-triptófano que tiene inactivación de proteínas codificadas por los genes *fhuC*, *fhuD* and *fhuB*

10 Como se describe en el ejemplo 5, las cepas con niveles mejorados de ATP intracelular, que se prepararon por eliminación de los genes *fhuC*, *fhuD* y *fhuB* en un microorganismo productor de L-triptófano, KCCM10812P (patente coreana N.º 0792095), se sometieron a titulación usando glucosa como fuente de carbono. La cepa productora de L-triptófano delecionada con *ysa* e *ydaS* (*E. coli* KCCM10812P_Δ_{ysa}Δ_{ydaS}) se usó como grupo control para evaluar la titulación de la misma manera que en el ejemplo 4.

15 Los resultados se proporcionan en las tablas 5 y 6. Todos los resultados se registraron como el promedio de tres experimentos repetidos.

[Tabla 5]

Cepa	DO ₆₀₀	Consumo de glucosa (g/l)*	Cantidad de producción de L-triptófano (g/l)**
KCCM10812P	18,2	45,7	5,5 ± 0,2
KCCM10812P_Δ _{ysa} Δ _{ydaS}	18,3	46,3	6,7 ± 0,1
KCCM10812P_Δ _{fhuCDB}	17,9	47,4	7,1 ± 0,5
* medida a las 33 horas			
** medida a las 48 horas			

20 Como se muestra en la tabla 5, se demostró que la cepa recombinante de *E. coli* productora de L-triptófano preparada de acuerdo con la presente solicitud mostró una actividad fisiológica similar a la de la cepa no modificada, y una producción de L-triptófano incrementada hasta aproximadamente un 30%, en comparación con la cepa no modificada. En vista de los niveles intracelulares de ATP constatados en la figura 4, estos resultados indican que las capacidades de producción de L-triptófano de las cepas se incrementaron por los niveles incrementados de ATP intracelular.

La cepa recombinante de la presente solicitud, CA04-2801 (KCCM10812P_Δ_{fhuCDB}) se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms, una autoridad depositaria internacional, el 15 de noviembre de 2013, bajo la referencia N.º KCCM11474P.

25 <110> CJ Cheiljedang

<120> Microorganismos con nivel de ATP intracelular mejorado y procedimiento para la producción de L-aminoácidos usando los mismos

<130> PN103858

<160> 21

30 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 798

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

35 <220>

<221> gen

<222> (1)..(798)

<223> ORF de *fhuC*

ES 2 754 355 T3

```

<400> 1
atgcaggaat acacgaatca ttccgatacc acttttgcac tgcgtaatat ctcttttcgt      60
gtgcccgggc gcacgctttt gcatccgctg tcgttaacct ttcttgccgg gaaagtgacc      120
ggtctgattg gtcacaacgg ttctggtaaa tccactctgc tcaaaatgct tggccgtcat      180
cagccgccgt cgggaagggga gattcttctt gatgccaac cgctggaaag ctggagcagc      240
aaagcgtttg cccgcaaagt ggcttatttg ccgcagcagc ttctccggc agaagggatg      300
accgtgctg aactggtggc gattggtcgt taccctggc atggcgctg ggggcgcttt      360
ggggcggcag atcgcgaaaa agtcgaggaa gctatctcgc tggttggctt aaaaccgctg      420
gcgcatcggc tggtcgatag tctctctggc ggcgaacgtc agcgggcgtg gatcgccatg      480
ctggtggcgc aggatagccg ttgtctggtg ctcgacgaac cgacctcggc gctggatc      540
gccaccagg ttgatgtgct gtcgctggtg caccgtttaa gtcaggagcg tggcctgacg      600
gtcattgccg tgttgcacga tatcaatatg gcggcacgct actgtgatta tctggtcgcc      660
ctgcgcggcg gtgaaatgat tgctcagga acgcctgcgg aaattatgcg cggcgaaacc      720
ctcgaaatga tttatggcat cccgatgggt attttgccgc atccggcggg tgctgcacct      780
gtgagttttg tttattga                                                    798

```

```

5 <210> 2
  <211> 891
  <212> ADN
  <213> Escherichia coli

10 <220>
  <221> gen
  <222> (1)..(891)
  <223> ORF de fhuD

  <400> 2

```

ES 2 754 355 T3

atgagcggct tacctcttat ttcgcgccgt cgactgttaa cggcgatggc gctttctccg 60
 ttgttatggc agatgaatac cgcccacgcg gcggtattg atcccaatcg tattgtggcg 120
 ctggagtggg tgccgggtgga attactgctg gcgctcggca tcgtgcctta cggcgtggcg 180
 gataccatca actatcgctt gtgggtcagc gaaccacat tgccggactc agtgatcgac 240
 gtcggtttgc gcacagaacc taaccttgaa ctgctgaccg aaatgaaacc atcgtttatg 300
 gtctggtcgg caggatatgg cccttcacca gaaatgctgg ctcgatttgc gccgggtcgc 360
 ggatttaact tcagtgcagg caaacagccg ttggcgatgg cgcgtaaatc gctgacggaa 420
 atggcagatt tacttaacct gcaaagcgca gcggaaacgc atttagcgca atatgaagac 480
 tttatccgca gcatgaaacc ccgctttgtg aagcgtgggt cgcgtccggt attgctgacg 540
 acgcttatcg atccgcgcca tatgctggtc ttcggtccaa acagcttggt ccaggaaatt 600
 ctgatgagt acggcatccc aaatgcctgg caaggggaaa ccaacttctg gggcagtacc 660
 gccgtcagta tcgatcgtct ggcggcgtat aaagacgttg atgtgctctg ttttgatcac 720
 gacaacagca aagacatgga tgcgctaatg gcaacgccgc tgtggcaggc catgccgttt 780
 gtccgcgccg gacgctttca gcgcgtacct gcagtctggt tttatggtgc gacgctctcg 840
 gcaatgcact ttgtgcgcgt tctggataac gccatcggag gtaaagcgtg a 891

<210> 3
 <211> 1983
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1983)
 <223> ORF de fhuB

10

<400> 3
 gtgagtaaac gaattgcgct tttcccggcg ttattgctgg cgctgtagt gattgtcgtc 60
 acggcgctca cctggatgaa cttctcgcag gcgctgccgc gtagccagtg ggcgcaggct 120
 gcctggtcgc cggatattga cgtcatcgag cagatgattt ttactacag cttggtgccg 180
 cgtctggcga tttcgtgct ggtgggcgcg ggtctggggc tgggtggcgt gctgtttcag 240
 caagtgctgc gtaaccgct ggcggagccg acgacgcttg gcgctgctac aggcgcgcaa 300
 ctggggatta ccgtcactac gctctggggc atccctgggt cgatggcgag ccagtttctc 360
 gcgcaggcag gggcttgtgt tggtggctta attgtctttg gcgtcgcgtg ggggaaacgg 420
 ctgtcgcggg taacgctgat tctcgcgggg ttggtagtga gcctttattg cggcgcaatc 480
 aatcagttac tggttatctt ccatcatgac caactgcaaa gcatgtttct gtggagcact 540
 ggaacgctga cgcaaaccga ctggggcggc gttgagcgtt tatggccgca gctgctgggc 600

ES 2 754 355 T3

ggtgtgatgc tgacgttgct gctacttcgt cggtaaccc tgatggggct tgatgatggc 660
 gtggcgcgca atctcgggct ggccttgctg cttgcgcgtc tggcagcgct gtcgctggcg 720
 attgtcatca gtgcgctgct ggtgaacgct gtggggatta tcggctttat cgggttgctc 780
 gcgccgctgc tggcaaaaat gctgggggcg cggcgtctgc tgccacgact gatgctggcg 840
 tcgctgattg gtgcgctgat cctctggctt tccgatcaaa tcatcctctg gctgactcgc 900
 gtgtggatgg aagtgtccac cggttcggtc actgcgctga tcggtgcgcc gctgctactg 960
 tggctgttgc cgcgcttacg cagcattagc gcgccggata tgaaggtcaa cgatcgtgct 1020
 gcggctgaac gccaacatgt gctggcgctt gccctcggcg gcggcgtgct gctgctgatg 1080
 gctgtggtgg tggcgctgct gtttggtcgt gatgcgcacg gctggacgtg ggcgagcggg 1140
 gcgctgctcg aggatttaat gccctggcgc tggccgcgaa ttatggcggc gctgcttgcg 1200
 ggcgtcatgc tggcggtggc gggctgtatt attcagcgac tgaccggaaa cccgatggca 1260
 agcccggaag tgctggggat tagctccggc gcggcgcttg gcgtggtggt gatgctgttt 1320
 ctggtgcccg gtaatgcctt tggctggctg ttacctgcag gcagtctcgg cgcggcggtg 1380
 acgctgttga tcattatgat cgcgccggc cgcgggtgat tttcccaca ccgatgtta 1440
 ctggcgggga tggcgtaag caccgcgttc accatgcttt tgatgatggt gcaggcaagt 1500
 ggtgaccgc gaatggcgca agtgctgacc tggatttccg gttcgaccta caacgcgacc 1560
 gatgcgcagc tctggcgcac cggcaattgtg atggtgattt tgctggcgat taccgcgctg 1620
 tgccgccgct ggctgaccat tttaccgctg ggtggtgata ccgcccgagc cgtaggaatg 1680
 gcgctgacgc cgacgcgaat tgcgctgctg ctgttagcgg cttgcctgac ggcgaccgcg 1740
 acgatgacta ttggaccgct gagttttggt ggtttaatgg caccgcatat tgcgcggatg 1800
 atgggctttc gacggacgat gccacacatc gtaatttcgg cgctggtggg tggtttactg 1860
 ctggtgttcg ctgactggtg tgggcggatg gtgctgtttc cattccagat cccggcgggg 1920
 ctgctgtcaa cctttatcgg cgcgccatat tttatctatt tgttgagaaa gcagagccgt 1980
 taa 1983

<210> 4
 <211> 3667
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

5

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(3667)
 <223> operón fhuCDB

10

<400> 4
 atgcaggaat acacgaatca ttccgatacc acttttgcac tgcgtaatat ctcccttctg 60

ES 2 754 355 T3

gtgcccgggc gcacgctttt gcatccgctg tcgttaacct ttctgcccgg gaaagtgacc 120
 ggtctgattg gtcacaacgg ttctggtaaa tccactctgc tcaaaatgct tggccgcat 180
 cagccgccgt cggaagggga gattcttctt gatgcccaac cgctggaaag ctggagcagc 240
 aaagcgtttg cccgcaaagt ggcttatttg ccgcagcagc ttctccggc agaagggatg 300
 accgtgctg aactggtggc gattggtcgt taccogtggc atggcgctg ggggctgtt 360
 ggggcggcag atcgcgaaaa agtcgaggaa gctatctcgc tggttggctt aaaaccgctg 420
 gcgcatcggc tggtcgatag tctctctggc ggcgaacgtc agcgggctg gatcgccatg 480
 ctggtggcgc aggatagccg ttgtctgttg ctgcacgaac cgacctcggc gctggatata 540
 gccaccagc ttgatgtgct gtcgctggtg caccgtttaa gtcaggagcg tggcctgacg 600
 gtcattgccg tggtgcaoga tatcaatatg gcggcagcct actgtgatta tctggtcggc 660
 ctgcgcggcg gtgaaatgat tgctcagga acgcctgcgg aaattatgcg cggcgaaacc 720
 ctcgaaatga tttatggcat cccgatgggt attttgccgc atccggcggg tgctgcacct 780
 gtgagttttg tttattgatg agcggcttac ctcttatttc gcgccgtcga ctgttaacgg 840
 cgatggcctt ttctcogttg ttatggcaga tgaataccgc ccacgcggcg gctattgatc 900
 ccaatcgtat tgtggcgctg gagtggttgc cgggtggaatt actgctggcg ctcgccatcg 960
 tgccttacgg cgtggcggat accatcaact atcgcctgtg ggtcagcga ccaccattgc 1020
 cggactcagt gatcgacgtc ggtttgcgca cagaacctaa cttgaaactg ctgaccgaaa 1080
 tgaaccatc gtttatggtc tggtcggcag gatatggccc ttcaccagaa atgctggctc 1140
 gtattgcgcc gggtcgcgga ttaacttca gtgacggcaa acagccgttg gcgatggcgc 1200
 gtaaatcgtc gacggaaatg gcagatttac ttaacctgca aagcgcagcg gaaacgcatt 1260
 tagcgcaata tgaagacttt atccgcagca tgaaaccccg ctttgtgaag cgtggtgccc 1320
 gtccgttatt gctgacgacg cttatcgatc cgcgccatat gctggtcttc ggtccaaaca 1380
 gcttgttcca ggaaattctt gatgagtacg gcatcccaa tgcctggcaa ggggaaacca 1440
 acttctgggg cagtaccgcc gtcagtatcg atcgtctggc ggcgtataaa gacgttgatg 1500
 tgctctgttt tgatcacgac aacagcaaag acatggatgc gctaatggca acgccgctgt 1560
 ggcaggccat gccgtttgtc cgcgccggac gctttcagcg cgtacctgca gtctggtttt 1620
 atggtgcgac gctctoggca atgcactttg tgcgcgttct ggataacgcc atcggaggtg 1680
 aagcgtgagt aaacgaattg cgcttttccc ggcgttattg ctggcgtgt tagtgattgt 1740
 cgctacggcg ctcaacctga tgaacttctc gcaggcgtg ccgcgtagcc agtgggcgca 1800
 ggctgcctgg tcgcccggata ttgacgcat cgagcagatg attttctact acagcttgtt 1860
 gccgcgtctg gcgatttcgc tgctggtggg cgcgggtctg gggctggtgg gcgtgctgtt 1920

ES 2 754 355 T3

tcagcaagtg ctgcgtaacc cgctggcgga gccgacgacg cttggcggtg ctacaggcgc 1980
gcaactgggg attacgctca ctacgctctg ggcgatccct ggtgcgatgg cgagccagtt 2040
tgctgcgcag gcaggggctt gtgttggttg ctttaattgtc tttggcgctg cgtgggggaa 2100
acggctgtcg ccggtaacgc tgattctcgc ggggttggtg gtgagccttt attgcggcgc 2160
aatcaatcag ttactgggta tcttccatca tgaccaactg caaagcatgt ttctgtggag 2220
cactggaacg ctgacgcaa cgcactgggg cggcggtgag cgtttatggc cgcagctgct 2280
ggcggtgtg atgctgacgt tgctgctact tcgtccgtta accctgatgg ggcttgatga 2340
tggcgtggcg cgcaatctcg ggctggcctt gtcgcttgcg cgtctggcag cgctgtcgct 2400
ggcgattgtc atcagtgcgc tgctggtgaa cgctgtgggg attatcggct ttatcgggtt 2460
gttcgcgcgc ctgctggcaa aaatgctggg ggcgcggcgt ctgctgccac gactgatgct 2520
ggcgtcgttg attggtgcgc tgatcctctg gctttccgat caaatcatcc tctggctgac 2580
tcgctgtgg atggaagtgt ccaccggttc ggtcactgcg ttgatcggtg cgccgctgct 2640
actgtggctg ttgccgcgtt tacgcagcat tagcgcgccg gatatgaagg tcaacgatcg 2700
tgtcgcggct gaacgccaac atgtgctggc gtttgccctc gcggggcggc tgctgctggt 2760
gatggctgtg gtggtggcgc tgctgtttg tctgatgctg cacggctgga cgtgggcgag 2820
cggggcgttg ctcgaggatt taatgcctg gcgctggccg cgaattatgg cggcgtggt 2880
tgcgggcgtc atgctggcgg tggcgggctg tattattcag cgactgaccg gaaacccgat 2940
ggcaagcccg gaagtgcctg ggattagctc cggcgcggcg tttggcgtgg tgttgatgct 3000
gtttctggtg ccgggtaatg cctttggctg gctgttacct gcaggcagtc tcggcgcggc 3060
ggtgacgctg ttgatcatta tgatcgccgc cggccgcggt ggattttccc cacaccgat 3120
gttactggcg gggatggcgt taagcacccg gttcaccatg cttttgatga tgttgacaggc 3180
aagtggtgac ccgcgaatgg cgcaagtgct gacctggatt tccggttcga cctacaacgc 3240
gaccgatgcg caggtctggc gcaccggaat tgtgatggtg attttgctgg cgattacccc 3300
gctgtgccgc cgctggctga ccattttacc gctgggtggt gataccgcc gagccgtagg 3360
aatggcgtg acgccgacgc gaattgcgct gctgctgta gcggcttgcc tgacggcgac 3420
cgcgacgatg actattggac cgttgagttt tgttggttta atggcaccgc atattgcgcg 3480
gatgatgggc tttcgacgga cgatgccaca catcgttaatt tcggcgctgg tgggtggttt 3540
actgctggtg ttcgctgact ggtgtgggcg gatggtgctg tttccattcc agatcccggc 3600
gggctgctg tcaaccttta tcggcgcgcc atatttatc tatttggtga gaaagcagag 3660
ccgttaa 3667

<210> 5
<211> 265
<212> PRT
<213> Escherichia coli

ES 2 754 355 T3

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(265)
 <223> FhuC

5 <400> 5

Met Gln Glu Tyr Thr Asn His Ser Asp Thr Thr Phe Ala Leu Arg Asn
 1 5 10 15
 Ile Ser Phe Arg Val Pro Gly Arg Thr Leu Leu His Pro Leu Ser Leu
 20 25 30
 Thr Phe Pro Ala Gly Lys Val Thr Gly Leu Ile Gly His Asn Gly Ser
 35 40 45
 Gly Lys Ser Thr Leu Leu Lys Met Leu Gly Arg His Gln Pro Pro Ser
 50 55 60
 Glu Gly Glu Ile Leu Leu Asp Ala Gln Pro Leu Glu Ser Trp Ser Ser
 65 70 75 80
 Lys Ala Phe Ala Arg Lys Val Ala Tyr Leu Pro Gln Gln Leu Pro Pro
 85 90 95
 Ala Glu Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Val Ala Ile Gly Arg Tyr Pro
 100 105 110
 Trp His Gly Ala Leu Gly Arg Phe Gly Ala Ala Asp Arg Glu Lys Val
 115 120 125
 Glu Glu Ala Ile Ser Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Ala His Arg Leu
 130 135 140
 Val Asp Ser Leu Ser Gly Gly Glu Arg Gln Arg Ala Trp Ile Ala Met
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Gln Asp Ser Arg Cys Leu Leu Leu Asp Glu Pro Thr Ser
 165 170 175
 Ala Leu Asp Ile Ala His Gln Val Asp Val Leu Ser Leu Val His Arg
 180 185 190
 Leu Ser Gln Glu Arg Gly Leu Thr Val Ile Ala Val Leu His Asp Ile
 195 200 205
 Asn Met Ala Ala Arg Tyr Cys Asp Tyr Leu Val Ala Leu Arg Gly Gly
 210 215 220
 Glu Met Ile Ala Gln Gly Thr Pro Ala Glu Ile Met Arg Gly Glu Thr
 225 230 235 240
 Leu Glu Met Ile Tyr Gly Ile Pro Met Gly Ile Leu Pro His Pro Ala
 245 250 255
 Gly Ala Ala Pro Val Ser Phe Val Tyr
 260 265

<210> 6
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

10

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(296)
<223> FhuD

5 <400> 6

ES 2 754 355 T3

Met Ser Gly Leu Pro Leu Ile Ser Arg Arg Arg Leu Leu Thr Ala Met
1 5 10 15

Ala Leu Ser Pro Leu Leu Trp Gln Met Asn Thr Ala His Ala Ala Ala
20 25 30

Ile Asp Pro Asn Arg Ile Val Ala Leu Glu Trp Leu Pro Val Glu Leu
35 40 45

Leu Leu Ala Leu Gly Ile Val Pro Tyr Gly Val Ala Asp Thr Ile Asn
50 55 60

Tyr Arg Leu Trp Val Ser Glu Pro Pro Leu Pro Asp Ser Val Ile Asp
65 70 75 80

Val Gly Leu Arg Thr Glu Pro Asn Leu Glu Leu Leu Thr Glu Met Lys
85 90 95

Pro Ser Phe Met Val Trp Ser Ala Gly Tyr Gly Pro Ser Pro Glu Met
100 105 110

Leu Ala Arg Ile Ala Pro Gly Arg Gly Phe Asn Phe Ser Asp Gly Lys
115 120 125

Gln Pro Leu Ala Met Ala Arg Lys Ser Leu Thr Glu Met Ala Asp Leu
130 135 140

Leu Asn Leu Gln Ser Ala Ala Glu Thr His Leu Ala Gln Tyr Glu Asp
145 150 155 160

Phe Ile Arg Ser Met Lys Pro Arg Phe Val Lys Arg Gly Ala Arg Pro
165 170 175

Leu Leu Leu Thr Thr Leu Ile Asp Pro Arg His Met Leu Val Phe Gly
180 185 190

Pro Asn Ser Leu Phe Gln Glu Ile Leu Asp Glu Tyr Gly Ile Pro Asn
195 200 205

Ala Trp Gln Gly Glu Thr Asn Phe Trp Gly Ser Thr Ala Val Ser Ile
210 215 220

Asp Arg Leu Ala Ala Tyr Lys Asp Val Asp Val Leu Cys Phe Asp His
225 230 235 240

Asp Asn Ser Lys Asp Met Asp Ala Leu Met Ala Thr Pro Leu Trp Gln
245 250 255

Ala Met Pro Phe Val Arg Ala Gly Arg Phe Gln Arg Val Pro Ala Val
260 265 270

Trp Phe Tyr Gly Ala Thr Leu Ser Ala Met His Phe Val Arg Val Leu
275 280 285

Asp Asn Ala Ile Gly Gly Lys Ala
290 295

<210> 7
<211> 660
<212> PRT

ES 2 754 355 T3

<213> Escherichia coli

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(660)

<223> FhuB

5

<400> 7

```

Met Ser Lys Arg Ile Ala Leu Phe Pro Ala Leu Leu Leu Ala Leu Leu
  1           5           10           15

Val Ile Val Ala Thr Ala Leu Thr Trp Met Asn Phe Ser Gln Ala Leu
      20           25           30

Pro Arg Ser Gln Trp Ala Gln Ala Ala Trp Ser Pro Asp Ile Asp Val
      35           40           45

Ile Glu Gln Met Ile Phe His Tyr Ser Leu Leu Pro Arg Leu Ala Ile
     50           55           60

Ser Leu Leu Val Gly Ala Gly Leu Gly Leu Val Gly Val Leu Phe Gln
     65           70           75           80

Gln Val Leu Arg Asn Pro Leu Ala Glu Pro Thr Thr Leu Gly Val Ala
      85           90           95

Thr Gly Ala Gln Leu Gly Ile Thr Val Thr Thr Leu Trp Ala Ile Pro
      100          105          110

Gly Ala Met Ala Ser Gln Phe Ala Ala Gln Ala Gly Ala Cys Val Val
     115          120          125

Gly Leu Ile Val Phe Gly Val Ala Trp Gly Lys Arg Leu Ser Pro Val
     130          135          140

Thr Leu Ile Leu Ala Gly Leu Val Val Ser Leu Tyr Cys Gly Ala Ile
    145          150          155          160

Asn Gln Leu Leu Val Ile Phe His His Asp Gln Leu Gln Ser Met Phe
     165          170          175

Leu Trp Ser Thr Gly Thr Leu Thr Gln Thr Asp Trp Gly Gly Val Glu
     180          185          190

Arg Leu Trp Pro Gln Leu Leu Gly Gly Val Met Leu Thr Leu Leu Leu
     195          200          205

Leu Arg Pro Leu Thr Leu Met Gly Leu Asp Asp Gly Val Ala Arg Asn
     210          215          220

Leu Gly Leu Ala Leu Ser Leu Ala Arg Leu Ala Ala Leu Ser Leu Ala
     225          230          235          240

```

ES 2 754 355 T3

Ile Val Ile Ser Ala Leu Leu Val Asn Ala Val Gly Ile Ile Gly Phe
245 250 255

Ile Gly Leu Phe Ala Pro Leu Leu Ala Lys Met Leu Gly Ala Arg Arg
260 265 270

Leu Leu Pro Arg Leu Met Leu Ala Ser Leu Ile Gly Ala Leu Ile Leu
275 280 285

Trp Leu Ser Asp Gln Ile Ile Leu Trp Leu Thr Arg Val Trp Met Glu
290 295 300

Val Ser Thr Gly Ser Val Thr Ala Leu Ile Gly Ala Pro Leu Leu Leu
305 310 315 320

Trp Leu Leu Pro Arg Leu Arg Ser Ile Ser Ala Pro Asp Met Lys Val
325 330 335

Asn Asp Arg Val Ala Ala Glu Arg Gln His Val Leu Ala Phe Ala Leu
340 345 350

Ala Gly Gly Val Leu Leu Leu Met Ala Val Val Val Ala Leu Ser Phe
355 360 365

Gly Arg Asp Ala His Gly Trp Thr Trp Ala Ser Gly Ala Leu Leu Glu
370 375 380

Asp Leu Met Pro Trp Arg Trp Pro Arg Ile Met Ala Ala Leu Phe Ala
385 390 395 400

Gly Val Met Leu Ala Val Ala Gly Cys Ile Ile Gln Arg Leu Thr Gly
405 410 415

Asn Pro Met Ala Ser Pro Glu Val Leu Gly Ile Ser Ser Gly Ala Ala
420 425 430

Phe Gly Val Val Leu Met Leu Phe Leu Val Pro Gly Asn Ala Phe Gly
435 440 445

Trp Leu Leu Pro Ala Gly Ser Leu Gly Ala Ala Val Thr Leu Leu Ile
450 455 460

Ile Met Ile Ala Ala Gly Arg Gly Gly Phe Ser Pro His Arg Met Leu
465 470 475 480

Leu Ala Gly Met Ala Leu Ser Thr Ala Phe Thr Met Leu Leu Met Met
485 490 495

Leu Gln Ala Ser Gly Asp Pro Arg Met Ala Gln Val Leu Thr Trp Ile
500 505 510

Ser Gly Ser Thr Tyr Asn Ala Thr Asp Ala Gln Val Trp Arg Thr Gly
515 520 525

Ile Val Met Val Ile Leu Leu Ala Ile Thr Pro Leu Cys Arg Arg Trp
530 535 540

Leu Thr Ile Leu Pro Leu Gly Gly Asp Thr Ala Arg Ala Val Gly Met
545 550 555 560

Ala Leu Thr Pro Thr Arg Ile Ala Leu Leu Leu Ala Ala Cys Leu
565 570 575

ES 2 754 355 T3

Thr Ala Thr Ala Thr Met Thr Ile Gly Pro Leu Ser Phe Val Gly Leu
 580 585 590

Met Ala Pro His Ile Ala Arg Met Met Gly Phe Arg Arg Thr Met Pro
 595 600 605

His Ile Val Ile Ser Ala Leu Val Gly Gly Leu Leu Leu Val Phe Ala
 610 615 620

Asp Trp Cys Gly Arg Met Val Leu Phe Pro Phe Gln Ile Pro Ala Gly
 625 630 635 640

Leu Leu Ser Thr Phe Ile Gly Ala Pro Tyr Phe Ile Tyr Leu Leu Arg
 645 650 655

Lys Gln Ser Arg
 660

5 <210> 8
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 1

<400> 8
 ctcctttcgt gtgcccgggc gcacgctttt gcatccgctg tcgttaacct aggtgacct 60
 atagaacgcg 70

10 <210> 9
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador 2

<400> 9
 caataaaca aactcacagg tgcagcacc gccggatgcg gcaaaatacc tagtggatct 60
 gatgggtacc 70

20 <210> 10
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 3

<400> 10
 cgactgttaa cggcgatggc gctttctccg ttgttatggc agatgaatac aggtgacct 60
 atagaacgcg 70

25 <210> 11
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>

ES 2 754 355 T3

	<223> Cebador 4	
	<400> 11	
	tcacgcttta cctccgatgg cgttatccag aacgcgcaca aagtgcattg tagtggatct	60
	gatgggtacc	70
5	<210> 12 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador 5	
10	<400> 12	
	gtgagtaaac gaattgcgct tttcccggcg ttattgctgg cgctgtagt aggtgacact	60
	atagaacgcg	70
15	<210> 13 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador 6	
	<400> 13	
	aggttgacag cagccccgcc gggatctgga atggaacag caccatccgc tagtggatct	60
	gatgggtacc	70
20	<210> 14 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador 7	
25	<400> 14	
	atgcaggaat acacgaatca ttccgatacc acttttgcac tgcgtaatat ctcccttcgt	60
	gtgcccgggc	70
30	<210> 15 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador 8	
	<400> 15	
	gccatcgccg ttaacagtcg acggcgcgaa ataagaggta agccgctcat caataaacia	60
35	aactcacagg	70
	<210> 16 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 754 355 T3

	<220>		
	<223> Cebador 9		
	<400> 16		
	cctgtgagtt ttgtttattg atgagcggct tacctcttat ttcgcgccgt cgactgttaa		60
	cggcgatggc		70
5	<210> 17		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> Cebador 10		
	<400> 17		
	aatcactaac agcgcagca ataacgccg gaaaagcgcga attcgtttac tcacgcttta		60
	cctccgatgg		70
15	<210> 18		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 11		
	<400> 18		
	tggcaatgc actttgtgcg cgttctggat aacgccatcg gaggtaaagc gtgagtaaac		60
20	gaattgcgct		70
	<210> 19		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Cebador 12		
	<400> 19		
	ttaacggctc tgctttctca acaaatagat aaaatatggc gcgccgataa aggttgacag		60
	cagccccgcc		70
30	<210> 20		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 13		
35	<400> 20		
	gaatcgtcg ccagctgctt taacac	26	
40	<210> 21		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 14		

ES 2 754 355 T3

<400> 21
tggttgtcg gatgcggcgt gaac

24

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de L-aminoácidos, comprendiendo el procedimiento:

cultivar un microorganismo del género *Escherichia* en un medio y recuperar L-aminoácidos de los medios de cultivo o del microorganismo;

5 en el que el microorganismo tiene un nivel de ATP intracelular aumentado, en comparación con una cepa no modificada, en el que una o más proteínas seleccionadas de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, que constituyen un sistema de absorción de hierro, están inactivadas en el microorganismo;

10 en el que el microorganismo del género *Escherichia* tiene una capacidad mejorada para producir L-aminoácido, en comparación con una cepa no modificada; y en el que el L-aminoácido es L-treonina o L-triptófano.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que todas las proteínas que tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 están inactivadas.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *E. coli*.

15 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha una o más proteínas se inactivan por mutación debido a delección, sustitución o inserción de parte o la totalidad del gen que codifica la correspondiente proteína, por modificación de una secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del gen, por modificación de la secuencia del gen cromosómico para debilitar o eliminar la actividad de la proteína, o por combinaciones de las mismas.

20

FIG. 1

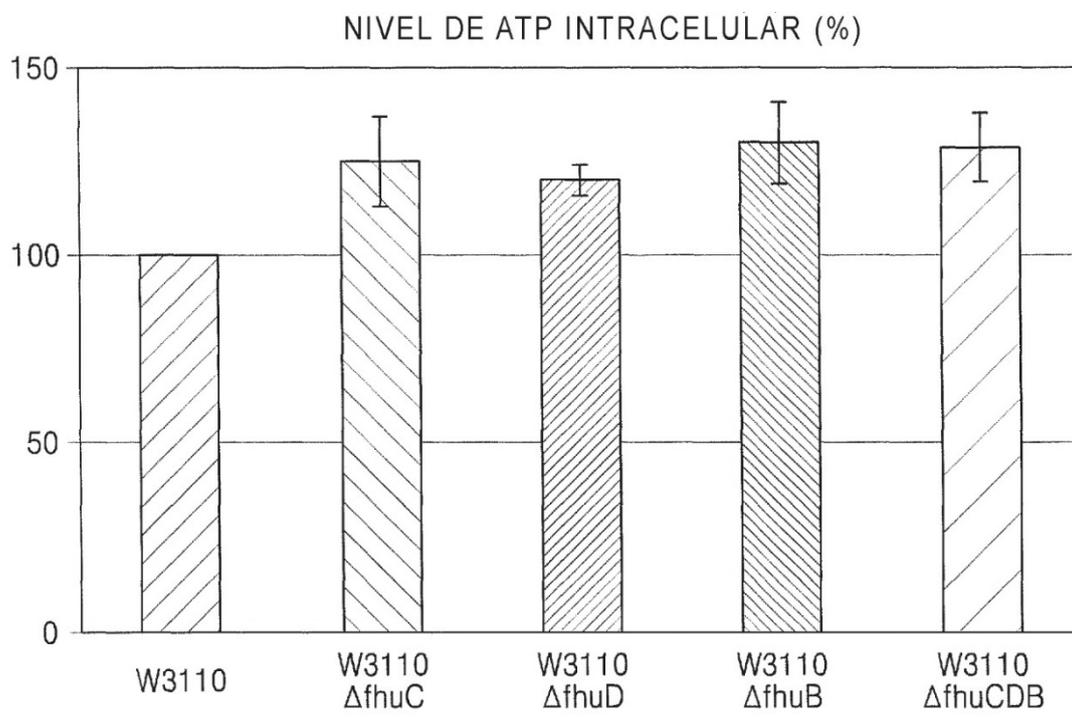


FIG. 2

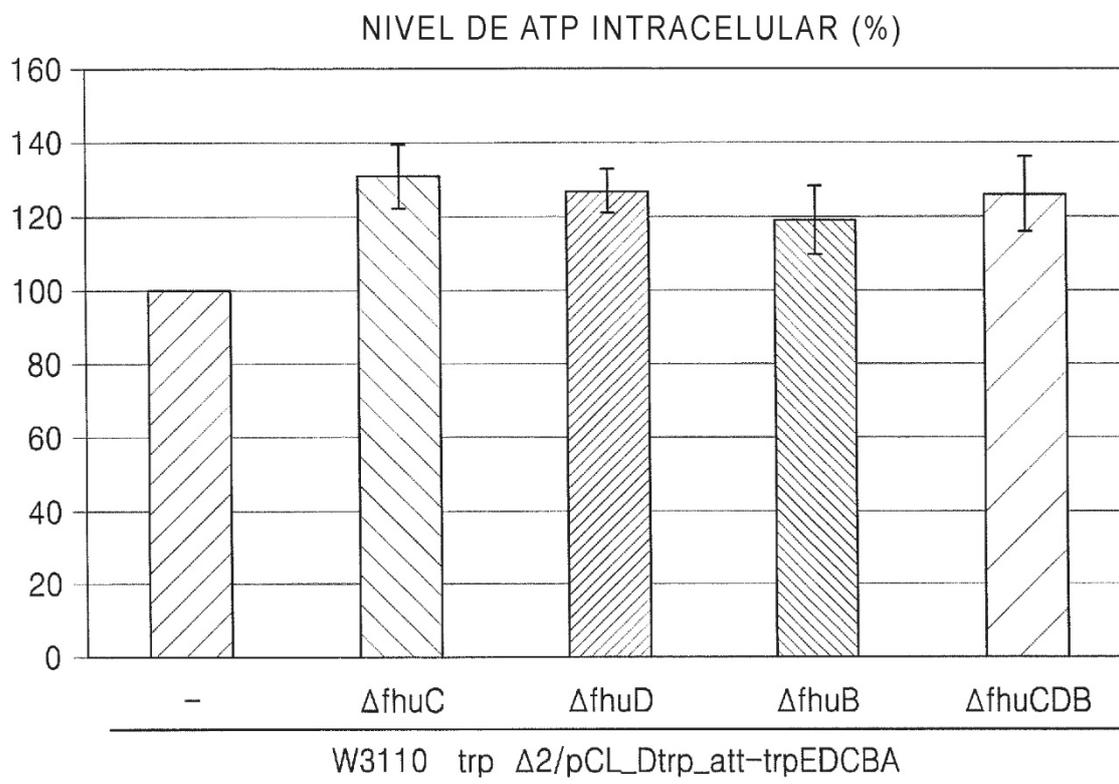


FIG. 3

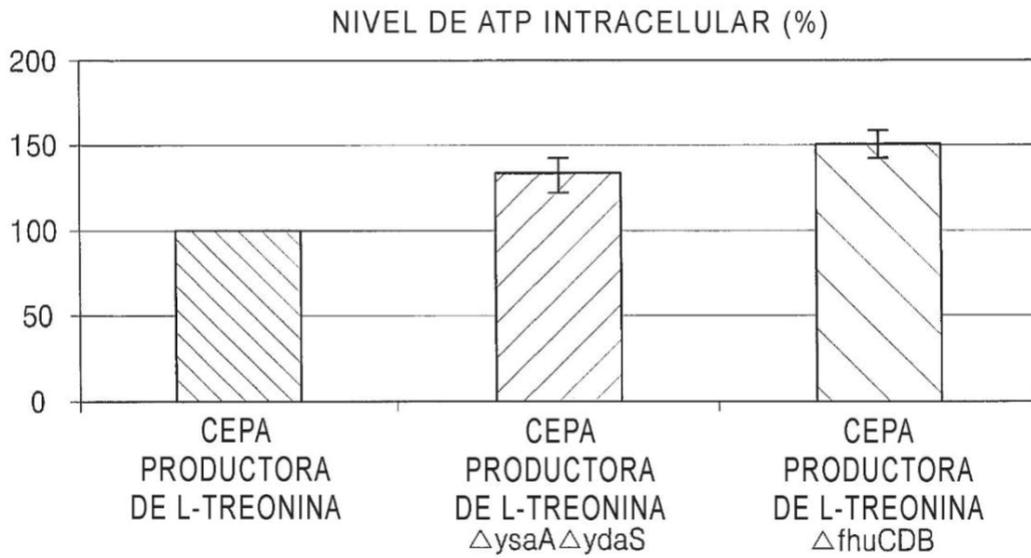


FIG. 4

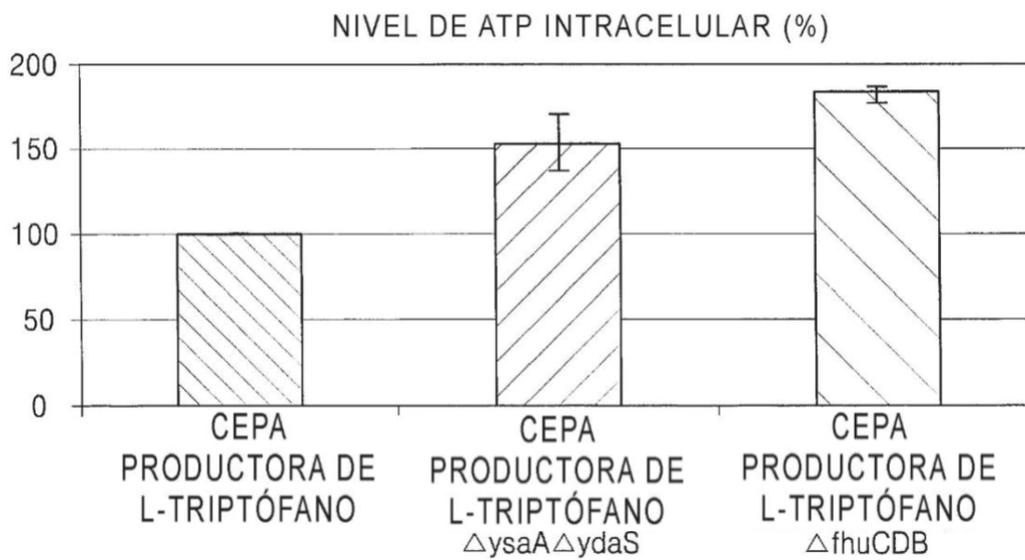


FIG. 5

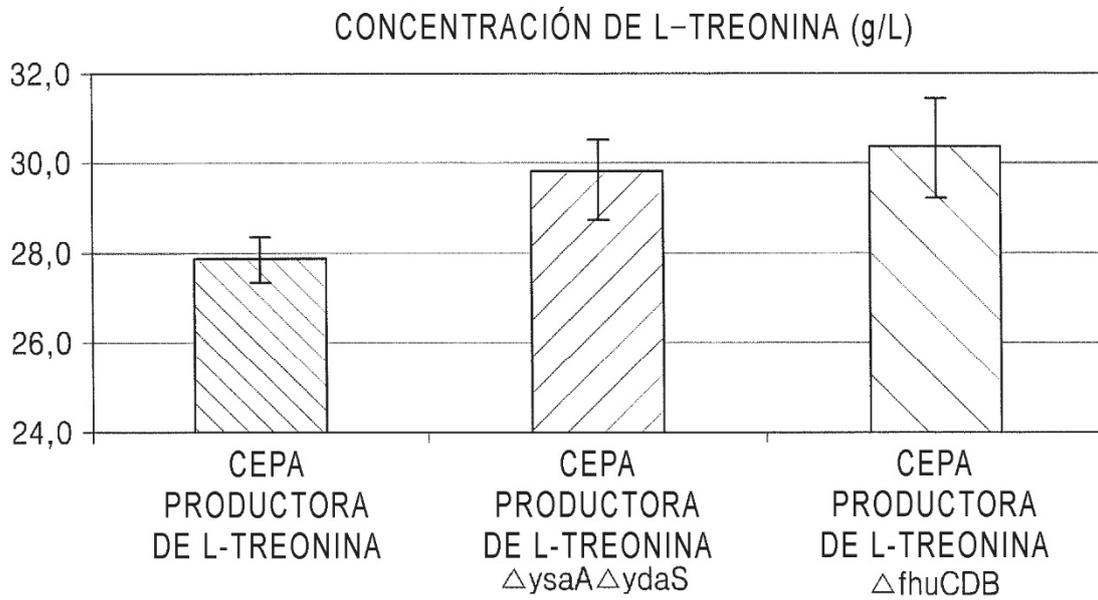


FIG. 6

