

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 799**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12P 13/22** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2013 PCT/KR2013/000072**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13103268**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2013 E 13733718 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2801611**

54 Título: **Microorganismo capaz de producir l-aminoácido y método para producir L-aminoácido mediante el uso del mismo**

30 Prioridad:

**06.01.2012 KR 20120001819**

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

**30.11.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHEONG, KI YONG;  
LEE, SEOK MYUNG;  
HWANG, YOUNG BIN;  
LEE, KEUN CHEOL y  
LEE, KWANG HO**

74 Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester**

ES 2 796 799 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 capaz de producir L-aminoácido y método para producir L-aminoácido mediante el uso del mismo

5 Campo técnico

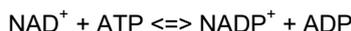
La presente invención se refiere a un microorganismo capaz de producir L-treonina o L-triptófano y a un método para producir L-treonina o L-triptófano mediante el uso del mismo.

10 Técnica Anterior

Se conoce que los microorganismos que producen productos útiles a través de la fermentación requieren cantidades muy grandes de energía, tales como ATP, cuando se potencia la ruta biosintética.

15 Como se conoce en la técnica, es muy importante el equilibrio intracelular entre el dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD(H)) que se produce por reacciones catabólicas y el dinucleótido de adenina nicotinamida fosfato NADP(H) que se usa en reacciones anabólicas en procesos metabólicos microbianos. El NAD(H) es un intermediario en las reacciones catabólicas que generan ATP a través de la oxidación de los alimentos y funciona como una fuente de energía. Y el NADP(H) desempeña un papel en proporcionar un poder reductor en el proceso metabólico *in vivo*, es decir, proporciona los electrones de alta energía necesarios para sintetizar moléculas al reaccionar con enzimas que generalmente catalizan reacciones anabólicas. El equilibrio entre ellos se regula ya sea mediante la fosforilación de NAD como se muestra en la siguiente ecuación 1) o mediante la desfosforilación de NADP como se muestra en la siguiente ecuación 2).

Ecuación 1)



Ecuación 2)



Por lo tanto, para producir eficazmente un poder reductor tal como el NADPH, debe aumentarse conjuntamente una fuente de fosfato tal como el ATP.

35 El ATP (Adenosina-5'-trifosfato) tiene un enlace fosfato de alta energía, y genera energía cuando se hidroliza a ADP y fosfato. El ATP se produce principalmente por fosforilación quimiosmótica a través del sistema de transporte de electrones en microorganismos o por fosforilación a nivel de sustrato. El ATP producido se degrada para suministrar la energía requerida para las células y vuelve a usarse mediante regeneración a través de la ruta de la glucólisis o la fosforilación oxidativa.

40 Basado en este hecho, se han realizado estudios para aplicar el proceso de regeneración de energía del ATP de las bacterias a la producción en masa de productos útiles para facilitar el suministro de energía (Biosci Biotechnol Biochem., (1997) 61: 840-845). En estudios sobre la regeneración de ATP en *E. coli*, se descubrió que el nivel de ATP en un microorganismo es aproximadamente un 150 % más alto que el de la cepa parental cuando algunos genes, lo que incluye los genes *ysaA* (NCBI ID Gen: 948085), *ydaS* (NCBI ID Gen: 945923) y *ybiX* (NCBI ID Gen: 947502) eran deficientes, respectivamente, y este hallazgo se aplicó a la producción de glutatión (FEMS Microbiol Lett., (2009) 297:217-224). Sin embargo, no hubo ningún informe que explicara directamente el aumento en la producción de aminoácidos provocado por la atenuación en las actividades de las proteínas codificadas por los genes. Los documentos WO2005/075626 A1 y WO2008/072891 A1 describen una *E. coli* que muestra una producción potenciada en L-treonina o L-triptófano, respectivamente, en donde el gen *tyR* o el gen *nfR*, respectivamente, se ha inactivado.

Descripción

Problema Técnico

55 Los presentes inventores han descubierto que aumentar el nivel intracelular de ATP, que se usa como la fuente de energía más abundante en las células que producen L-aminoácido, es eficaz para aumentar la producción de L-treonina o L-triptófano.

60 Un objeto de la presente invención es proporcionar una cepa de *E. coli* recombinante que tenga una productividad aumentada de L-treonina o L-triptófano mediante el aumento de la productividad de ATP.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir L-treonina o L-triptófano mediante el uso de la cepa de *E. coli* recombinante.

65

## Solución Técnica

Para lograr los objetos anteriores, una modalidad de la presente invención proporciona una cepa de *E. coli* que produce L-treonina o L-triptófano, en donde la cepa es una cepa recombinante que se modifica para atenuar (debilitar) la actividad de al menos dos proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una proteína YsaA que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, una proteína YdaS que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, y una proteína YbiX que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, en donde la actividad se atenúa mediante un método seleccionado del grupo que consiste en: 1) eliminar parte o la totalidad de un polinucleótido que codifica la proteína; 2) modificar una secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del polinucleótido que codifica la proteína; 3) modificar la secuencia polinucleotídica cromosómica que codifica la proteína para debilitar la actividad de la proteína; y 4) sus combinaciones.

Una modalidad de la presente invención proporciona, además, un método para producir L-treonina o L-triptófano, que comprende cultivar la cepa de *E. coli* descrita anteriormente.

## Efectos Ventajosos

La productividad de L-treonina o L-triptófano de un microorganismo que tiene productividad de L-treonina o L-triptófano se mejora al aumentar el nivel intracelular de ATP en dicho microorganismo. El método potencia la producción de L-treonina o L-triptófano al recuperar el equilibrio del metabolismo energético para aumentar la actividad celular y reducir el tiempo de cultivo.

## Descripción de los Dibujos

La Figura 1 muestra el nivel relativo de ATP (%) de una cepa que produce L-treonina con relación a la de su cepa parental.

La Figura 2 muestra el nivel relativo de ATP (%) de una cepa que produce L-triptófano con relación a la de su cepa parental.

## Mejor modo

A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

Una modalidad de la presente invención proporciona una cepa de *E. coli* que produce L-treonina o L-triptófano, en donde la cepa es una cepa recombinante que se modifica para atenuar la actividad de al menos dos proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una proteína YsaA que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, una proteína YdaS que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, y una proteína YbiX que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, en donde la actividad se atenúa por un método seleccionado del grupo que consiste en: 1) eliminar parte o la totalidad de un polinucleótido que codifica la proteína; 2) modificar una secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del polinucleótido que codifica la proteína; 3) modificar la secuencia polinucleotídica cromosómica que codifica la proteína para debilitar la actividad de la proteína; y 4) sus combinaciones.

Un microorganismo productor de L-treonina o L-triptófano incluye cualquier microorganismo capaz de producir L-treonina o L-triptófano, tales como bacterias *Escherichia* sp., *E. coli*, bacterias Corineformes, bacterias *Serratia* sp., bacterias *Providencia* sp. o similares.

En una modalidad específica de la presente invención, la cepa de *E. coli* recombinante CJ600 (KCCM 10812P) (Registro de Patente de Corea núm. 10-0792095) que tiene productividad de L-triptófano se usa para producir la cepa de *E. coli* de la invención. La cepa de *E. coli* CJ600 (KCCM 10812P) se obtiene mediante la modificación por ingeniería genética de una cepa de *E. coli* recombinante (KFCC 10066) que tiene productividad de L-fenilalanina para desensibilizar la auxotrofia para triptófano, bloquear la biosíntesis de L-fenilalanina y potenciar los genes relacionados con la biosíntesis de triptófano.

En otra modalidad específica de la presente invención, se usa la cepa recombinante de *E. coli* FTR2533 (KCCM-10541) (Registro de Patente de Corea núm. 10-0576342) que tiene productividad de L-treonina para producir la cepa de *E. coli* de la invención. La cepa de *E. coli* FTR2533 (KCCM-10541) se obtiene mediante modificación por ingeniería genética de una cepa mutante de *E. coli* (KFCC 10718) que tiene productividad de L-treonina para inactivar el gen *galR* de tipo silvestre.

Se predice que YsaA, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, es una hidrogenasa del componente de tipo ferredoxina 4Fe-4S, pero aún no se ha encontrado su función exacta.

Se predice que YdaS, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, es un regulador de la transcripción de unión al ADN, pero aún no se ha encontrado su función exacta.

YbiX, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, es una de la superfamilia de oxigenasas dependientes de Fe (II), que funciona como una oxidoreductasa que oxida su sustrato mediante el uso de oxígeno.

5 Los polipéptidos YsaA, YdaS e YbiX en *E. coli* tienen las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 2, 4 y 6, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas pueden depender de las especies o cepas de microorganismos.

10 Las proteínas pueden ser mutantes o variantes artificiales que tienen una secuencia de aminoácidos que incluye una sustitución, delección, inserción, adición o inversión de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones de la secuencia de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 2, 4 o 6, siempre que los mutantes o variantes artificiales puedan ser útiles para aumentar la producción de aminoácidos mediante la atenuación de las actividades descritas en la presente descripción. En la presente descripción, el número de "varios" aminoácidos difiere en dependencia de la posición o tipo de residuos de aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína, pero es particularmente 2-20, específicamente 2-10 y más específicamente 2-5. Además, esta sustitución, delección, inserción, adición o inversión de aminoácidos incluye, además, aquellas alteraciones provocadas por una mutación de origen natural o variación artificial basada en la diferencia en individuos o especies de microorganismos que tienen la actividad de los polipéptidos.

20 Como se usa en la presente descripción, el término "atenuación" significa que la actividad de una proteína se debilita ya sea mediante la delección de parte o la totalidad del gen que codifica la proteína, o mediante la modificación de una secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del gen, o mediante la modificación de la secuencia del gen cromosómico para debilitar la actividad de la proteína, o mediante sus combinaciones.

25 El método para la delección de parte o la totalidad del polinucleótido que codifica la proteína puede realizarse al reemplazar un polinucleótido que codifica una proteína objetivo endógena en el cromosoma, ya sea con un polinucleótido que tiene una parte de la secuencia de ácido nucleico eliminada o con un gen marcador, a través de un vector de inserción cromosómica.

30 En la presente descripción, el término "una parte de" una secuencia de ácido nucleico difiere en dependencia del tipo de gen, pero es independiente de la posición de este, y es específicamente 1-200, más específicamente 1-100 e incluso más específicamente 1-50.

35 Además, el método para modificar la secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del polinucleótido puede realizarse ya sea al inducir una mutación en la secuencia reguladora de la expresión mediante la delección, inserción, sustitución no conservadora o conservadora, o sus combinaciones, de uno o más nucleótidos para atenuar la actividad de la secuencia reguladora de la expresión, o al reemplazar la secuencia reguladora de la expresión con una actividad más débil. La secuencia reguladora de la expresión incluye un promotor, una secuencia de operador, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma, una secuencia que regula la terminación de la transcripción y la traducción.

40 Además, el método de modificar la secuencia de polinucleótidos cromosómicos que codifica la proteína puede realizarse ya sea al inducir una mutación en la secuencia mediante la delección, inserción, sustitución no conservadora o conservadora, o sus combinaciones, de uno o más nucleótidos para atenuar la actividad de la secuencia, o al reemplazar la secuencia con una secuencia de nucleótidos modificada que tiene una actividad más débil.

45 El polinucleótido que codifica la proteína puede introducirse en una célula huésped y puede sustituirse con un codón difícil de expresar en el huésped. Además, el extremo N-terminal o el extremo C-terminal de este puede extenderse o eliminarse, y el codón de inicio puede modificarse para regular el nivel de expresión.

50 Cada uno de los polinucleótidos descritos en la presente descripción puede tener una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente al menos 95 % e incluso más específicamente al menos 97 % con la secuencia de aminoácidos de cada uno representado por las SEQ ID NO: 2, 4 y 6, siempre que el polinucleótido pueda atenuar la actividad de la proteína de la variante. Más específicamente, los polinucleótidos descritos en la presente descripción tienen una secuencia de polinucleótidos representada por las SEQ ID NO: 1, 3 y 5, respectivamente.

55 Como se usa en la presente descripción, el término "homología" se refiere a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos. La homología puede determinarse mediante el uso de métodos bien conocidos, por ejemplo, el programa informático BLAST 2.0 que calcula parámetros tales como puntuación, identidad y similitud.

60 Además, las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente descripción pueden hibridarse con las secuencias de polinucleótidos representadas por las SEQ ID NO: 1, 3 y 5 y las sondas producidas a partir de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente en condiciones rigurosas, y pueden ser secuencias modificadas que codifican proteínas que funcionan normalmente.

65

Como se usa en la presente descripción, el término "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos. Alternativamente, el término se relaciona con polipéptidos o proteínas, lo que incluye derivados de estos (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, J. Sambrook y otros, Editores, 2da Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y otros, Editores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Específicamente, las "condiciones estrictas" se refieren a la hibridación a 65 °C en tampón de hibridación (3,5×SSC, Ficoll al 0,02 %, polivinilpirrolidona al 0,02 %, albúmina de suero bovino al 0,02 %, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5 %, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M a pH 7. Después de la hibridación, la membrana a la que se ha transferido el ADN se lava en 2XSSC a temperatura ambiente y después en 0,1-0,5XSSC/0,1 XSDS a 68 °C.

Como se usa en la presente descripción, el término "vector" se refiere a un constructo de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una proteína objetivo unida operativamente a una secuencia reguladora adecuada para poder expresar el gen objetivo en una célula huésped adecuada. La secuencia reguladora incluye un promotor capaz de iniciar la transcripción, cualquier operador para regular esta transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma de ARNm adecuado y una secuencia para regular la terminación de la transcripción y la traducción. Una vez transformado en un huésped adecuado, el vector puede replicarse o funcionar independientemente del genoma del huésped, o puede, en algunos casos, integrarse en el genoma mismo.

El vector que se usa puede ser cualquier vector conocido en la técnica, siempre que pueda replicarse en un huésped. Los ejemplos de los vectores usados comúnmente pueden incluir plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos naturales o recombinantes. Por ejemplo, el vector de fago o los vectores de cósmidos incluyen pWE15, M13, ΔBL3, ΔBL4, ΔXII, ΔSHII, ΔPII, Δ10, Δ11, Charon4A y Charon21A, y los vectores plasmídicos incluyen pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL1920 y plásmidos de tipo pET. Los vectores que pueden usarse incluyen cualesquiera vectores de expresión conocidos. Específicamente, pueden usarse los vectores pACYC177, pACYC184, pCL1920, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118 o pCCIBAC. Más específicamente, pueden usarse los vectores pACYC177, pCL1920 y pCCIBAC.

Además, el vector que se usa es un vector capaz de transformar células huésped, para insertar el polinucleótido que codifica la proteína objetivo en el cromosoma de la célula huésped. Ejemplos específicos del vector incluyen el vector lanzadera pECCG112 que puede autorreplicarse en ambas direcciones en *E. coli* y bacterias de tipo Corine (Kap-Soo, Noh, Kor. Jour. Microbiol. Julio de 1991, p149-154).

Además, el polinucleótido que codifica la proteína objetivo endógena en el cromosoma puede reemplazarse con un nuevo polinucleótido mediante un vector para su inserción en el cromosoma bacteriano. La inserción del polinucleótido en el cromosoma puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, recombinación homóloga. Debido a que el vector puede insertarse en el cromosoma por recombinación homóloga, puede comprender, además, un marcador de selección para confirmar su inserción en el cromosoma. El marcador de selección se usa para seleccionar una célula transformada con el vector, es decir, confirmar la inserción del polinucleótido objetivo. El marcador de selección que se usa puede seleccionarse de marcadores que proporcionan fenotipos seleccionables, tales como resistencia a fármacos, auxotrofia, resistencia a agentes citotóxicos o expresión de proteínas de superficie. Solo las células que expresan el marcador de selección pueden sobrevivir o mostrar diferentes fenotipos en el entorno tratado con el agente selectivo, y por lo tanto, las células transformadas pueden seleccionarse.

Como se usa en la presente descripción, el término "transformación" significa introducir un vector que comprende el polinucleótido que codifica la proteína objetivo en una célula huésped para poder expresar la proteína codificada por el polinucleótido en la célula huésped. Los polinucleótidos transformados incluyen todos los genes insertados en el cromosoma de la célula huésped o ubicados fuera del cromosoma, siempre que puedan expresarse en la célula huésped. Además, los polinucleótidos incluyen ADN y ARN, que codifican la proteína objetivo. Siempre que el polinucleótido pueda introducirse en la célula huésped y se exprese en ella, el gen puede introducirse en cualquier forma.

Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en la célula huésped en forma de un casete de expresión que es un constructo polinucleotídico que incluye todos los elementos para expresar el gen. El casete de expresión incluye un promotor que se une operativamente al gen, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión capaz de autorreplicarse. El polinucleótido también puede introducirse en la célula huésped por sí mismo, y unirse operativamente a la secuencia necesaria para la expresión en la célula huésped.

Específicamente, la atenuación de la actividad de la proteína que se codifica por el *gen ysaA*, *ydaS* o *ybiX* puede lograrse mediante la delección del gen. Específicamente, puede inducirse una mutación en el gen mediante el uso de productos químicos o luz tal como luz UV, por lo que se obtiene de esta manera una variante que tiene el gen eliminado. Alternativamente, puede obtenerse una variante que carece de la actividad de la proteína al sustituir el gen cromosómico con el nucleótido que carece de la actividad mediante una técnica de recombinación de genes, mediante un método de reemplazo de genes a través de recombinación homóloga.

Además, una modalidad de la presente invención también proporciona un método para producir L-treonina o L-triptófano, el método comprende cultivar una cepa de *E. coli* que produce L-treonina o L-triptófano, en donde la cepa es una cepa

- recombinante que se modifica para atenuar la actividad de al menos dos proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una proteína YsaA que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, una proteína YdaS que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 y una proteína YbiX que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, en donde la actividad se atenúa mediante un método seleccionado del grupo que consiste en: 1) eliminar parte o la totalidad de un polinucleótido que codifica la proteína; 2) modificar una secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del polinucleótido que codifica la proteína; 3) modificar la secuencia polinucleotídica cromosómica que codifica la proteína para debilitar la actividad de la proteína; y 4) sus combinaciones.
- El proceso de cultivo de la presente invención puede realizarse en medios adecuados y condiciones de cultivo conocidas en la técnica. Este proceso de cultivo puede modificarse fácilmente por cualquier experto en la técnica, en dependencia del tipo de cepa seleccionada. Los ejemplos del proceso de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo discontinuo, cultivo continuo y cultivo semicontinuo.
- Los medios y las condiciones de cultivo que se usan en el cultivo del microorganismo de la presente invención pueden ser aquellos siempre que se usen en el cultivo de microorganismos que pertenecen al género *Escherichia*, pero estos deben satisfacer adecuadamente los requisitos del microorganismo de la presente invención.
- En una modalidad específica de la presente invención, el microorganismo puede cultivarse en un medio convencional que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y similares adecuadas en condiciones aeróbicas mientras se ajusta la temperatura, el pH y similares.
- Las fuentes de carbono que pueden usarse en el método de la presente invención incluyen carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, sorbitol; alcoholes tales como alcohol de azúcar, glicerol, ácido pirúvico, ácido láctico y ácido cítrico; y aminoácidos tales como ácido orgánico, ácido glutámico, metionina y lisina. Además, pueden usarse fuentes naturales de nutrientes orgánicos tales como hidrolizados de almidón, melaza, melaza residual, salvado de arroz, yuca, bagazo y licor de maceración del maíz. Específicamente, las fuentes de nutrientes orgánicos incluyen glucosa y melaza pretratada estéril (es decir, melaza convertida en azúcares reducidos), y pueden usarse cantidades limitadas de fuentes de carbono sin limitación.
- Las fuentes de nitrógeno que pueden usarse en el método de la presente invención incluyen fuentes de nitrógeno inorgánico tales como amoníaco, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio; aminoácidos tales como ácido glutámico, metionina y glutamina; y fuentes orgánicas de nitrógeno tales como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta, licor de maíz, hidrolizado de caseína, harina de pescado o su producto digerido, torta de soja desgrasada o su producto digerido, etcétera. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación. El medio puede contener fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico y las sales correspondientes que contienen sodio, como fuentes de fósforo.
- Los compuestos inorgánicos que pueden usarse en el método de la presente invención incluyen cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de hierro, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sulfato de manganeso y carbonato de calcio. Además, el medio puede contener aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. Estos medios o precursores pueden añadirse al medio de manera discontinua o continua.
- Compuestos tales como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico pueden añadirse al medio de manera adecuada durante el cultivo para ajustar el pH del medio de cultivo.
- Además, durante el cultivo, puede usarse un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso para suprimir la formación de burbujas. Además, para mantener el medio de cultivo en un estado aeróbico, puede inyectarse oxígeno o gas que contiene oxígeno en el medio de cultivo. Además, para mantener el medio de cultivo en un estado anaeróbico o no aeróbico, no se inyecta gas, o puede inyectarse nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono en el medio de cultivo. El medio de cultivo se mantiene típicamente a una temperatura que varía de 27 °C a 37 °C, y específicamente de 30 °C a 35 °C. El cultivo del microorganismo puede continuar hasta que se obtenga el nivel deseado de la sustancia útil. Específicamente, el período de cultivo es de 10 a 100 horas.
- El método de la presente invención puede comprender, además, purificar o recuperar el L-aminoácido producido en la etapa de cultivo. El proceso de purificación o recuperación puede realizarse al purificar o recuperar el L-aminoácido deseado del medio de cultivo mediante el uso de un método adecuado seleccionado en dependencia del método usado para el cultivo del microorganismo, por ejemplo, un método de cultivo discontinuo, continuo o semicontinuo.
- A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos tienen fines ilustrativos.

### Ejemplos

- Ejemplo 1: Construcción de cepas que producen L-treonina y L-triptófano que tienen actividad atenuada de la proteína que se codifica por el *gen ysaA*, *ydaS* o *ybiX*

En este ejemplo, cada uno de los *genes ysaA*, *ydaS* e *ybiX* en la cepa que produce L-triptófano KCCM10812P (Registro de Patente de Corea núm. 10-0792095) y la cepa que produce L-treonina KCCM10541 (Registro de Patente de Corea núm. 10-0576342) se eliminó por recombinación homóloga.

5

La cepa parental que produce L-triptófano KCCM10812P es una cepa derivada de una variante de *E. coli* KFCC 10066 que tiene productividad de L-fenilalanina. Es una cepa de *E. coli* recombinante con productividad de L-triptófano, caracterizada porque la auxotrofia cromosómica para triptófano se desensibilizó, los *genes pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* se atenuaron y los genes *aroG* y *trpE* se modificaron.

10

Además, la cepa parental que produce L-treonina KCCM10541 es una cepa derivada de *E. coli* KFCC10718 (Publicación de Patente de Corea abierta a inspección pública núm. 1992-0008365). Tiene resistencia al análogo de L-metionina, un fenotipo auxotrofo para metionina, resistencia al análogo de L-treonina, un fenotipo auxotrofo para isoleucina permeable, resistencia al análogo de L-lisina y resistencia al ácido  $\alpha$ -aminobutírico, y es capaz de producir L-treonina.

15

Los *genes ysaA*, *ydaS* e *ybiX* a eliminar tienen las secuencias de polinucleótidos representadas por las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente.

20

Para este propósito, se usó el método de inactivación de una sola etapa (desarrollado por Datsenko KA y otros) que es una técnica de mutagénesis que usa la recombinasa roja lambda (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97: 6640-6645). Como marcador para confirmar la inserción en los genes, se usó el gen resistente al cloranfenicol de pUCprmfloxC (Publicación de Patente de Corea abierta a inspección pública núm. 2009-0075549).

25

Se amplificaron fragmentos de genes de aproximadamente 1200 pb por reacción en cadena de la polimerasa (en adelante denominada PCR) mediante el uso de pUCprmfloxC como plantilla y un par de cebadores 1 y 2, un par de cebadores 7 y 8 y un par de cebadores 13 y 14, que tienen una porción de cada uno de los tres genes y una porción del gen resistente al cloranfenicol de pUCprmfloxC. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 94 °C durante 30 seg, hibridación a 55 °C durante 30 seg y extensión a 72 °C durante 1 min.

Tabla 1

Núm. cebador	Secuencia	SEQ ID NO
1	5'- GTAGGGACGGCTCTCTGGCACTCTGCTGTTTTAGTGCAAAGGAGTGATCAGGTGACACTATAGAA CGCG-3'	7
2	5'- GGCATAAACAAAGCGCACTGTTCCGGCGTTGAGAAACGCCGGAAAAACGTTTAGTGGATCTGATGGG TACC-3'	8
3	5'- GCTTTGGACAAGTGCCAAAACCTTAAACATTTCCCTTCGTTGGATCAAAGCAGTAGGGACCGCCTCTCT GGC-3'	9
4	5'- ATTGAATTTGGAAGAAATTTGTAGGCCCGGATAAGGCGTTTACGCCCGCATCTGGCATAAACAAAGCGCA CTG- 3'	10
5	5'-GAGAGAAAAATCTCCTGAAA-3'	11
6	5'-CCTACATGATTTCTGCAATA-3'	12
7	5'- ATTGCGTTAGGCGTCGCCCTAATATTTCTGTGTGTTTTGGAGTTCATTCGAGGTGACACTATAGAACG CG-3'	13
8	5'- ATTCGATGTGCTCATGCTTGATTTTCATGAATCATTTGCCCTCTTGAIGTTTTAGTGGATCTGATGGGTA CC-3'	14

(continúa)

Núm. cebador	Secuencia	SEQ ID NO
9	5'- TTACATTAGGCAATCCCTACCCCTTACTGCATTAGGCACAGCCTATTGACAATTGCGTTAGGCGTCCG CTA-3'	15
10	5'- ATTGGCTACCCATGCCTGCCCTTTTCGGCTGCTAGGGCAACAACACTGATTCGATGTGCTCATGC TTG-3'	16
11	5'-TATAGAGCCTTTCTTAATCC-3'	17
12	5'-CGCAGATATTCCTCAGTAAT-3'	18
13	5'- CAATTCGTGATTCAGATGTGGGGCGCAGGCCCACTTTGGAGAAATTGTAGGTGACACTATAGAACG CG-3'	19
14	5'- TGTACAGTTAAGTGTAGCTAATCCAGGGACGAACTCGGGCAGTTCGAAGCATAGTGGATCTGATGGG TACC-3'	20
15	5'- ACCGTTATCACCCGGGGAGCCCAAGAACCCTTCTTGCTCACAGCCAATATGCATTTCTGATTCAGATG TGG-3'	21
16	5'- GTCATCGTTAGCCCAACCGGATGCCATATCGACCTCCCCATATCAATACTTGTACAGTTAAGTGTAG CTA-3	22
17	5'-AAAGGTTCAGACGGCGCGGT-3'	23
18	5'-TAAGCGCACGCCAGGAATGG-3'	24

Además, los fragmentos de ADN obtenidos por la amplificación por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, y después se eluyeron y se usaron como plantillas en la PCR secundaria. La PCR secundaria se realizó para que las regiones terminales 5' y 3' de los fragmentos de ADN primarios tuvieran 20 pares de bases de nucleótidos complementarias. Se amplificaron por PCR fragmentos de genes de aproximadamente 1300 pb mediante el uso de los productos de PCR primaria eluidos como plantillas y un par de cebadores 3 y 4, un par de cebadores 9 y 10 y un par de cebadores 15 y 16, que incluyen las regiones 5' y 3' de los genes. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 94 °C durante 30 seg, hibridación a 55 °C durante 30 seg y extensión a 72 °C durante 1 min. Los fragmentos de ADN obtenidos por la amplificación por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % y después se eluyeron y se usaron en la recombinación.

De acuerdo con el método desarrollado por Datsenko KA y otros (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97:6640-6645), una cepa de *E. coli* transformada con un pKD46 se hizo competente, y después se transformó con los fragmentos de genes de 1300 pb obtenidos por PCR. Las cepas resultantes se seleccionaron en medio LB que tiene resistencia al cloranfenicol. La PCR se realizó mediante el uso de un par de cebadores 5 y 6, un par de cebadores 11 y 12 y un par de cebadores 17 y 18, y los productos de amplificación tenían tamaños de 1450, 1530 y 1640 pb, respectivamente, y se confirmó que los genes se eliminaron.

El pKD46 se eliminó de las cepas recombinantes primarias que tienen resistencia al cloranfenicol, y después se introdujo un vector pJW168 en las cepas, y el gen marcador de cloranfenicol se eliminó de las células bacterianas (Gene, (2000) 247:255-264). Las células bacterianas resultantes fueron productos de amplificación de aproximadamente 400 pb, 500 pb y 600 pb obtenidos mediante un par de cebadores 5 y 6, un par de cebadores 11 y 12 y un par de cebadores 17 y 18, y se confirmó que se logró la delección del gen deseado.

De acuerdo con el método descrito anteriormente, se construyeron las cepas que producen L-treonina KCCM10541  $\Delta ysaA$ , KCCM10541  $\Delta ydaS$  y KCCM10541  $\Delta ybiX$ . Además, se construyeron las cepas que producen L-triptófano KCCM10812P  $\Delta ysaA$ , KCCM10812P  $\Delta ydaS$  y KCCM10812P  $\Delta ybiX$ .

Ejemplo 2: Construcción de cepas recombinantes que producen L-treonina y L-triptófano que tienen delección de dos o más genes *ysaA*, *ydaS* e *ybiX*

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo, se construyeron cepas recombinantes que tienen una delección de dos o más de los genes.

Se introdujo un vector pKD46 para usar recombinasa roja lambda en las cepas que tenían una delección de uno cualquiera de los genes, y después las cepas se hicieron competentes. Además, los fragmentos de genes amplificados por PCR para incluir una porción de los tres genes y el gen resistente al cloranfenicol de pUCprmflox<sub>C</sub> se transformaron en diferentes cepas que tenían una delección de uno de los genes. Las cepas resultantes se tamizaron en medio LB con resistencia al cloranfenicol, y la delección de una combinación de los genes se confirmó mediante el uso de los pares de cebadores descritos en el Ejemplo 1.

De acuerdo con el método descrito anteriormente, se construyeron las cepas que producen L-treonina KCCM10541  $\Delta ysaA \Delta ydaS$ , KCCM10541  $\Delta ydaS \Delta ybiX$ , KCCM10541  $\Delta ybiX \Delta ysaA$  y KCCM10541  $\Delta ysaA \Delta ydaS \Delta ybiX$ . Además, se construyeron las cepas que producen L-triptófano KCCM10812P  $\Delta ysaA \Delta ydaS$ , KCCM10812P  $\Delta ydaS \Delta ybiX$ , KCCM10812P  $\Delta ybiX \Delta ysaA$  y KCCM10812P  $\Delta ysaA \Delta ydaS \Delta ybiX$ .

Entre las cepas recombinantes obtenidas como se describe anteriormente, KCCM10541  $\Delta ysaA \Delta ydaS \Delta ybiX$  y KCCM10812P  $\Delta ysaA \Delta ydaS \Delta ybiX$  se denominaron "*E. coli* CA03-4257P" y "*E. coli* CA04-2002", respectivamente, y se depositaron en el Culture Center of Microorganisms de Corea (361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), una autoridad depositaria internacional, el 29 de diciembre de 2011 con los números de acceso KCCM11243P y KCCM11245P, respectivamente.

Ejemplo 3: Medición de los niveles de ATP en cepas que producen L-treonina y cepas que producen L-triptófano construidas

En este ejemplo, los niveles de ATP en las cepas construidas en los ejemplos 1 y 2 se midieron cuantitativamente.

Para este propósito, se usó el método desarrollado por Kiyotaka Y. Hara y otros, que usa luciferasa ("*An Efficient Method for Quantitative determination of Cellular ATP Synthetic Activity*", J Biom Scre, (2006) V11:Núm.3:PP310-17).

Específicamente, las cepas que tienen diferentes caracteres genéticos se cultivaron durante toda la noche en medio líquido LB que contiene glucosa. El sobrenadante se eliminó por centrifugación, las células bacterianas se lavaron con Tris-Cl 100 mM (pH 7,5), y después se trataron con tampón PB (tampón permeable: glucosa al 40 % [v/v], Tritón X-100 al 0,8 % [v/v]) durante 30 minutos para liberar el ATP intracelular. A continuación, el sobrenadante se eliminó por centrifugación, y se añadió luciferina a las células como sustrato para la luciferasa. Se dejaron reposar las células durante 10 minutos, y después se midió la actividad de luciferasa en las células con un luminómetro para determinar

cuantitativamente el nivel de ATP. Los resultados de la medición se muestran en las Figuras 1 y 2. Todos los resultados se registraron como el promedio de tres experimentos repetidos.

Como puede verse en las Figuras 1 y 2, los niveles de ATP en las cepas construidas a partir de la cepa que produce L-treonina y la cepa que produce L-triptófano en los Ejemplos 1 y 2 aumentaron todos. Además, el nivel de ATP fue mayor en las cepas que tenían una delección de una combinación de genes que en las cepas que tenían una delección de uno de los genes.

Ejemplo 4: Examen del título de la cepa que produce L-treonina, que tiene actividad atenuada de solo una o una combinación de enzimas que se codifican por los *genes ysaA, ydaS e ybiX*, en medio que contiene glucosa

De acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2, solo uno o una combinación de los *genes ysaA, ydaS e ybiX* se eliminó de la cepa que produce L-treonina KCCM10541 (Registro de Patente de Corea núm. 10-0576342) para aumentar el nivel intracelular de ATP. Los títulos de las cepas resultantes se evaluaron mediante el uso de glucosa como fuente de carbono.

Específicamente, las cepas que tienen diferentes caracteres genéticos se cultivaron durante toda la noche en medio sólido LB en una incubadora a 33 °C y se inocularon mediante un asa de platino en 25 ml de medio que contiene glucosa que tiene la composición que se muestra en la Tabla 2 más abajo. A continuación, las cepas se incubaron en una incubadora a 33 °C y a 200 rpm durante 50 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 3 más abajo. Todos los resultados se registraron como el promedio de tres resultados de matraces.

Tabla 2

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

Tabla 3

Cepa	OD	Consumo de glucosa (g/l)*	L-treonina (g/l)**
KCCM10541	23,7	30,3	31,8
KCCM10541 $\Delta ysaA$	24,6	33,4	32,2
KCCM10541 $\Delta ydaS$	23,5	34,7	33,0
KCCM10541 $\Delta ybiX$	22,7	33,9	32,7
KCCM10541 $\Delta ysaA \Delta ydaS$	24,9	35,1	32,9
KCCM10541 $\Delta ydsS \Delta ybiX$	24,5	36	33,1
KCCM10541 $\Delta ybiX \Delta ysaA$	25,0	32,1	33,0
KCCM10541 $\Delta ysaA \Delta ydaS \Delta ybiX$	26,1	36,9	33,9
* medido a las 30 horas			
** medido a las 50 horas			

Como puede verse en la Tabla 3 anterior, hemos demostrado que el uso de glucosa de las cepas de *E. coli* recombinantes que producen L-treonina aumentó hasta aproximadamente un 22 % en comparación con el de la cepa parental, y la producción de treonina de las cepas recombinantes aumentó hasta aproximadamente un 7 % en comparación con la de la cepa parental. En vista del nivel de ATP mostrado en la Figura 1, estos resultados indican que la tasa de consumo de glucosa o la productividad de aminoácidos de las cepas recombinantes se incrementó por el aumento del nivel de ATP.

Ejemplo 5: Examen del título de la cepa que produce L-treonina, que tiene actividad atenuada de solo una o una combinación de enzimas que se codifican por los *genes ysaA, ydaS e ybiX*, en medio que contiene sacarosa

De acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2, solo uno o una combinación de los *genes ysaA, ydaS e ybiX* se eliminó de la cepa que produce L-treonina KCCM10541 (Registro de Patente de Corea núm. 10-0576342) para aumentar el nivel intracelular de ATP. Los títulos de las cepas resultantes se evaluaron mediante el uso de sacarosa como fuente de carbono.

Específicamente, las cepas que tienen diferentes caracteres genéticos se cultivaron durante toda la noche en medio sólido LB en una incubadora a 33 °C y se inocularon mediante un asa de platino en 25 ml de medio que contiene sacarosa con la composición que se muestra en la Tabla 4 más abajo. A continuación, las cepas se incubaron en una incubadora a 33 °C y a 200 rpm durante 48 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 5 más abajo. Todos los resultados se registraron como el promedio de tres resultados de matraces.

Tabla 4

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

Tabla 5

Cepa	OD	consumo de sacarosa (g/l)*	L-treonina (g/l)**
KCCM10541	26,2	40,0	37,0
KCCM10541 $\Delta$ ysaA	27,1	40,9	37,5
KCCM10541 $\Delta$ daS	26,7	41,7	37,8
KCCM10541 $\Delta$ ybiX	25	41,1	38,1
KCCM10541 $\Delta$ ysaA $\Delta$ ydaS	27,5	42,1	38,0
KCCM10541 $\Delta$ dsS $\Delta$ ybiX	27,2	43,0	38,1
KCCM10541 $\Delta$ ybiX $\Delta$ ysaA	28,3	42,8	38,7
KCCM10541 $\Delta$ ysaA $\Delta$ ydaS $\Delta$ ybiX	27,9	43,9	38,9
* medido a las 24 horas			
** medido a las 48 horas			

Como puede verse en la Tabla 5 anterior, hemos demostrado que el uso de sacarosa de las cepas de *E. coli* recombinantes que producen L-treonina aumentó hasta aproximadamente un 10 % en comparación con el de la cepa parental, y la producción de treonina de las cepas recombinantes aumentó hasta aproximadamente un 5 % en comparación con la de la cepa parental. En vista del nivel de ATP mostrado en la Figura 1, estos resultados indican que la actividad y la tasa de consumo de sacarosa o la productividad de aminoácidos de las cepas recombinantes se incrementaron por el aumento del nivel de ATP.

Ejemplo 6: Examen del título de la cepa que produce L-triptófano, que tiene actividad atenuada de solo una o una combinación de enzimas que se codifican por los genes *ysaA*, *ydaS* e *ybiX*, en medio que contiene glucosa

De acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2, solo uno o una combinación de los genes *ysaA*, *ydaS* e *ybiX* se eliminó de la cepa que produce L-triptófano KCCM10812P (Registro de Patente de Corea núm. 10-0792095) para aumentar el nivel intracelular de ATP. Los títulos de las cepas resultantes se evaluaron mediante el uso de glucosa como fuente de carbono.

Para examinar el título, las cepas se inocularon mediante un asa de platino en medio sólido LB y después se cultivaron durante toda la noche en una incubadora. Y, se inoculó mediante un asa de platino en 25 ml de medio de título por matraz con la composición que se muestra en la Tabla 6 más abajo. A continuación, las cepas se incubaron en una incubadora a 37 °C y a 200 rpm durante 48 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 7 más abajo. Todos los resultados se registraron como el promedio de tres resultados de matraces.

Tabla 6

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

Tabla 7

Cepa	OD	Consumo de glucosa (g/l)*	L-triptófano (g/l)**
KCCM10812P	18,2	47,2	5,7
KCCM10812P $\Delta$ ysaA	18,3	48,3	6,9
KCCM10812P $\Delta$ ydaS	18	49,1	6,6
KCCM10812P $\Delta$ ybiX	17,7	50	6,0
KCCM10812P $\Delta$ ysaA $\Delta$ ydaS	17,9	48,4	7,5
KCCM10812P $\Delta$ ydaS $\Delta$ ybiX	18,7	49,3	7,6
KCCM10812P $\Delta$ ybiX $\Delta$ ysaA	19,9	49	7,3
KCCM10812P $\Delta$ ysaA $\Delta$ ydaS $\Delta$ ybiX	18,9	51,9	7,9
* medido a las 33 horas			
** medido a las 48 horas			

Como puede verse en la Tabla 7 anterior, hemos demostrado que el consumo de glucosa de las cepas de *E. coli* recombinantes que producen L-treonina aumentó hasta aproximadamente un 10 % en comparación con el de la cepa parental, y la producción de triptófano de las cepas recombinantes aumentó hasta aproximadamente un 38 % en comparación con la de la cepa parental. En vista del nivel de ATP mostrado en la Figura 2, estos resultados indican que la actividad y la tasa de consumo de glucosa o la productividad de aminoácidos de las cepas recombinantes se incrementaron por el aumento del nivel de ATP.

Número de acceso

Autoridad depositaria: Culture Center of Microorganisms de Corea (Internacional)

Número de acceso: KCCM11243P

Fecha de deposición: 29 de diciembre de 2011

Autoridad depositaria: Culture Center of Microorganisms de Corea (Internacional)

Número de Acceso: KCCM11245P

Fecha de deposición: 29 de diciembre de 2011

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> MICROORGANISMO CAPAZ DE PRODUCIR L-AMINOÁCIDO Y MÉTODO PARA PRODUCIR L-AMINOÁCIDO MEDIANTE EL USO DEL MISMO

<130> PA11-0471

<160> 24

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 474

<212> AND

<213> Escherichia coli

ES 2 796 799 T3

<400> 1

5 atgaaccggt ttattattgc ggatgcgacg aaatgtatcg gttgccgtac ctgtgaagtg 60  
 gcttgccgag tgtcgcatca tgagaatcag gattgcgctg cgttgtcacc agacgagttt 120  
 atttcccgta ttcgtgtcat taaagaccac tgctggacca cggcagtagc ctgtcatcag 180  
 10 tgtgaagatg caccgtgctg gaatgtctgc cctggtgacg cgataagccg cgaacatggg 240  
 catattttccg ttgaacaaac acgttgcatg ggctgtaaaa gctgtatgct ggcttgcccg 300  
 tttggtgcca tggaggtcgt ttcttcgctg aaaaaggcga gggcgattaa gtgcgatctg 360  
 15 tgctggcatc gggagacggg accggcctgt gttgaagcct gcccgacaaa ggcgttgacg 420  
 tgcattggatg tcgagaaagt gcagcggcat cggctacggc agcagcctgt ttga 474

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

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

<210> 3

<211> 297

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 3

60

65

ES 2 796 799 T3

atgaaaaaag agaactattc attcaagcaa gcttgtgctg ttgtcggtag gcaatcagca 60  
 atggctaggc ttttaggtgt atcacctcca agcgtaaatc aatggatcaa aggggtacgt 120  
 5 caattgcctg ccgagagatg tccagcaatt gaacgtgcaa caagaggtga ggttctgtgc 180  
 gaagaacttc gtcctgatat tgactgggtca tatttacgac gttcggcatg ttgttcgcag 240  
 aatatgtcag tgaagcaact aatgacagt aacaaatcct catttgatca tacctga 297

10 <210> 4  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

15 <400> 4  
 Met Lys Lys Glu Asn Tyr Ser Phe Lys Gln Ala Cys Ala Val Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Gln Ser Ala Met Ala Arg Leu Leu Gly Val Ser Pro Pro Ser Val  
 20 20 25 30  
 Asn Gln Trp Ile Lys Gly Val Arg Gln Leu Pro Ala Glu Arg Cys Pro  
 35 40 45  
 25 Ala Ile Glu Arg Ala Thr Arg Gly Glu Val Leu Cys Glu Glu Leu Arg  
 50 55 60  
 Pro Asp Ile Asp Trp Ser Tyr Leu Arg Arg Ser Ala Cys Cys Ser Gln  
 65 70 75 80  
 30 Asn Met Ser Val Lys Gln Leu Asn Asp Ser Asn Lys Ser Ser Phe Asp  
 85 90 95  
 His Thr

35 <210> 5  
 <211> 678  
 <212> ADN  
 <213> Escherichia coli

40 <400> 5  
 atgatgtacc acattcccgg cgtgttatcg ccacaggacg togctcgttt tcgcgaacaa 60  
 ctggaacaag ccgaatgggt ggatggagcg gtcaccaccg ggcgacaagg tgcgcaagtt 120  
 aagaacaatc aacaggtcga caccgcgacg acgttatcag ccgccctgca aatgaggtg 180  
 45 ctgaacgcgg ttaaccaaca tgctttattc ttgcccgg ccttgccgog taccctttcc 240  
 acgccgctgt ttaatcgcta tcagaacaat gaaacctatg gtttccatgt ggatggcgca 300  
 50 gtacgcagcc atccacaaaa cggctggatg cgtactgacc tttctgccac gctgttttta 360  
 agcgatccac aaagctacga cggcggcgaa ctggctggtta atgacacctt cggacaacat 420  
 cgggtaaaac tcccggcagc cgatctcgtg ttgtatccct ccagcagcct gcattgcgtg 480  
 55 acaccogtaa cccgcggcgt acgagtggca tcatttatgt ggatccagtc gatgatccgc 540  
 gatgataaaa agcgcgccat gctgtttgaa ctggacaaca atattcagtc gctgaaaagc 600  
 cgctacggcg aaagtgaaga gatcctgtcg ctgcttaatc tttatcataa tctgctgcgg 660  
 60 gaatggctcg agatctga 678

65 <210> 6  
 <211> 225  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

ES 2 796 799 T3

<400> 6

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

Ile  
 225

<210> 7  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador 1

<400> 7

gtagggacgc gctctctggc actctgctgt tttagtgcaa aggagtgatc aggtgacact 60

atagaacgcg 70

<210> 8  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador 2

<400> 8

ES 2 796 799 T3

ggcataaaca aagcgcactg ttccggcggt gagaaacgcc ggaaaacggt tagtggatct 60  
 gatgggtacc 70  
 5  
 <210> 9  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> cebador 3  
 <400> 9  
 15  
 gctttggaca agtgccaaaa ctttaacatt tccttcggtg gatcaaagca gtagggacgc 60  
 gctctctggc 70  
 20  
 <210> 10  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> cebador 4  
 <400> 10  
 30  
 attgaatttg gaagaatttg taggccggat aaggcggtta cgccgatct gccataaaca 60  
 aagcgcactg 70  
 35  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> cebador 5  
 <400> 11  
 gagagaaaa tctcctgaaa 20  
 45  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> cebador 6  
 <400> 12  
 cctacatgat ttctgcaata 20  
 55  
 <210> 13  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> cebador 7  
 <400> 13  
 65

ES 2 796 799 T3

	attgcgtag gcgtcgcta atattctgt gtgttttg agttcattcg aggtgacact	60
	atagaacgcg	70
5	<210> 14 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> cebador 8  <400> 14	
15	attcgatgtg ctcatgcttg attttcatga atcatttgcc tcttgatgtt tagtggatct	60
	gatgggtacc	70
20	<210> 15 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> cebador 9	
25	<400> 15	
	ttacattagg caatccctac ccttactgca ttaggcacag cctattgaca attgcgtag	60
30	gcgtcgcta	70
35	<210> 16 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial  <220> <223> cebador 10	
40	<400> 16	
	attggtacc catgcctgcc ctttttcggc tgctagggca aacaacactg attcgatgtg	60
	ctcatgcttg	70
45	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> cebador 11  <400> 17 tatagagcct ttctaatcc      20	
55	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> cebador 12  <400> 18 cgcagatatt ctcagtaat      20	
65		



# ES 2 796 799 T3

<210> 24  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5

<220>  
<223> cebador 18

10

<400> 24  
taagcgcacg ccaggaatgg 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una cepa de *E. coli* que produce L-treonina o L-triptófano, en donde la cepa es una cepa recombinante que se modifica para atenuar la actividad de al menos dos de las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una proteína YsaA que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, una proteína YdaS que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4, y una proteína YbiX que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 6, en donde la actividad se atenúa al eliminar parte o la totalidad de un polinucleótido que codifica la proteína.
- 10 2. La cepa de *E. coli* que produce L-treonina o L-triptófano de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína YsaA es codificada por una secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1, la proteína YdaS es codificada por una secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 3, y la proteína YbiX es codificada por una secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 5.
- 15 3. La cepa de *E. coli* que produce L-treonina o L-triptófano de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cepa de *E. coli* es la *Escherichia coli* que produce L-treonina CA03-4257P (KCCM11243P).
- 20 4. La cepa de *E. coli* que produce L-treonina o L-triptófano de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cepa de *E. coli* es la *Escherichia coli* que produce L-triptófano CA04-2002 (KCCM11245P).
- 25 5. Un método para producir L-treonina o L-triptófano, el método comprende cultivar una cepa de *E. coli* que produce L-treonina o L-triptófano, en donde la cepa es una cepa recombinante que se modifica para atenuar la actividad de al menos dos de las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en una proteína (YsaA) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2, una proteína (YdaS) que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 4 y una proteína (YbiX) que tiene una secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 6, en donde la actividad se atenúa al eliminar parte o la totalidad de un polinucleótido que codifica la proteína.
- 30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la cepa de *E. coli* es la *Escherichia coli* que produce L-treonina CA03-4257P (KCCM11243P).
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la cepa de *E. coli* es la *Escherichia coli* que produce L-triptófano CA04-2002 (KCCM11245P).

Figura 1.

Cepa que produce L-treonina

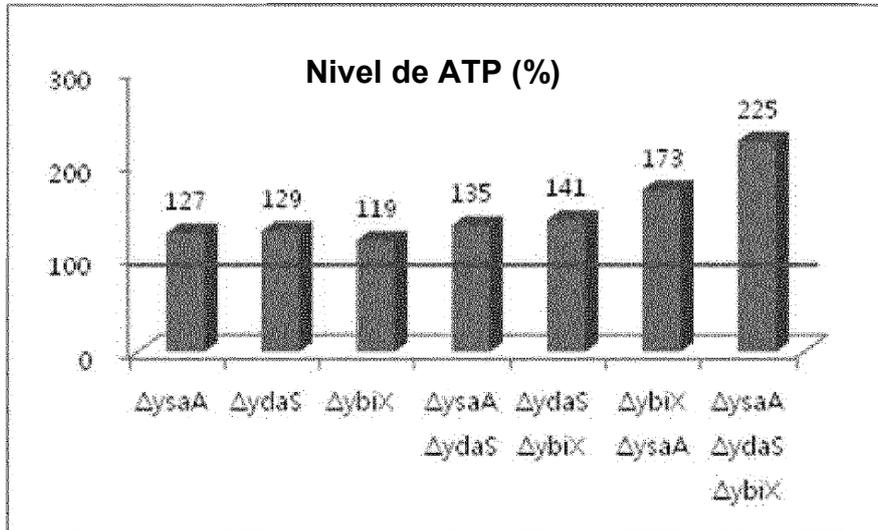


Figura 2.

Cepa que produce L-triptófano

