

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 999**

51 Int. Cl.:

C12P 13/04 (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12P 13/14 (2006.01)
C12P 13/22 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2007** **PCT/JP2007/067440**
87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2008** **WO08044409**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2007** **E 07806881 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** **EP 2080808**

54 Título: **Método para la producción de L-aminoácido**

30 Prioridad:

10.10.2006 JP 2006276659

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.01.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

OKUTANI, SATOSHI;
FUJIKI, SHINYA y
IWATANI, SHINTARO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 800 999 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la producción de L-aminoácido

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una técnica para la industria de la fermentación, es decir, a un método para producir de manera eficiente un L-aminoácido, especialmente aminoácidos hidrófobos, L-treonina y ácido L-glutámico, mediante fermentación usando un microorganismo. Los L-aminoácidos hidrófobos se usan como componentes de mezclas de nutrientes para atención médica. Además, estos aminoácidos se usan de diversas maneras como aditivos para piensos y reactivos en la industria farmacéutica y la industria química. Además, la L-fenilalanina también se usa como materia prima de edulcorantes. Además, la L-treonina se usa para piensos y el ácido L-glutámico se usa ampliamente como materia prima de sazónadores, etc.

15 Antecedentes de la técnica

Los L-aminoácidos se producen industrialmente mediante fermentación usando bacterias corineformes que tienen la capacidad de producción de L-aminoácido o bacterias que producen aminoácidos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. (documento EP-A-877090, documento EP-A-837134). Como tales bacterias que producen aminoácidos, se usan cepas aisladas de la naturaleza o cepas de variantes artificiales de tales cepas, cepas recombinantes de las que se potencia la enzima de biosíntesis de L-aminoácido mediante recombinación genética y así sucesivamente para mejorar la productividad.

Los ejemplos de cepas para producir L-triptófano, que es un aminoácido hidrófobo, mediante fermentación incluyen cepas con actividad potenciada de una de más enzimas tales como antranilato sintasa, fosfoglicerato deshidrogenasa y triptófano sintasa (documento WO94/08031) y cepas transformadas con el operón de triptófano (patentes japonesas abiertas a consulta por el público (Kokai) n.º 57-71397 y 62-244382, patente estadounidense n.º 4.371.614).

Además, para la fermentación de ácido L-glutámico, la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 63-214189 divulga una técnica para aumentar la capacidad de producción de ácido L-glutámico amplificando genes que codifican para glutamato deshidrogenasa (gdh), isocitrato deshidrogenasa (icdA), aconitato hidratasa (acnA, acnB) y citrato sintasa (gltA).

Además, para la fermentación de L-treonina, la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2001-346578 divulga una bacteria que produce L-treonina en la que se potencian el gen de aspartocinasa III (lysC), gen de aspartato semialdehído deshidrogenasa (asd), gen de aspartocinasa I (thrA), gen de homoserina cinasa (thrB) y gen de treonina sintasa (thrC) que se codifican mediante operón treonina.

La productividad de L-aminoácido ha aumentado considerablemente por el cultivo mencionado anteriormente de microorganismos o la mejora de los métodos de producción. Sin embargo, con el fin de responder a aumentos adicionales en la demanda en el futuro, todavía es necesario el desarrollo de métodos que proporcionan producción más eficiente de L-aminoácido hidrófobo a un coste menor, y, por tanto, todavía representa una necesidad en la técnica.

Mientras tanto, se conoce un método para realizar fermentación con L-aminoácido de cristalización acumulado en medio de cultivo (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-288, publicación de patente europea n.º 1078989). El propósito de este método es mantener la concentración del L-aminoácido en el medio de cultivo para que sea constante precipitando el L-aminoácido acumulado en el medio de cultivo.

Además, en cuanto al ácido L-glutámico, se divulga un método de producción de ácido L-glutámico usando un microorganismo que puede acumular ácido L-glutámico con precipitación de ácido L-glutámico (patente estadounidense n.º 6.905.819).

Además, como método para cristalizar un L-aminoácido hidrófobo, se conoce hasta la fecha el método de purificación de un L-aminoácido usando un derivado de celulosa soluble en agua (publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º 5-76463). Sin embargo, no se conoce ningún método para realizar la fermentación con precipitación de L-aminoácido, en el que el L-aminoácido precipite en un medio con productividad mejorada del L-aminoácido añadiendo un polímero tal como un derivado de celulosa soluble en agua al medio.

60 Divulgación de la invención

Objeto que va a lograrse mediante la invención

Un objeto de la presente invención es mejorar la productividad de L-aminoácido o pureza de L-aminoácido en cristales de L-aminoácido en la producción del L-aminoácido mediante fermentación.

Medios para lograr el objeto

El inventor de la presente invención llevó a cabo diversas investigaciones, como resultado, encontró que añadiendo un polímero seleccionado del grupo que consiste en derivados de celulosa solubles en agua, compuestos de polivinilo, sales de ácido algínico y sales de ácido poliacrílico a un medio de fermentación, la productividad del L-aminoácido se mejoró, y las impurezas en cristales del L-aminoácido que precipita en el medio podían reducirse y lograrse la presente invención.

La presente invención proporciona, por tanto, lo siguiente.

(1) Un método para producir un L-aminoácido mediante fermentación que comprende cultivar un microorganismo que tiene la capacidad de producción de L-aminoácido en un medio líquido para acumular el L-aminoácido en el medio con precipitación del L-aminoácido, en el que el medio contiene un polímero seleccionado del grupo que consiste en un derivado de celulosa soluble en agua, un compuesto de polivinilo soluble en agua, un compuesto de polivinilo soluble en disolvente orgánico polar, una sal de ácido algínico y una sal de ácido poliacrílico.

(2) El método mencionado anteriormente, en el que el polímero se selecciona del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), dietilaminoacetato de polivinilacetato, arginato de sodio y poliacrilato de sodio.

(3) El método mencionado anteriormente, en el que el microorganismo es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* o una bacteria corineforme.

(4) El método mencionado anteriormente, en el que dicha bacteria pertenece al género *Escherichia* o género *Pantoea*.

(5) El método mencionado anteriormente, en el que dicho L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-triptófano, L-fenilalanina, L-tirosina, L-treonina y ácido L-glutámico.

(6) El método mencionado anteriormente, en el que el polímero es metilcelulosa y el medio líquido contiene 1 g/l o más de metilcelulosa.

(7) El método mencionado anteriormente, en el que dicho L-aminoácido es L-fenilalanina.

(8) Un método para producir un éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina, que comprende producir L-fenilalanina según el método mencionado anteriormente y sintetizar el éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina a partir de ácido aspártico o su derivado y la L-fenilalanina obtenida.

(9) El método mencionado anteriormente, que comprende además esterificar L-fenilalanina para generar un éster alquílico inferior de L-fenilalanina, condensar el éster alquílico inferior de L-fenilalanina con el derivado de ácido aspártico, en el que el derivado es anhídrido N-acil-L-aspártico, separar el éster alquílico inferior de N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina de la mezcla de reacción e hidrogenar el éster alquílico inferior de N-acil- α -1-aspartil-L-fenilalanina para generar el éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

El método de la presente invención es un método para producir un L-aminoácido mediante fermentación que comprende cultivar un microorganismo que tiene la capacidad de producción de L-aminoácido en un medio líquido para producir y acumular el L-aminoácido con precipitación del L-aminoácido en el medio, en el que el medio contiene un polímero seleccionado del grupo que consiste en un derivado de celulosa soluble en agua, un compuesto de polivinilo soluble en agua, un compuesto de polivinilo soluble en disolvente orgánico polar, una sal de ácido algínico y una sal de ácido poliacrílico.

El término "L-aminoácido" denominado en la presente invención no se limita particularmente siempre que se acumule en un medio con precipitación en el medio durante la fermentación usando un microorganismo. Los ejemplos específicos incluyen aminoácidos hidrófobos y aminoácidos ácidos. Los ejemplos de los aminoácidos hidrófobos incluyen L-valina, L-leucina y L-isoleucina, que son aminoácidos de cadena ramificada, L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina, que son L-aminoácidos aromáticos. Además, los ejemplos de los aminoácidos ácidos incluyen ácido L-glutámico. Los L-aminoácidos también incluyen L-treonina.

En la presente invención, los ejemplos del derivado de celulosa soluble en agua incluyen carboximetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilcelulosa, etc., los ejemplos del compuesto de polivinilo soluble en agua o el compuesto de polivinilo soluble en disolvente orgánico polar incluyen polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), dietilaminoacetato de polivinilacetato, etc., los ejemplos de la sal de ácido algínico incluyen sales de metal alcalino de ácido algínico tales como arginato de sodio, etc., y los ejemplos de sal de

ácido poliacrílico incluyen poli(acrilato de sodio), etc.

Esto polímeros pueden añadirse de manera independiente al medio o pueden añadirse de manera arbitraria dos o más tipos de ellos al medio en combinación.

La concentración del polímero en el medio no está limitada particularmente siempre que sea una concentración que no inhiba la producción y precipitación del L-aminoácido objetivo. La concentración de polímero adecuada puede determinarse de manera apropiada según el microorganismo que va a usarse, el L-aminoácido objetivo y el tipo del polímero que va a usarse. Por ejemplo, puede determinarse una concentración adecuada añadiendo un polímero a un medio en diversas concentraciones y midiendo la tasa de rendimiento o producción y cantidad de L-aminoácido precipitado. Específicamente, la concentración de polímero es, por ejemplo, preferiblemente de 10 mg/l o más, más preferiblemente de 1 g/l o más, en particular preferiblemente de 1,7 g/l o más. Aunque el límite superior de la concentración no se limita particularmente siempre que sea una concentración que no inhiba la producción y precipitación del L-aminoácido objetivo, es de, por ejemplo, 2 g/l.

La cantidad del polímero en el medio puede medirse mediante un método adecuado para un tipo específico del polímero. Por ejemplo, metilcelulosa etc., puede medirse mediante el ensayo de metoxilo. El ensayo de metoxilo es un método de adición de ácido yodhídrico a una muestra, calentar la mezcla, oxidar el yoduro de metilo producido con bromo y titular ácido yódico producido con una disolución de tiosulfato de sodio para para cuantificar los grupos metoxilo (referencia: <http://www.tokyo-eiken.go.jp/additives/kijun-1.html>).

En la presente invención, el polímero puede añadirse al medio en cualquier momento siempre que un L-aminoácido objetivo se acumule con precipitación. El polímero puede añadirse al medio el comienzo del cultivo, o puede añadirse a mitad del cultivo. Además, el polímero puede añadirse al medio mediante cultivo semicontinuo descrito a continuación.

El medio usado en la presente invención puede ser cualquier medio siempre que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y el polímero como nutrientes. Puede usarse cultivo discontinuo, cultivo semicontinuo y/o cultivo continuo para el método de la presente invención.

En la presente invención, el cultivo semicontinuo mencionado anteriormente se refiere a un método de cultivo en el que el medio se alimenta de manera continua o intermitente en el recipiente de cultivo, y el medio no se extrae hasta el final del cultivo. El cultivo continuo significa un método en el que el medio se alimenta de manera continua o intermitente en el recipiente de cultivo, y el medio se extrae del recipiente (habitualmente en un volumen equivalente al volumen del medio alimentado) al mismo tiempo. Medio de partida significa un medio usado en el cultivo discontinuo antes de alimentar el medio de alimentación en el cultivo semicontinuo o cultivo continuo. Medio de alimentación significa un medio que se suministra al tanque de fermentación en el cultivo semicontinuo o cultivo continuo. El medio de alimentación puede contener todos o una parte de los componentes necesarios para el crecimiento de un microorganismo. En la presente invención, el término "medio de fermentación" significa un medio contenido en un fermentador y se recoge L-aminoácido hidrófobo a partir de este medio de fermentación. Además, en la presente invención, el término "fermentador" significa un recipiente en el que se realiza la producción de L-aminoácido hidrófobo y la forma del mismo no está limitada. Puede usarse un tanque de fermentación o un fermentador de vasija. Además, el volumen del fermentador no está limitado siempre que pueda producirse y recogerse L-aminoácido hidrófobo.

Aunque el polímero puede añadirse en una etapa inicial del cultivo o añadirse a mitad del cultivo tal como se describió anteriormente, por ejemplo, cuando el método de la presente invención incluye una etapa para hacer proliferar un microorganismo que tiene la capacidad de producción de L-aminoácido (fase de proliferación) y una etapa para producir L-aminoácido (fase de producción de L-aminoácido), el polímero está contenido preferiblemente a una determinada concentración durante al menos la fase de producción de L-aminoácido.

La "fase de proliferación" referida en la presente invención significa una etapa en la que la fuente de carbono se usa principalmente para el crecimiento celular, es decir, una etapa en la que el microorganismo prolifera logarítmicamente, en 3 horas, preferiblemente en 6 horas, más preferiblemente en 10 horas, desde el inicio del cultivo. La "fase de producción de L-aminoácido" referida en la presente invención significa una etapa en la que la fuente de carbono se usa principalmente para la producción de L-aminoácido después de un periodo de 3 horas, preferiblemente 6 horas, más preferiblemente 10 horas, desde el inicio del cultivo.

Como fuente de carbono contenida en el medio usado para la presente invención, pueden usarse sacáridos tales como glucosa, glicerol, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, galactosa y melaza, y se prefieren particularmente glucosa y sacarosa. Además, también pueden usarse ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido cítrico y alcoholes tales como etanol solos o en combinación con otra fuente de carbono. Además, como materia prima de la fuente de carbono, pueden usarse melaza de caña, melaza de remolacha, melaza de alta pureza y melaza de cítricos, y también pueden usarse hidrolizados de materias primas naturales tales como celulosa, maíz, cereal y tapioca. Además, también puede usarse dióxido de carbono disuelto en el medio de cultivo como una fuente de carbono. Estas fuentes de carbono pueden usarse en el medio de partida y el medio de alimentación. El medio puede contener uno o dos o más tipos de estas fuentes de carbono. Además, la misma fuente de carbono puede usarse para el medio de

partida y el medio de alimentación, o la fuente de carbono del medio de alimentación puede ser diferente de la del medio de partida. Por ejemplo, puede usarse glucosa como fuente de carbono del medio de partida, mientras que puede usarse sacarosa como fuente de carbono del medio de alimentación.

5 Como fuente de nitrógeno contenido en el medio usado para la presente invención puede usarse amoníaco, sales de amonio tales como sulfato de amonio, carbonato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, acetato de amonio y urea, nitratos, etc. También pueden utilizarse gas amoníaco y amoníaco acuoso usados para ajustar el pH como
10 fuente de nitrógeno. Además, también pueden utilizarse peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado, hidrolizado de soja, etc. El medio puede contener una o más de estas fuentes de nitrógeno. Estas fuentes de nitrógeno también pueden usarse tanto para el medio de partida como el medio de alimentación. Además, puede usarse la misma fuente de nitrógeno tanto para el medio de partida como el medio de alimentación, o la fuente de nitrógeno del medio de alimentación puede ser diferente de la del medio de partida.

15 El medio usado para la presente invención contiene preferiblemente una fuente de ácido fosfórico además de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno. Pueden utilizarse como fuente de ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, polímeros de fosfato tales como ácido pirofosfórico, etc.

Además, el medio usado para la presente invención puede contener un factor promotor del crecimiento, tal como un nutriente con un efecto promotor del crecimiento, además de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno. Pueden
20 usarse como factor promotor del crecimiento, metales traza, aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, ácidos nucleicos así como peptona, casaminoácido, extracto de levadura, producto de la degradación de la proteína de soja etc., que contienen las sustancias anteriores. En el caso de aminoácidos aromáticos y aminoácidos de cadena ramificada, en particular, comparten sistemas de biosíntesis comunes, y por tanto un sistema de biosíntesis del microorganismo para un aminoácido distinto del aminoácido objetivo puede atenuarse tal como se describe a continuación. En tal caso, es
25 preferible añadir al medio el aminoácido del que se atenúa el sistema de biosíntesis. Por ejemplo, cuando el aminoácido objetivo es L-triptófano, es deseable añadir L-fenilalanina y/o tirosina, y cuando el aminoácido objetivo es L-fenilalanina, es deseable añadir L-triptófano y/o L-tirosina (documento WO2003/048374).

30 Los ejemplos de los metales traza incluyen hierro, manganeso, magnesio, calcio, etc. Los ejemplos de las vitaminas incluyen vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₆, ácido nicotínico, nicotinamida, vitamina B₁₂, piridoxina, etc. Estos factores promotores del crecimiento pueden presentarse en el medio de partida o el medio de alimentación.

Además, cuando se usa un mutante auxótrofo que requiere un aminoácido o similar para el crecimiento del mismo, es
35 preferible complementar el nutriente requerido al medio. En particular, puesto que la ruta de biosíntesis de la L-lisina se potencia y la capacidad de degradación de la L-lisina a menudo se atenúa en bacterias productoras de L-aminoácido útiles para la presente invención, se añaden preferiblemente una o más de L-lisina, L-homoserina, L-isoleucina y L-metionina.

40 El medio de partida y el medio de alimentación pueden tener la misma o diferentes composiciones de medio. Cuando tanto el medio de partida como el medio de alimentación comprenden el polímero, las concentraciones del polímero en ellos pueden ser iguales o diferentes. Además, cuando el medio de alimentación se alimenta en múltiples etapas, las composiciones del medio de alimentación alimentado en las diversas etapas pueden ser iguales o diferentes.

45 El cultivo se realiza preferiblemente como cultivo de aireación a una temperatura de fermentación de 20 a 45°C, de manera particularmente preferible de 30 a 42°C. La concentración de oxígeno se ajusta a del 5 al 50%, de manera deseable aproximadamente el 10%. Además, el cultivo de aireación se realiza preferiblemente con el pH ajustado a de 5 a 9. Si el pH se baja durante el cultivo se añade, por ejemplo, carbonato de calcio o un álcali tal como gas amoníaco y amoníaco acuoso para neutralizar el cultivo. Cuando el aminoácido objetivo es un aminoácido ácido, por
50 ejemplo, ácido L-glutámico, es deseable realizar el cultivo a un pH de 3 a 9, preferiblemente un pH de 3 a 5. Cuando se realiza el cultivo en tales condiciones preferiblemente durante aproximadamente de 10 a 120 horas, una cantidad notable de L-aminoácido se acumula en el medio de cultivo. Aunque la concentración de L-aminoácido que se acumula no está limitada siempre que sea mayor que la observada con cepas de tipo natural y el L-aminoácido puede aislarse y recogerse del medio, puede ser de 50 g/l o mayor, de manera deseable de 75 g/l o mayor, de manera más deseable de 100 g/l o mayor. Aunque el L-aminoácido puede disolverse o depositarse en el medio, se prefiere que al menos
55 una parte del mismo se deposite en el medio.

El L-aminoácido puede recogerse mediante un método de recogida conocido del medio de cultivo después del cultivo. Por ejemplo, el L-aminoácido precipitado en el medio puede recogerse mediante centrifugación o filtración. Además, cuando el L-aminoácido se deposita en el medio, el L-aminoácido que se disuelve en el medio puede cristalizarse, y
60 después depositarse L-aminoácido y los cristales pueden aislarse juntos.

En la presente invención, el cultivo del microorganismo puede realizarse como cultivo de siembra y cultivo principal con el fin de garantizar la acumulación del L-aminoácido mayor que un determinado nivel. El cultivo de siembra puede realizarse como cultivo con agitación usando un matraz o similar, o cultivo discontinuo, y el cultivo principal puede
65 realizarse como cultivo semicontinuo o cultivo continuo. Alternativamente, tanto el cultivo de siembra como el cultivo principal pueden realizarse como cultivo discontinuo.

En estos métodos de cultivo, cuando la concentración de L-aminoácido alcanza un intervalo deseado, puede extraerse una parte del L-aminoácido y puede añadirse de nuevo un medio para repetir el cultivo. Se prefieren como medio que va a añadirse de nuevo, un medio que contiene una fuente de carbono y un nutriente que tiene un efecto promotor del crecimiento (factor promotor del crecimiento). Se prefieren como fuente de carbono, glucosa, sacarosa, fructosa y glicerol. Se prefieren como factor promotor del crecimiento, fuentes de nitrógeno, ácido fosfórico, aminoácidos, etc. Pueden usarse como fuente de nitrógeno, amoníaco, sales de amonio tales como sulfato de amonio, carbonato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, acetato de amonio y urea, nitratos, etc. Además, pueden usarse como fuente de ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio e hidrogenofosfato de dipotasio. Como para los aminoácidos, cuando se usa una cepa mutante auxótrofa, es preferible complementar el nutriente requerido.

Cuando se realiza cultivo semicontinuo o cultivo continuo en la presente invención, el medio de alimentación puede alimentarse de manera intermitente de modo que el suministro de fuente de nutrición o sacáridos se detiene temporalmente. El suministro del medio de alimentación se detiene preferiblemente durante, como máximo, el 30% o menos, de manera deseable el 20% o menos, particularmente de manera deseable el 10% o menos, del tiempo de alimentación. Cuando el medio de alimentación se alimenta de manera intermitente, el medio de alimentación puede añadirse inicialmente a lo largo de un tiempo predeterminado, y las adiciones segunda y siguientes pueden controlarse de modo que se inician cuando se detecta un aumento del pH o concentración de oxígeno disuelto mediante un ordenador tras el agotamiento de la fuente de carbono en el medio de fermentación durante un periodo de parada de adición antes de un determinado periodo de adición de medio y, por tanto, la concentración de sustrato en el tanque de cultivo se mantiene siempre automáticamente a un nivel bajo (patente estadounidense n.º 5.912.113).

Se prefieren como fuente de carbono, glucosa, sacarosa y fructosa. Se prefieren como factor promotor del crecimiento, fuentes de nitrógeno, ácido fosfórico, aminoácidos, etc. Pueden usarse como fuente de nitrógeno, amoníaco, sales de amonio tales como sulfato de amonio, carbonato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, acetato de amonio y urea, nitratos, etc. Además, pueden usarse como fuente de ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio e hidrogenofosfato de dipotasio. En cuanto a los aminoácidos, cuando se usa una cepa mutante auxotrófa, es preferible complementar el nutriente requerido. Además, el medio de alimentación puede consistir en un tipo de medio o una mezcla de dos o más tipos de medios. Cuando se usan dos o más tipos de medios de alimentación, los medios pueden mezclarse y alimentarse usando una lata de alimentación o los medios pueden alimentarse de manera independiente usando dos o más latas de alimentación.

Cuando se realiza cultivo semicontinuo, el medio de alimentación se alimenta preferiblemente en tal cantidad que la cantidad de sacáridos como la cantidad de fuente de carbono en el medio de alimentación o todo el medio de fermentación no supera los 30 g/l, y se controla preferiblemente para que sea de 20 g/l o menos, más preferiblemente de 10 g/l o menos. En particular, la concentración de sacáridos se controla preferiblemente para que esté en el intervalo de concentración mencionado anteriormente especialmente después del final de la proliferación logarítmica del microorganismo. La tasa de alimentación de la fuente de carbono puede controlarse usando el método descrito en la patente estadounidense n.º 5.912.113. Además, los sacáridos y el ácido fosfórico se alimentan preferiblemente a tales concentraciones que los sacáridos y el ácido fosfórico sirven como factores limitativos del crecimiento de células bacterianas. El ácido fosfórico está contenido en el medio de alimentación en una cantidad de 2 o menos, preferiblemente de 1,5 o menos, más preferiblemente 1 o menos, en cuanto a la razón fósforo/carbono (P/C) (remítase a la patente estadounidense n.º 5.763.230).

Cuando el método de cultivo continuo se usa para la presente invención, el medio puede extraerse y alimentarse simultáneamente o puede extraerse una parte del medio, y después puede alimentarse el medio. Además, el método también puede ser un método de cultivo continuo que incluye células de reciclaje en las que se extrae el medio de cultivo que contiene L-aminoácido y células bacterianas, y sólo las células se devuelven al fermentador (patente francesa n.º 2669935). Como método para alimentar de manera continua o intermitente una fuente de nutrientes, se usa el mismo método tal como se usa en el cultivo semicontinuo.

Cuando el medio de cultivo se extrae de manera intermitente, se prefiere que una parte del L-aminoácido se extraiga cuando la concentración de L-aminoácido alcanza un nivel predeterminado y se alimenta un medio nuevo para continuar el cultivo. Además, en cuanto al volumen del medio que va a añadirse, el cultivo se realiza preferiblemente de modo que el volumen final del medio después de la adición del medio es igual al volumen del medio de cultivo antes de la extracción. El término "igual" usado en el presente documento significa que el volumen después de la adición del medio corresponde a aproximadamente del 93 al 107% del volumen del medio antes de la extracción.

Cuando se extrae de manera continua el medio de cultivo, la extracción se comienza preferiblemente al mismo tiempo que o después de la alimentación del medio nutritivo. Por ejemplo, en el plazo de 5 horas, de manera deseable 3 horas, de manera más deseable 1 hora, después del comienzo de la alimentación, se comienza la extracción. Además, el volumen de extracción del medio de cultivo es preferiblemente igual al volumen del medio alimentado.

El método de cultivo continuo que recicla células bacterianas es un método de extracción de manera intermitente o continua del medio de fermentación cuando la concentración de aminoácidos alcanza un nivel predeterminado, extrayendo sólo L-aminoácido y haciendo recircular residuos de filtración que contienen células bacterianas al interior

del fermentador, y puede realizarse en referencia a, por ejemplo, la patente francesa n.º 2669935.

La fenilalanina producida por el método de la presente invención puede usarse para, por ejemplo, producir un éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina (también denominado "aspartamo"). Es decir, el método de la presente invención incluye un método para producir un éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina usando L-fenilalanina como materia prima. El método comprende sintetizar un éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina a partir de L-fenilalanina producida mediante el método mencionado anteriormente de la presente invención y ácido aspártico o su derivado. Los ejemplos del éster alquílico inferior incluyen éster metílico, éster etílico, éster propílico, etc.

En el método de la presente invención, el método para sintetizar un éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina a partir de L-fenilalanina y ácido aspártico o su derivado no está limitado particularmente, y puede aplicarse cualquier método convencional siempre que la L-fenilalanina o su derivado puedan usarse para la síntesis de un éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina. Por ejemplo, puede producirse un éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina mediante el siguiente método (patente estadounidense n.º 3.786.039). La L-fenilalanina se esterifica para obtener un éster alquílico inferior de L-fenilalanina. El éster alquílico de L-fenilalanina se hace reaccionar con un derivado de L-ácido aspártico cuyo grupo β -carboxilo está protegido y cuyo grupo α -carboxilo grupo está esterificado para la activación. Los ejemplos de un derivado de este tipo incluyen anhídrido N-acil-L-aspártico tal como anhídrido N-formil-, N-carbobenzoxi- o N-p-metoxicarbobenzoxi-L-aspártico. Mediante esta reacción de condensación, se obtiene una mezcla de N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina y N-acil- β -L-aspartil-L-fenilalanina. Si la reacción de condensación se realiza en presencia de un ácido orgánico cuya constante de disociación a 37°C es de 10^{-4} o menor, la razón del isómero α con respecto al isómero β en la mezcla se aumenta (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 51-113841). Después se separa la N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina de la mezcla, seguido de hidrogenación para obtener α -L-aspartil-L-fenilalanina.

El microorganismo usado para la presente invención es un microorganismo que tiene la capacidad de producción de L-aminoácido y puede provocar la acumulación del L-aminoácido con precipitación del L-aminoácido en un medio líquido cuando se cultiva en el medio.

Las solubilidades de los aminoácidos a 20°C son tal como se muestra en la tabla 1 y se prefieren cepas que pueden acumular un aminoácido en una cantidad de 10,6 g/l o más en el caso de fermentación de L-triptófano, 27,4 g/l o más en el caso de fermentación de L-fenilalanina, 0,38 g/l en el caso de fermentación de L-tirosina, 41,2 g/l o más en el caso de fermentación de L-isoleucina, 23,8 g/l o más en el caso de fermentación de L-leucina, 57,5 g/l o más en el caso de fermentación de L-valina, 7,2 g/l en el caso de fermentación de ácido L-glutámico, o 90,0 g/l o más en el caso de fermentación de L-treonina.

Tabla 1

L-aminoácido	Solubilidad (20°C) (g/l)	Solubilidad (40°C) (g/l)
L-triptófano	10,6	14
L-fenilalanina	27,4	38
L-tirosina	0,38	0,75
L-isoleucina	41,2	44
L-leucina	23,8	26
L-valina	57,5	65
Ácido L-glutámico	7,2	15
L-treonina	90,0	122

Cuando se reduce el pH de una disolución acuosa que contiene ácido L-glutámico, la solubilidad del ácido L-glutámico disminuye notablemente alrededor de pKa (4,25) del grupo γ -carboxilo y pasa a ser el menor en el punto isoelectrico (pH 3,2). Aunque también depende de la composición del medio, el ácido L-glutámico habitualmente se disuelve en una cantidad de 10 a 20 g/l a pH de 3,2, de 30 a 40 g/l a pH de 4,0, y de 50 a 60 g/l a pH de 4,7, a aproximadamente 30°C.

Como microorganismo de la presente invención o cepa madre para generarlo, pueden usarse microorganismos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyos ejemplos típicos son bacterias de *Escherichia* y bacterias de *Pantoea*, bacterias corineformes, etc. Además, también pueden usarse bacterias que utilizan metanol tales como bacterias de *Methylophilus* y bacterias de *Methylobacillus*, que pueden producir L-aminoácido a partir de metanol. Los ejemplos adicionales de microorganismos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* incluyen enterobacterias que pertenecen a γ -proteobacterias tales como las que pertenecen al género *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Morganella* o similares, y los ejemplos de otros microorganismos incluyen bacterias de *Alicyclobacillus*, bacterias de *Bacillus*, levaduras que pertenecen al género *Saccharomyces*, *Candida* o similares, etc.

Pueden utilizarse como bacterias de *Escherichia*, las mencionadas en el trabajo de Neidhardt *et al.* (Neidhardt, F.C. *et al.*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, tabla 1),

tales como *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de tipo natural de *Escherichia coli* incluyen, por ejemplo, la cepa K12 y derivados de la misma, cepa de *Escherichia coli* MG1655 (n.º de ATCC 47076), cepa W3110 (n.º de ATCC 27325), etc. Están disponibles a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, dirección: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos de América).

Además, los ejemplos de bacterias de *Enterobacter* incluyen *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, etc., y los ejemplos de bacterias de *Pantoea* incluyen *Pantoea ananatis*. Algunas especies de *Enterobacter agglomerans* se han reclasificado recientemente a *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* o similares, basándose en el análisis de secuencia de nucleótidos de ARNr 16S, etc. En la presente invención, pueden usarse tanto bacterias de *Enterobacter* como de *Pantoea* siempre que se elija una bacteria de este tipo clasificada en la familia *Enterobacteriaceae*. Cuando una cepa de *Pantoea ananatis* se genera mediante una técnica de ingeniería genética, pueden usarse la cepa de *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614), cepa AJ13356 (FERM BP-6615), cepa AJ13601 (FERM BP-7207) y derivados de las mismas. Estas cepas se identificaron como *Enterobacter agglomerans* cuando se aislaron y depositaron como *Enterobacter agglomerans*. Sin embargo, se reclasificaron recientemente como *Pantoea ananatis* basándose en la secuenciación de nucleótidos de ARNr 16S, etc., tal como se describió anteriormente.

Los ejemplos específicos de bacterias de *Methylophilus* incluyen *Methylophilus methylotrophus* y los ejemplos típicos de *Methylophilus methylotrophus* incluyen la cepa AS1 (NCIMB 10515), etc. La cepa de *Methylophilus methylotrophus* AS1 está disponible a partir de las Colecciones nacionales de bacterias industriales y marinas (dirección: NCIMB Ltd., Torry Research Station, 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 BDG, Reino Unido).

Los ejemplos específicos de bacterias de *Methylobacillus* incluyen *Methylobacillus glycogenes*, *Methylobacillus flagellatum*, etc. Los ejemplos de *Methylobacillus glycogenes* incluyen la cepa T-11 (NCIMB 11375), cepa ATCC 21276, cepa ATCC 21371, cepa ATR80 (descrita en Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, págs. 67-72, 1994), cepa A513 (descrita en Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, págs. 67-72 (1994)), etc. La cepa de *Methylobacillus glycogenes* NCIMB 11375 puede obtenerse a partir de las Colecciones nacionales de bacterias industriales y marinas (dirección: NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Reino Unido). Los ejemplos de *Methylobacillus flagellatum* incluyen la cepa KT (descrita en Arch. Microbiol., vol. 149, págs. 441-446, 1988), etc.

Las bacterias corineformes son un grupo de microorganismos definidos en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8ª ed., pág. 599 (1974)), y pueden usarse microorganismos clasificados en tales bacilos aerobios, Gram-positivos y no ácidos rápidos que no tienen la capacidad de esporular. Las bacterias corineformes incluyen bacterias que hasta ahora se han clasificado en el género *Brevibacterium*, pero se han unido en el género *Corynebacterium* en el presente (Int. J. Syst. Bacteriol. 41:255-260 (1991)) y bacterias pertenecientes al género *Brevibacterium* o *Microbacterium* estrechamente relacionado con el género *Corynebacterium*.

Los ejemplos específicos de tales bacterias corineformes incluyen los siguientes:

Corynebacterium acetoacidophilum
Corynebacterium acetoglutamicum
Corynebacterium alkanolyticum
Corynebacterium callunae
Corynebacterium glutamicum
Corynebacterium lilium
Corynebacterium melassecola
Corynebacterium thermoaminogenes (*Corynebacterium efficiens*)
Corynebacterium herculis
Brevibacterium divaricatum
Brevibacterium flavum
Brevibacterium immariophilum
Brevibacterium lactofermentum
Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

Brevibacterium thiogenitalis

5

Corynebacterium ammoniagenes

Brevibacterium album

10

Brevibacterium cerinum

Microbacterium ammoniaphilum

Los ejemplos específicos de las bacterias incluyen las siguientes cepas:

15

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

20

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060

25

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

30

Corynebacterium efficiens AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020

35

Brevibacterium flavum ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

40

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869)

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

45

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6871, ATCC 6872

50

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

55

Estas cepas están disponibles, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (dirección: P.O. Box 1549, Manassas, VA 2010812301 Estados Unidos de América). Es decir, cada cepa recibe un número de registro único que figura en el catálogo de la ATCC (<http://www.atcc.org/>). Las cepas pueden pedirse usando este número de registro. La cepa AJ12340 se depositó el 27 de octubre de 1987 en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana de la Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (actualmente agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Depositario Internacional de Organismos de Patentes, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japón), con un número de depósito de FERM BP-1539 basándose en el Tratado de Budapest. La cepa AJ12418 se depositó el 5 de enero de 1989 en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana de la Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, con un número de depósito de FERM BP-2205 basándose en el Tratado de Budapest.

60

65

A continuación en el presente documento, se describen métodos para impartir una capacidad de producción de L-aminoácido a las bacterias mencionadas anteriormente.

Para impartir la capacidad de producir un L-aminoácido, pueden usarse métodos empleados convencionalmente en la generación de bacterias corineformes o bacterias del género *Escherichia* (véase "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), primera edición, publicada el 30 de mayo de 1986, págs. 77-100). Tales métodos incluyen la adquisición de un mutante auxótrofo, una cepa resistente a análogos o un mutante de regulación metabólica, la construcción de una cepa recombinante para que sobreexpresa una enzima de biosíntesis de L-aminoácidos, etc. En este caso, en la generación de una bacteria productora de L-aminoácidos, puede impartirse una o más de las propiedades descritas anteriormente, tales como auxotrofia, resistencia análoga y mutación de regulación del metabolismo. Puede potenciarse la expresión de una o dos o más enzimas de biosíntesis de L-aminoácidos. Además, los métodos para impartir propiedades tales como auxotrofia, resistencia a análogos o mutación de regulación metabólica pueden combinarse con el potenciamiento de las enzimas de biosíntesis.

Puede obtenerse una cepa mutante auxótrofa, una cepa resistente a análogos de L-aminoácido o una cepa mutante de regulación metabólica con la capacidad de producir un L-aminoácido sometiendo una cepa parental o una cepa de tipo natural a una mutagénesis convencional, tal como exposición a rayos X o irradiación UV, o tratamiento con un mutágeno tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etc., y luego seleccionando aquellos que presentan una autotrofia, resistencia a análogos o mutación de regulación metabólica y que también tienen la capacidad de producir un L-aminoácido.

Los métodos para impartir capacidad de producción de aminoácidos y bacterias productoras de aminoácidos se ejemplificarán específicamente a continuación.

L-triptófano, L-fenilalanina y L-tirosina son todos aminoácidos aromáticos y comparten la ruta de biosíntesis común. Los ejemplos de los genes que codifican para enzimas de biosíntesis para estos aminoácidos aromáticos incluyen la desoxiarabino-heptuloso-3-fosfato sintasa (*aroG*), corismato mutasa-prefenato deshidratasa (*pheA*), 3-deshidroquinato sintasa (*aroB*), ácido shikímico deshidrogenasa (*aroE*), shikimato cinasa (*aroL*), 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (*aroA*) y corismato sintasa (*aroC*) (documento EP763127). Se sabe que estos genes están controlados por el represor de tirosina (*tyrR*), por lo que la actividad de una enzima de biosíntesis de aminoácidos aromáticos también puede aumentarse delecionando el gen *tyrR* (véase el documento EP763127). Las abreviaturas entre paréntesis después de los nombres de las enzimas representan los nombres de los genes (lo mismo se aplicará en las mismas ocasiones a continuación).

Con el fin de potenciar la productividad de aminoácidos aromáticos de una bacteria, puede atenuarse la biosíntesis de un aminoácido distinto del aminoácido aromático objetivo. Por ejemplo, cuando el aminoácido objetivo es L-triptófano, las rutas de biosíntesis de L-fenilalanina y/o L-tirosina pueden atenuarse (documento USP 4.371.614).

Además, la 3-desoxi-D-arabinoheptuloso-7-fosfato sintetasa (*aroF*, *aroD*) se somete a la inhibición de retroalimentación por aminoácidos aromáticos. Por tanto, la enzima puede modificarse para que no se someta a la inhibición de retroalimentación. Puede obtenerse una bacteria aromática productora de L-aminoácidos, por ejemplo, introduciendo un gen mutante *aroF* o *aroD* en el que el ácido L-aspártico en la posición 147 o la L-serina en la posición 181 se reemplaza por otro aminoácido en el caso de *aroF*, y ácido L-aspártico en la posición 146, L-metionina en la posición 147, L-prolina en la posición 150 o L-alanina en la posición 202, o ambas L-metionina en la posición 157 y L-alanina en la posición 219 por otro(s) aminoácido(s) en el caso de *aroG* (documento EP0488424). Además, la corismato mutasa-prefenato deshidratasa también se somete a la inhibición de retroalimentación por un aminoácido aromático, y por tanto pueden modificarse para no someterse a la inhibición de retroalimentación.

Los ejemplos de genes implicados en la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada incluyen el operón *ilvGMEDA*, y este operón se somete a control de expresión (atenuación) por L-valina y/o L-isoleucina y/o L-leucina. Por tanto, la productividad de un microorganismo para estos L-aminoácidos puede mejorarse mediante la introducción del operón *ilvGMEDA* cuya región requerida para la atenuación se elimina en el microorganismo.

Los aminoácidos aromáticos y los aminoácidos de cadena ramificada comparten sistemas de biosíntesis comunes, respectivamente y, por tanto, es preferible usar una cepa en la que se atenúe un sistema de biosíntesis característico de un aminoácido aromático o un aminoácido de cadena ramificada que no sea el L-aminoácido objetivo. Por ejemplo, una cepa que puede producir de manera eficiente un L-aminoácido objetivo puede obtenerse atenuando los sistemas de biosíntesis característicos de L-fenilalanina y L-tirosina cuando el aminoácido objetivo es L-triptófano, atenuando los sistemas de biosíntesis característicos de L-triptófano y L-tirosina cuando el aminoácido objetivo es L-fenilalanina, atenuando los sistemas de biosíntesis característicos de L-leucina y L-isoleucina cuando el aminoácido objetivo es L-valina, atenuando los sistemas de biosíntesis característicos de L-valina y L-leucina cuando el objetivo el aminoácido es L-isoleucina, o sistemas de biosíntesis atenuantes característicos de L-valina y L-isoleucina cuando el aminoácido objetivo es L-leucina. La atenuación de un sistema de biosíntesis puede lograrse mediante la introducción de una mutación en un gen que codifica para una enzima del sistema de biosíntesis o la obtención de una cepa que requiere un L-aminoácido sintetizado por un sistema de biosíntesis deseado que va a atenuarse usando un medio de síntesis que contiene ese L-aminoácido.

A continuación se ejemplifican métodos para impartir la capacidad de producción de L-aminoácido y microorganismos a los que se imparte la capacidad de producción de L-aminoácido que pueden usarse para la presente invención.

5 Bacterias productoras de L-triptófano

Los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas parentales para derivarlas incluyen, pero no se limitan a, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) y JP6015/pMU91 (DSM10123) deficientes en triptofenil-ARNt sintetasa codificada por el mutante *trpS* (patente estadounidense n.º 5.756.345), *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) y AGX6 (pGX50) *aroP* (NRRL B-12264) deficientes en la enzima triptofanasa (patente estadounidense n.º 4.371.614), *E. coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps en la que se potencia la capacidad de producción de fosfoenolpiruvato (documento WO9708333, patente estadounidense n.º 6.319.696), y similares. También pueden usarse bacterias productoras de L-triptófano pertenecientes al género *Escherichia* que tienen una actividad potenciada de la proteína codificada por el gen *yedA* o *yddG* (solicitudes de patentes estadounidenses 2003/0148473 A1 y 2003/0157667 A1).

Los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas parentales para derivarlas también incluyen cepas en las que se potencian una o más actividades de las siguientes enzimas: antranilato sintasa (*trpE*), fosfoglicerato deshidrogenasa (*serA*) y triptófano sintasa (*trpAB*). La antranilato sintasa y la fosfoglicerato deshidrogenasa se someten a inhibición de retroalimentación por L-triptófano y L-serina, por tanto, puede introducirse una mutación que desensibiliza la inhibición de retroalimentación en estas enzimas. Los ejemplos específicos de cepas que tienen tal mutación incluyen *E. coli* SV164 que alberga la antranilato sintasa desensibilizada y una cepa transformante SV164 (pGH5) obtenida mediante la introducción en *E. coli* SV164 el plásmido pGH5, que contiene un gen mutante *serA* que codifica para la fosfoglicerato deshidrogenasa desensibilizada por inhibición de retroalimentación.

La cepa de *E. coli* SV164 (*trpE8*) mencionada anteriormente es una cepa obtenida mediante la introducción de un gen mutante *trpE* que codifica para la antranilato sintasa cuya inhibición de retroalimentación se desensibiliza en una cepa deficiente en *trpE*, *Escherichia coli* KB862 (DSM7196) (documento WO94/08031, patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 7-507693). La cepa de *E. coli* SV164 (pGH5) es una cepa obtenida mediante la introducción de un plásmido pGH5 (documento WO94/08031) que contiene un gen mutante *serA5* que codifica para la fosfoglicerato deshidrogenasa desensibilizada a la inhibición de retroalimentación por serina en la cepa SV164. La cepa SV164 (pGH5) produce no solo L-triptófano sino también L-serina (patente estadounidense n.º 7.045.320).

La cepa de *E. coli* KB862 mencionada anteriormente se designó AJ13828 y se depositó el 21 de diciembre de 2000 en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana de la Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (actualmente agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Depositario Internacional de Organismos de Patentes, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) como un depósito internacional basándose en el Tratado de Budapest con un número de depósito de FERM BP-7405.

Los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas parentales para derivarlas también incluyen una cepa que tiene una actividad potenciada de 3-fosfoserina fosfatasa (*serB*) (patente estadounidense n.º 4.371.614), una cepa que tiene una actividad potenciada de fosfoenolpiruvato carboxicinasa (*pckA*) (documento WO2004/090125) y una cepa que expresa de manera constitutiva el operón maleato sintasa-isocitrato liasa-isocitrato deshidrogenasa-cinasa/fosfatasa (operón *ace*) o cuya expresión de este operón se potencia (documento WO2005/103275).

Los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas parentales para derivarlas también incluyen cepas que se han transformado con el operón de triptófano que contiene un gen que codifica para antranilato sintasa desensibilizada por inhibición (patentes japonesas abiertas a consulta por el público n.ºs 57-71397, 62-244382, patente estadounidense n.º 4.371.614). Además, la capacidad de producción de L-triptófano puede impartirse potenciando la expresión de un gen que codifica para triptófano sintasa en el operón de triptófano (*trpBA*). La triptófano sintasa consiste en subunidades α y β codificadas por los genes *trpA* y *trpB*, respectivamente. Además, la capacidad de producción de L-triptófano puede mejorarse potenciando la expresión del operón isocitrato liasa-malato sintasa (documento WO2005/103275).

Como bacterias corineformes, pueden usarse *Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478, patente japonesa n.º 01681002), que es una cepa resistente a la sulfaguanidina, la bacteria corineforme introducida con el operón triptófano (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 63-240794), y la bacteria corineforme introducida con un gen que codifica para la shikimato cinasa derivada de una bacteria corineforme (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 01-994749).

Bacterias productoras de L-fenilalanina

Los ejemplos de bacterias productoras de L-fenilalanina y cepas parentales para derivarlas incluyen, pero no se limitan a, cepas que pertenecen al género *Escherichia* tales como *E. coli* AJ12479 (FERM BP-4796) (documento EP1484410A, véase la realización 2), *E. coli* AJ12739 (*tyrA::Tn10*, *tyrR*) (VKPM B-8197), *E. coli* HW1089 (ATCC

55371) que alberga un gen mutante *pheA34* (patente estadounidense n.º 5.354.672), *E. coli* MWEIC101-b (KR8903681), *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 y NRRL B-12147 (patente estadounidense n.º 4.407.952). Además, como cepa parental, pueden usarse *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAB (FERM BP-3566), *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662) y *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] denominado AJ12604 (FERM BP-3579) (documento EP 488424 B1). Además, también pueden usarse las bacterias productoras de L-fenilalanina que pertenecen al género *Escherichia* con una actividad potenciada de la proteína codificada por el gen *yedA* o el gen *yddG* (solicitudes de patentes estadounidenses 2003/0148473 A1 y 2003/0157667 A1).

Como bacterias corineformes productoras de fenilalanina, puede usarse *Cornebacterium glutamicum* BPS-13 (FERM BP-1777), K77 (FERM BP-2062) y K78 (FERM BP-2063) (patente europea abierta a consulta por el público n.º 331145, patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 02-303495), cuya actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa o piruvato cinasa se reduce, cepa de tirosina-auxótrofa (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 05-049489), etc.

En cuanto a las bacterias productoras de fenilalanina, mediante tal modificación que las bacterias incorporan subproductos en las células, por ejemplo, aumentando la cantidad de expresión del gen de absorción de L-triptófano, *tnaB* o *mtr*, o el gen de absorción de L-tirosina, *tyrP*, también pueden obtenerse cepas que producen de manera eficiente L-fenilalanina (documento EP1484410).

Bacterias productoras de L-tirosina

Los ejemplos de bacterias productoras de tirosina incluyen bacterias de *Escherichia* con un gen prefenato deshidratasa desensibilizado (*tyrA*). El producto de expresión de este gen se desensibiliza a la inhibición por tirosina (solicitud de patente europea abierta a consulta por el público n.º 1616940).

Bacterias productoras de L-valina

Los ejemplos de bacterias productoras de L-valina y cepas parentales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-valina incluyen, pero no se limitan a, cepas que se han modificado para sobreexpresar el operón *ilvGMEDA* (patente estadounidense n.º 5.998.178). La región en el operón *ilvGMEDA* que se requiere para la atenuación puede eliminarse de modo que la expresión del operón no se atenúa por la L-valina que se produce. Además, se prefiere que el gen *ilvA* en el operón se interrumpa para que disminuya la actividad de treonina desaminasa.

Los ejemplos de bacterias productoras de L-valina que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-valina también incluyen cepas mutantes con amino-acil t-ARN sintetasa que tiene una mutación (patente estadounidense n.º 5.658.766). Por ejemplo, puede usarse *E. coli* VL1970, que tiene una mutación en el gen *ileS* gen que codifica para isoleucina ARNt sintetasa. Se depositó *E. coli* VL1970 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscú 117545, Rusia) el 24 de junio de 1988 con un número de registro VKPM B-4411.

Además, también pueden usarse mutantes que requieren ácido lipoico para el crecimiento y/o que carecen de H⁺-ATPasa como cepas parentales (documento WO96/06926).

Los ejemplos de bacterias productoras de L-valina de bacterias corineformes incluyen, por ejemplo, cepas modificadas de modo que se potencia la expresión de un gen que codifica para una enzima biosintética de L-valina. Los ejemplos de la enzima de biosíntesis de L-valina incluyen enzimas codificadas por genes presentes en el operón *ilvBNC*, es decir, acetohidroxiácido sintetasa codificada por *ilvBN* e isómero-reductasa codificada por *ilvC* (documento WO00/50624). Dado que el operón *ilvBNC* se somete a regulación de la transcripción por L-valina y/o L-isoleucina y/o L-leucina, es deseable eliminar la atenuación para evitar la supresión transcripcional por L-valina que va a producirse.

La impartición de la capacidad de producción de L-valina a bacterias corineformes puede realizarse disminuyendo o eliminando la actividad de al menos un tipo de enzima que está implicada en una ruta metabólica que disminuye la producción de L-valina. Por ejemplo, se contempla la reducción de la actividad de la treonina deshidratasa implicada en la síntesis de L-leucina, o la actividad de una enzima que participa en la síntesis de D-pantotenato (documento WO00/50624).

La capacidad de producción de L-valina también puede impartirse impartiendo resistencia a análogos de aminoácidos o similares.

Los ejemplos incluyen, por ejemplo, cepas mutantes que son auxótrofas para L-isoleucina y L-metionina, y resistentes a D-ribosa, ribonucleósido de purina o ribonucleósido de pirimidina (FERM P-1841, PERM P-29, publicación de patente japonesa n.º 53-025034), cepas mutantes resistentes a policétidos (FERM P-1763, FERM P-1764, publicación de patente japonesa n.º 06-065314) y cepas mutantes resistentes a L-valina en un medio que contiene ácido acético como única fuente de carbono y sensibles a análogos del ácido pirúvico tales como ácido fluoropirúvico en un medio

que contiene glucosa como única fuente de carbono (FERM BP-3006, BP-3007, patente japonesa n.º 3006929).

Bacterias productoras de L-isoleucina

5 Los ejemplos de bacterias productoras de L-isoleucina y cepas parentales que pueden usarse para derivar bacterias productoras de L-isoleucina incluyen, pero no se limitan a, mutantes que tienen resistencia a 6-dimetilaminopurina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 5-304969), mutantes que tienen resistencia a un análogo de isoleucina tal como tiaisoleucina e hidroxamato de isoleucina, y mutantes que tienen resistencia adicional a DL-etionina y/o hidroxamato de arginina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 5-130882). Además, las cepas recombinantes transformadas con genes que codifican para proteínas implicadas en la biosíntesis de L-isoleucina, tales como treonina desaminasa y la acetohidroxiácido sintasa, también pueden usarse como cepas parentales (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2-458, documento FR 0356739 y patente estadounidense n.º 5.998.178).

15 Los ejemplos de cepas productoras de L-isoleucina de bacterias corineforme incluyen la bacteria corineforme de la cual el gen *bmE* que codifica para una proteína de secreción de aminoácidos de cadena ramificada se amplifica (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2001-169788), la bacteria corineforme impartida con capacidad de producción de L-isoleucina por fusión de protoplastos con una bacteria productora de L-lisina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-74293), la bacteria corineforme de la que se potencia la homoserina deshidrogenasa (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-91193), la cepa resistente a hidroxamato de treonina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 62-195293), cepa resistente al ácido α -cetomalónico (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 61-15695), y la cepa resistente a metil lisina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 61-15696).

25 Bacterias productoras de L-leucina

Los ejemplos de bacterias productoras de L-leucina y cepas parentales para derivar bacterias productoras de L-leucina incluyen, pero no se limitan a, bacterias de *Escherichia*, tales como cepas de *E. coli* resistentes a leucina (por ejemplo, la cepa 57 (VKPM B-7386, patente estadounidense n.º 6.124.121)) o análogos de leucina que incluyen β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina y 5,5,5-trifluoroleucina (publicación de patente japonesa n.º 62-34397 y patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 8-70879); cepas de *E. coli* obtenidas por el método de ingeniería genética descrito en el documento WO96/06926; y *E. coli* H-9068 (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 8-70879).

35 La bacteria de la presente invención también puede mejorarse potenciando la expresión de uno o más genes implicados en la biosíntesis de L-leucina. Los ejemplos de tales genes incluyen genes del operón *leuABCD*, que están representados preferiblemente por un gen mutante *leuA* que codifica para la isopropilmalato sintasa desensibilizada a partir de la inhibición de retroalimentación por L-leucina (patente estadounidense n.º 6.403.342). Además, la bacteria de la presente invención puede mejorarse potenciando la expresión de uno o más genes que codifican para proteínas que excretan L-aminoácido de la célula bacteriana. Los ejemplos de tales genes incluyen los genes *b2682* y *b2683* (genes *ygaZH*) (documento EP 1239041 A2).

Los ejemplos de la cepa productora de L-leucina de bacterias corineformes incluyen la cepa resistente a 2-tiazolealanina y β -hidroxileucina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 8-266295), la cepa resistente a análogos de valina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 63-248392), la cepa auxótrofa de valina (publicación de patente japonesa n.º 38-4395), la cepa resistente a S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC) (publicación de patente japonesa n.º 51-37347), y la cepa auxótrofa de fenilalanina, valina e isoleucina (publicación de patente japonesa n.º 54-36233).

50 Bacterias productoras de ácido L-glutámico

Los ejemplos preferidos de bacterias productoras de ácido L-glutámico incluyen cepas en las que se potencia la expresión de uno o más genes que codifican para una enzima biosintética del ácido L-glutámico. Los ejemplos de tales genes incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican para glutamato deshidrogenasa (*gdhA*), glutamina sintetasa (*glnA*), glutamato sintetasa (*gltAB*), isocitrato deshidrogenasa (*icdA*), aconitato hidratasa (*acnA*, *acnB*), citrato sintasa (*gltA*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), piruvato deshidrogenasa (*aceEF*, *lpdA*), piruvato cinasa (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintasa (*ppsA*), enolasa (*eno*), fosfogliceromutasa (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato cinasa (*pgk*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapA*), triosa fosfato isomerasa (*tpiA*), fructosa bisfosfato aldolasa (*fbp*), fosfofructocinasa (*pfkA*, *pfkB*), glucosa fosfato isomerasa (*pgi*), etc.

Los ejemplos de cepas que se han modificado para que la expresión del gen de la citrato sintetasa, el gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, el gen de la isocitrato deshidrogenasa, el gen de la piruvato deshidrogenasa y/o el gen de la glutamato deshidrogenasa se potencien incluyen los divulgados en los documentos en EP 1078989 A, EP 955368 A y EP 952221 A.

La modificación para impartir la capacidad de producción de ácido L-glutámico puede lograrse reduciendo o eliminando

la actividad de una enzima que cataliza una reacción que se ramifica desde la ruta de biosíntesis del ácido L-glutámico y produce un compuesto distinto del ácido L-glutámico. Los ejemplos de tal enzima que cataliza una reacción que se ramifica desde la ruta de biosíntesis del ácido L-glutámico y que produce un compuesto distinto del ácido L-glutámico incluyen isocitrato liasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, acetohidroxiácido sintasa, acetolactato sintasa, formiato acetiltransferasa, lactato deshidrogenasa, glutamato descarboxilasa, 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa, etc.

Por ejemplo, con el fin de reducir la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa, la modificación puede realizarse usando el gen *sucA* (*odhA*) que codifica para la subunidad E1o de la enzima. Los ejemplos de cepa de la cual se reduce la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa incluyen, por ejemplo, las siguientes cepas.

Cepa de *Brevibacterium lactofermentum* Δ S (documento WO95/34672)

Brevibacterium lactofermentum AJ12821 (FERM BP-4172; FR9401748)

Brevibacterium flavum AJ12822 (FERM BP-4173; FR9401748)

Corynebacterium glutamicum (FERM BP-4174; FR9401748)

Pantoea ananatis AJ13601 (FERM BP-7207)

Klebsiella planticola AJ13410 (FERM BP-6617)

Pantoea ananatis AJ13355 (FERM BP-6614)

Pantoea ananatis AJ13356 es deficiente en la actividad α -cetoglutarato deshidrogenasa como resultado de la interrupción del gen de la subunidad α KGDH-E1 (*sucA*). Esta cepa se identificó como *Enterobacter agglomerans* cuando se aisló y depositó como *Enterobacter agglomerans* AJ13356. Sin embargo, recientemente se reclasificó como *Pantoea ananatis* basándose en la secuenciación de nucleótidos de ARNr 16S, etc. Aunque AJ13356 se depositó en el depósito mencionado anteriormente como *Enterobacter agglomerans*, se describe como *Pantoea ananatis* en esta memoria descriptiva.

Además, como método para impartir la capacidad de producción de ácido L-glutámico a bacterias corineformes, también es posible usar el método de amplificación del gen *yggB* (NCgl 1221; NP_600492. Reports small-conductance. [gi: 19552490], documento WO2006/070944), y el método de introducción de un gen mutante *yggB* en el que se introduce una mutación en la región de codificación.

Como otros métodos para impartir o potenciar la capacidad de producción de ácido L-glutámico, también puede ejemplificarse un método para impartir resistencia a un análogo de ácido orgánico, un inhibidor de la cadena respiratoria, etc. y un método para impartir sensibilidad a un inhibidor de la síntesis de la pared celular. Los ejemplos de tales métodos incluyen el método para impartir resistencia al ácido monofluoroacético (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 50-113209), el método para impartir resistencia a adenina o timina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-065198), el método para atenuar la ureasa (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 52-038088), el método para impartir resistencia al ácido malónico (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 52-038088), el método para impartir resistencia a las benzopironas o las naftoquinonas (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-1889), el método para impartir resistencia a HOQNO (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-140895), el método para impartir resistencia al ácido α -cetomalónico (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-2689), el método para impartir resistencia a la guanidina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-35981), el método para impartir sensibilidad a la penicilina (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 4-88994), etc.

Los ejemplos específicos de tales cepas resistentes incluyen las siguientes cepas:

Brevibacterium flavum AJ3949 (FERM BP-2632; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 50-113209)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-065198)

Brevibacterium flavum AJ11355 (FERM P-5007; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-1889)

Brevibacterium flavum AJ11217 (FERM P-4319; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-2869)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 57-2869)

Brevibacterium flavum AJ11564 (FERM BP-5472; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-140895)

Brevibacterium flavum AJ11439 (FERM BP-5136; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-35981)

5 *Corynebacterium glutamicum* H7684 (FERM BP-3004; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 04-88994)

Brevibacterium lactofermentum AJ11426 (FERM P-5123; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-048890)

10 *Corynebacterium glutamicum* AJ11440 (FERM P-5137; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 56-048890)

Brevibacterium lactofermentum AJ11796 (FERM P-6402; patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 58-158192)

15 Los ejemplos preferidos de microorganismos que tienen la capacidad de producción de L-treonina usados para la presente invención incluyen bacterias que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* en las que se potencian una o más actividades de las enzimas del sistema de biosíntesis de L-treonina. Los ejemplos de genes que codifican para enzimas biosintéticas de L-treonina incluyen el gen de aspartocinasa III (*lysC*), gen de aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), gen de aspartocinasa I (*thrA*), gen de homoserina cinasa (*thrB*) y el gen de treonina sintasa (*thrC*) codificado por el operón de treonina. Pueden introducirse dos o más tipos de estos genes. Los genes que codifican para las enzimas biosintéticas de L-treonina pueden introducirse en una bacteria de *Enterobacteriaceae* en la que disminuye la descomposición de treonina. Los ejemplos de la bacteria de *Escherichia* en la que disminuye la descomposición de treonina incluye, por ejemplo, la cepa TDH6 que es deficiente en actividad treonina deshidrogenasa (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2001-346578), etc.

20 Las actividades de las enzimas biosintéticas de L-treonina se inhiben por el endoproducto L-treonina y, por tanto, las enzimas biosintéticas de L-treonina se modifican preferiblemente para que se desensibilicen a la inhibición de retroalimentación por L-treonina para construir cepas productoras de L-treonina. El gen *thrA* gene, gen *thrB* y gen *thrC* descritos anteriormente constituyen el operón de treonina que tiene una estructura atenuadora. Dado que la expresión del operón de treonina se inhibe por isoleucina y treonina en el medio de cultivo y también se inhibe por atenuación. Esta atenuación puede eliminarse o reducir eliminando la secuencia líder o el atenuador en la región de atenuación (Lynn, S.P., Burton, W.S., Donohue, T.J., Gould, R.M., Gumpert, R.I., y Gardner, J.F.J., Mol. Biol. 194: 59-69 (1987); documento WO02/26993; documento WO2005/049808).

35 El promotor nativo contenido en una región hacia 5' del operón de treonina puede reemplazarse por un promotor no nativo (documento WO98/04715), o el operón de treonina puede estar conectado al represor y promotor de fago λ para que la expresión de los genes biosintéticos de treonina esté controlada por el represor y el promotor de fago λ (documento EP0593792). Además, las bacterias de *Escherichia* mutantes que se desensibilizan a la inhibición de retroalimentación por L-treonina pueden obtenerse seleccionando cepas resistentes al ácido α -amino- β -hidroxiisovalérico (AHV).

45 Es preferible aumentar el número de copias del operón de treonina que se modifica tal como se describió anteriormente para que se desensibilice a la inhibición de retroalimentación por L-treonina en una bacteria huésped o aumente la expresión del operón modificado conectándolo a un potente promotor. El número de copias puede aumentarse usando, además de la amplificación, usando un plásmido, transposón, fago Mu o similar, de modo que el operón se transfiera a un cromosoma de una bacteria huésped.

50 El gen que codifica para aspartocinasa III (*lysC*) se modifica preferiblemente de modo que la enzima se desensibiliza a la inhibición de retroalimentación por L-lisina. Tal gen *lysC* modificado puede obtenerse por el método descrito en la patente estadounidense n.º 5.932.453.

55 Las bacterias productoras de L-treonina también pueden obtenerse preferiblemente potenciando la expresión de genes implicados en la ruta glucolítica, el ciclo de TCA o la cadena respiratoria, o genes que regulan la expresión de estos genes, o genes implicados en la absorción de azúcar. Los ejemplos de estos genes que son eficaces para la producción de L-treonina incluyen el gen de transhidrogenasa (*pntAB*, documento EP733712B), gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*pepC*, documento WO95/06114), gen de fosfoenolpiruvato sintasa (*pps*, documento EP877090B) y gen de piruvato carboxilasa derivado de la bacteria corineforme o bacteria de *Bacillus* (documento WO99/18228, documento EP1092776A).

60 Las bacterias productoras de L-treonina también pueden obtenerse preferiblemente potenciando la expresión de un gen que imparte resistencia a L-treonina y/o un gen que imparte resistencia a L-homoserina, o impartiendo resistencia a L-treonina y/o resistencia a L-homoserina a la bacteria huésped. Los ejemplos de los genes que imparten resistencia mencionada anteriormente incluyen el gen *rhtA* (Res. Microbiol 154: 123-135 (2003)), gen *rhtB* (documento EP0994190A), gen *rhtC* (documento EP1013765A), gen *yfiK* y gen *yeaS* (documento EP1016710A). En cuanto a los métodos para impartir resistencia a L-treonina a una bacteria huésped, puede hacerse referencia al documento

EP0994190A o WO90/04636.

También puede ejemplificarse *E. coli* VKPM B-3996 (patente estadounidense n.º 5.175.107) como una bacteria productora de L-treonina. La cepa VKPM B-3996 se depositó el 19 de noviembre de 1987 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM), GNII Genetika (Rusia, 117545 Moscú 1, Dorozhny proezd.1) con un número de registro VKPM B-3996. La cepa VKPM B-3996 contiene el plásmido pVIC40 (documento WO90/04636) que se obtuvo mediante la inserción de genes biosintéticos de treonina (operón de treonina, *thrABC*) en un vector de plásmido de amplia variedad de huéspedes pAYC32 que contiene el marcador de resistencia a estreptomicina (Chistorerdov, A.Y. y Tsygankov, Y.D., Plasmid, 16, 161-167 (1986)). En pVIC40, el operón de treonina contiene un gen mutante *thrA* que codifica para aspartocinasa L-homoserina deshidrogenasa I desensibilizada a la inhibición de retroalimentación por treonina.

También puede ejemplificarse *E. coli* VKPM B-5318 (documento EP 0593792B) como una bacteria productora de L-treonina preferida. La cepa VKPM B-5318 se depositó en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) GNII Genetika el 3 de mayo de 1990 con un número de registro de VKPM B-5318. La cepa VKPM B-5318 es protótrofa con respecto a la L-isoleucina, y alberga un ADN plasmídico recombinante construido de manera que el operón de treonina, es decir, los genes de biosíntesis de treonina, deficientes en la región atenuadora, que es una región de regulación de la transcripción originalmente contenida, se localiza hacia 3' del represor C1 sensible a la temperatura derivado de fago λ , el promotor PR y el gen que codifica para el extremo N-terminal de la proteína Cro, y la expresión de los genes de biosíntesis de treonina se regulan por el represor y el promotor derivado de fago λ .

En las bacterias productoras de L-aminoácidos usadas para la presente invención, los genes implicados en la absorción de azúcar, el metabolismo del azúcar (ruta glucolítica) y el metabolismo energético pueden amplificarse además de los genes que codifican para las enzimas de biosíntesis características.

Los ejemplos de los genes implicados en el metabolismo del azúcar incluyen los genes que codifican para las enzimas de la ruta glucolítica y los genes de absorción de azúcar, e incluyen el gen de glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*, documento WO 01/02542), gen de fosfoenolpiruvato sintasa (*pps*, documento EP 877090 A), gen de fosfoglucomutasa (*pgm*, documento WO03/04598), gen de fructosa bisfosfato de aldolasa (*fbp*, documento WO03/04664), gen de piruvato cinasa (*pykF*, documento WO 03/008609), gen transaldolasa (*talB*, documento WO 03/008611), gen de fumarasa (*fum*, documento WO01/02545), gen de fosfoenolpiruvato sintasa (*pps*, documento EP 877090 A), gen de absorción de sacarosa distinto de PTS (*csc*, documento EP 149911 A) y el gen de asimilación de sacarosa (operón *scrAB*, documento WO90/04636).

Los ejemplos de los genes que codifican para las enzimas implicadas en el metabolismo energético incluyen el gen de transhidrogenasa (*pntAB*, patente estadounidense n.º 5.830.716) y el gen de citocromo b tipo oxidasa (*cyoB*, documento EP 1070376).

Ejemplos

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

Ejemplo de referencia 1: construcción de una bacteria productora de L-triptófano

<1-1> Introducción del gen *serA*

Se intentó insertar el gen de fosfoglicerato deshidrogenasa (*serA*) en el plásmido pGH5 (publicación de patente internacional n.º 9408031) en un genoma usando el transposón Mud. El plásmido pCE1134 que contiene MudII1734 (patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2-109985) se digirió con *Bam*HI para eliminar un fragmento de ADN que contiene el operón *lac*, de extremo romo, y luego insertado con un ligador *Sma*I. Este plásmido se digirió nuevamente con *Sma*I, y un plásmido obtenido por autociclación del plásmido digerido se designó pMu1134. Se cortó un fragmento de ADN que contiene *serA* del plásmido pGH5 que contiene el gen *serA* de *E. coli* por digestión con *Sal*I y *Sal*II, de extremo romo e insertado en el mencionado pMu1134 en el sitio *Sma*I para construir un plásmido pMudserA que lleva Mud insertado con el gen *serA* derivado de pGH5 (designado MudserA).

Se transfirió MudserA al genoma de una bacteria productora de L-triptófano que tiene antranilato sintetasa de tipo desensibilizado, la cepa SV164 (publicación de patente internacional n.º 94/08031), como cepa receptora de una manera convencional usando pMudserA con impartición de resistencia a kanamicina como marcador para obtener la cepa L1. Se asumió que la cepa L1 tenía inserción de MudserA en una sola posición como resultado del experimento de hibridación de tipo Southern. Además, se reveló que se insertó en la posición de n.º 240.950 en el genoma de *E. coli* K-12 (n.º de registro de GenBank U00096) por clonación y secuenciación de nucleótidos del fragmento de ADN genómico que contiene MudserA por PCR.

<1-2> Introducción de operón *trp*

Luego, se intentó aumentar el número de copias del operón *trp* mediante la inserción del operón *trp* en el genoma

usando un transposón. Los genes del operón *trp* se cortaron del plásmido pGX100. pGX100 es un plásmido obtenido insertando un fragmento de ADN de la cepa *E. coli* MTR#2 que tiene un gen *trpE* de tipo desensibilizado (patente estadounidense n.º 4.371.614) en pBR313, y un fragmento de ADN de aproximadamente 7,6 kb que contiene el operón *trp* puede extraerse del mismo mediante digestión con *Xho*I y *Sma*I. El fragmento de ADN que contiene el operón *trp* operón se cortó de pGX100 por digestión con *Xho*I y *Sma*I, de extremo romo, y luego se insertó en el pCE1134 mencionado anteriormente en el sitio *Sma*I. También puede clonarse directamente un fragmento de ADN similar que contiene el operón *trp* de ADN genómico de la cepa de *E. coli* MTR#2 por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO: 1 y 2 mostrados en la lista de secuencias. Tal como se describió anteriormente, se construyó un plásmido pMudtrpG'lac que portaba Mud insertado con los genes del operón *trp* de la cepa MTR#2 (designado MudtrpG'lac).

Antes del aumento del número de copias mediante la inserción de MudtrpG'lac en el genoma, la propiedad de la deficiencia de la capacidad de utilización de lactosa se transmitió a la cepa huésped con el fin de usar la complementación de la capacidad de utilización de lactosa como un marcador de selección de una cepa insertada. La cepa L1 se impartió con resistencia a L-valina por transducción de PI del gen *ilvG* derivado de la bacteria productora de L-treonina VKPM B-3996 (patente estadounidense n.º 5.175.107) (remítase a la publicación de patente internacional WO2005/103228). El experimento de transducción de PI se realizó de manera convencional, las células se aplicaron en el medio mínimo M9 (4 g/l de glucosa, 12,8 g/l de Na₂HPO₄ · 7H₂O, 3 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de NaCl, 1 g/l de NH₄Cl, MgSO₄ 5 mM, CaCl₂ 0,1 mM, 1 mg/l de tiamina, 20 mg/l de L-Phe, 20 mg/l de L-Tyr, 20 mg/l de L-Met, 3 mg/l de piridoxina, 20 mg/l de L-Val, 20 mg/l de tetraciclina), y se obtuvo una cepa de las colonias que aparecieron como una cepa resistente a Val, y se designó L1ValR.

De la cepa ME8581 (HfrH(valS—uxuAB): lacZ98 :: Tn10 relA1 thi-1, depositada en el Instituto Nacional de Genética), se realizó la transducción de PI de lacZ98 :: Tn10 en L1ValR de manera convencional mediante el uso de la resistencia a la tetraciclina que se origina en Tn10 como marcador. La cepa obtenida carecía de la capacidad de utilización de lactosa como se esperaba. Luego, con el fin de obtener una cepa que carece de capacidad de utilización de lactosa en la que se elimina Tn10, se obtuvo una cepa sensible a tetraciclina, 14-1-lac-tets, de la cepa transductora por replicación. La cepa 14-1-lac-tets todavía carecía de capacidad de utilización de lactosa. Cuando se confirmó el estado de Tn10 en esta cepa por hibridación de tipo Southern, no se detectó ninguna banda que se hibridara con el gen *tet*, pero se detectó una banda que se hibridó con la región IS10 de Tn10, y por tanto se consideró que IS10 permaneció en el gen *lacZ* en esta cepa.

Se transfirió MudtrpG' lac al genoma de la cepa 14-1-lac-tets como cepa receptora de manera convencional usando pMudtrpG' lac, y se obtuvo una cepa n.º 202 usando la complementación de la capacidad de utilización de lactosa como marcador. Si el transposón insertado o el gen en el transposón es probable que salga fuera de la cepa insertada por el transposón o del transposón, la cepa puede subcultivarse en un medio nutritivo, y puede seleccionarse una cepa que muestra de manera estable resistencia a kanamicina, capacidad de utilización de lactosa, etc. Se asumió que la cepa n.º 202 tenía inserción de MudtrpG' lac en una sola posición como resultado del experimento de hibridación de tipo Southern. Además, se reveló que se insertó en la posición de n.º 530.249 en el genoma de *E. coli* K-12 (n.º de registro de GenBank U00096) por clonación y secuenciación de nucleótidos del fragmento de ADN genómico que contiene MudtrpG' lac por PCR.

Luego, los genes implicados en la propiedad de utilización de sacarosa, *scrK*, *scrY*, *scrA*, *scrB* y *scrR*, se introdujeron en la cepa n.º 202 por transducción de PI, y esta cepa se designó n.º 202 scr (remítase a la publicación de patente internacional WO90/04636).

<1-3> Construcción de plásmido para la interrupción de *iclR*

Se amplificó el fragmento de *iclR* por PCR usando Pyrobest DNA Polymerase (Takara Shuzo) según el método descrito en las instrucciones adjuntas. Se realizó PCR con el genoma de W3110 extraído usando RNA/DNA Maxi Kit (Quiagen) como molde y oligonucleótidos de SEQ ID NO: 3 y 4 como cebadores. Después de la PCR, el fragmento de ADN amplificado se purificó usando Wizard PCR Preps (Promega). Después de la digestión con enzimas de restricción *Eco*RI y *Hind*III (Takara Shuzo), el fragmento de ADN purificado se sometió a un tratamiento con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. El fragmento digerido y pUC18 (Takara Shuzo) digerido con las mismas enzimas y purificado se ligaron usando el kit de ligamiento de ADN ver.2 (Takara Shuzo). Las células competentes de JM109 (Takara Shuzo) se transformaron con la disolución de reacción de ligamiento anterior y se colocaron en una placa de agar LB que contenía 50 µg/ml de ampicilina (Amp, Meiji Seika) (placa de LB + Amp), y las colonias se seleccionaron a 37°C. Las colonias se cultivaron en medio LB que contenía 50 µg/ml de Amp a 37°C en un tubo de ensayo, y la extracción de plásmidos se realizó usando un extractor automático de plásmidos, PI-50 (Kurabo Industries).

El plásmido pUCiClR obtenido se digirió con *Eco*065I (Takara Shuzo), luego se hizo el extremo romo y se ligó usando el kit BKL (Takara Shuzo). Se transformó JM109 con la disolución de ligamiento, y la selección de colonias y la extracción de plásmidos se realizaron tal como se describió anteriormente. Los plásmidos obtenidos se digirieron con *Eco*RI y *Hind*III, se purificaron y luego se ligaron con el plásmido pTS1 sensible a la temperatura (obtenido por recombinación de fragmentos *Pst*I-*Hind*III de pMAN031 (J. Bacteriol., 162, 1196-1202 (1985), remítase a la figura 1) y pBR322 (Takara Shuzo)) se digirieron con las mismas enzimas y se purificaron. Se transformó JM109 con la disolución de reacción de ligamiento anterior, y las colonias se seleccionaron a 30°C en una placa de LB + Amp. Las colonias se

cultivaron en medio LB que contenía 50 µg/ml de Amp a 30°C en un tubo de ensayo, y los plásmidos se extrajeron tal como se describió anteriormente. Un plásmido del que pudo obtenerse un fragmento de la longitud objetivo por digestión con EcoRI y HindIII se usó como plásmido para interrupción de *iclR*, pTSΔ*iclR*.

5 <1-4> Adquisición de cepa con *iclR* interrumpido

Se transformó la cepa n.º 202 scr con pTSΔ*iclR*, y las colonias se seleccionaron sobre una placa de LB + Amp a 30°C. Las cepas seleccionadas se cultivaron a 30°C durante la noche como cultivo líquido. El medio de cultivo se diluyó 10⁻³ veces, y se inoculó sobre una placa de LB + Amp, y las colonias se seleccionaron a 42°C. Las colonias seleccionadas se aplicaron y se extendieron sobre una placa de LB + Amp, y se cultivaron a 30°C. Luego, las células en 1/8 de la placa se suspendieron en 2 ml de medio LB y se cultivaron a 42°C durante de 4 a 5 horas con agitación. Las células diluidas 10⁻⁵ veces se sembraron en una placa de LB, y se inocularon varios cientos de colonias entre las colonias obtenidas en una placa de LB y placa de LB + Amp, y se confirmó el crecimiento para determinar la sensibilidad o resistencia de Amp. La PCR de colonias se realizó para cepas sensibles a ampicilina usando los oligonucleótidos de SEQ ID NO: 3 y 4 como cebadores, y una cepa que proporcionaba un fragmento amplificado que no se digirió con Eco065I se obtuvo como cepa deficiente en *iclR* (n.º 202Δ*iclR*).

Ejemplo 1: producción de L-triptófano

20 Se inoculó un asa de disolución de reserva de glicerol de la bacteria productora de triptófano n.º 202Δ*iclR* en un medio de placa de LB-agarosa (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 1%, agarosa al 1,5%) y se cultivó a 30°C durante 24 horas como cultivo estático. Se inoculó un asa (aproximadamente 10 µl) de las células cultivadas en 50 ml de medio LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 1%) contenidas en un matraz Sakaguchi de 500 ml y se cultivó previamente a 30°C durante de 7 a 8 horas con agitación (115 rpm).

25 El medio de cultivo previo mencionado anteriormente se inoculó en un volumen de 1 ml a 300 ml de un medio de cultivo de siembra que tenía la composición mostrada en la tabla 2. El cultivo se realizó a 30°C durante aproximadamente 14 horas usando un pequeño tanque de fermentación que tenía volumen total de 1 l con aireación de aire comprimido esterilizado con un filtro de esterilización a 1 vvm con agitación a 800 rpm. Además, durante el cultivo, la temperatura se mantuvo a 30°C y el pH se mantuvo a 6,5 con gas amoníaco.

Tabla 2: Composición del medio de cultivo de semillas.

Componentes	
Glucosa	10 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
(NH ₄) ₂ ·SO ₄	2,5 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5 g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10 mg/l
Hidrolizado de soja	0,4 g/l
L-metionina	50 mg/l
L-fenilalanina	125 mg/l
L-tirosina	125 mg/l
Vitamina B1	5 mg/l
Piridoxina	30 mg/l
GD-113	0,05 ml/l

35 Un medio obtenido mediante la adición de metilcelulosa (MC, Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd., "Methylcellulose 100 cP") a 300 ml de un medio de cultivo principal que tiene la composición mostrada en la tabla 3 a una concentración de 1,95 g/l y se prepararon 300 ml del medio de cultivo principal no añadido con MC, y se inocularon 30 ml del medio de cultivo de siembra en cada uno. El cultivo principal se realizó a 31°C usando un pequeño tanque de fermentación que tenía un volumen completo de 1 l con aireación de aire comprimido esterilizado con un filtro de esterilización a 1 vvm con agitación a 800 rpm. Además, durante el cultivo, la temperatura se mantuvo a 31°C y el pH se mantuvo a 6,7 con gas amoníaco. Durante el cultivo, se alimentó apropiadamente una disolución de glucosa 700 g/l para controlar que la concentración de sacárido en el pequeño tanque de fermentación fuera de 5 a 20 g/l.

Tabla 3: Composición del medio de cultivo principal.

Componentes	
Glucosa	15 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/l
Hidrolizado de soja	0,75 g/l
NaCl	0,5 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,3 g/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	14,7 mg/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	7,5 mg/l
L-metionina	0,3 g/l
L-fenilalanina	1 g/l
L-tirosina	1 g/l
Vitamina B1	5 mg/l
Piridoxina	36,5 mg/l
NH ₄ Cl	3,13 g/l
KOH	1 g/l
GD-113	0,05 ml/l

Después de 49,5 horas del cultivo principal, se midió la concentración de L-triptófano en el medio. El rendimiento basado en el sacárido y la tasa de producción se muestran en la tabla 4. En la tabla 4, los resultados obtenidos mediante la adición de metilcelulosa se muestran como razones con respecto a los resultados obtenidos sin añadir metilcelulosa, que se toman como 1. Se encontró que si se añadía la metilcelulosa, tanto el rendimiento basado en el

Tabla 4: Resultados de la fermentación por cultivo principal.

	Sin adición de MC	Con la adición de MC
Rendimiento (%)	1	1,26
Tasa de producción (g/l/h)	1	1,33

Después del cultivo, las impurezas en el caldo de fermentación se analizaron por HPLC, y se encontró que la cantidad de impurezas observada con la adición de metilcelulosa fue de 0,637 basándose en la obtenida sin la adición de metilcelulosa, que se tomó como 1. Por tanto, se confirmó la reducción de la cantidad total de impurezas importantes distintas de triptófano.

Ejemplo 2: producción de L-fenilalanina

Se inoculó un asa de disolución de reserva de glicerol de una bacteria productora de fenilalanina AJ12741 (FERM BP-4796) en un medio de placa de agarosa LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 1%, agarosa al 1,5%) y se cultivó a 37°C durante 24 horas como cultivo estático. Un asa (aproximadamente de 10 µl) de las células cultivadas se inoculó en 500 ml de medio LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, cloruro de sodio al 1%) y se cultivó previamente a 37°C durante 7 horas con agitación (115 rpm). La cepa AJ12741 es una cepa obtenida mediante la introducción del plásmido pMGAL1 que contiene los genes que codifican para la 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa desensibilizada a la inhibición de retroalimentación, la corismato mutasa-prefenato deshidratasa desensibilizada a la inhibición de retroalimentación y la shikimato cinasa en la cepa de *Escherichia coli* K-12 W3110 deficiente en los genes *tyrR* y *tyrA* (W3110 (*tyrR*, *tyrA*)/pMGAL1, patente japonesa n.º 3225597). Esta cepa se depositó el 11 de junio de 1992 en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana de la Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial (actualmente agencia administrativa independiente, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, Depositario Internacional de Organismos de Patentes, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón), con un número de depósito de FERM P-13000 basándose en el Tratado de Budapest. El depósito original se convirtió en un depósito internacional basándose en el Tratado de Budapest el 14 de septiembre de 1994 con un número de depósito de FERM BP-4796.

El medio de cultivo previo mencionado anteriormente se inoculó en un volumen de 1 ml a 300 ml de un medio de

cultivo de siembra que tenía la composición mostrada en la tabla 5. El cultivo se realizó a 37°C durante aproximadamente 14 horas usando un pequeño tanque de fermentación que tenía volumen total de 1 l con aireación de aire comprimido esterilizado con un filtro de esterilización a 1 vvm con agitación a 800 rpm. Además, durante el cultivo, la temperatura se mantuvo a 37°C y el pH se mantuvo a 6,5 con gas amoníaco.

Tabla 5: Composición del medio de cultivo de siembra

Componentes	
Glucosa	20 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10 mg/l
Hidrolizado de soja	0,3 g/l
L-tirosina	300 mg/l

Un medio obtenido mediante la adición de metilcelulosa (MC, Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd., "Methylcellulose 100 cP") a 300 ml de un medio de cultivo principal que tiene la composición mostrada en la tabla 6 a una concentración de 0,5 g/l y se prepararon 300 ml del medio de cultivo principal no añadido con MC, y se inocularon 30 ml del medio de cultivo de siembra en cada uno. El cultivo principal se realizó a 37°C usando un pequeño tanque de fermentación que tenía un volumen total de 1 l con aireación de aire comprimido esterilizado con un filtro de esterilización a 1 vvm con agitación a 800 rpm. Además, durante el periodo de cultivo, la temperatura se mantuvo a 37°C y el pH se mantuvo a 7,0 con gas amoníaco. Durante el cultivo, se alimentó apropiadamente una disolución de glucosa 700 g/l para controlar que la concentración de sacárido en el pequeño tanque de fermentación fuera de 0 a 10 g/l. Después de 21 horas de cultivo, se añadieron 7 g de L-fenilalanina al tanque de fermentación.

Tabla 6: Composición del medio de cultivo principal.

Componentes	
Glucosa	20 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/l
Hidrolizado de soja	0,5 g/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10 mg/l
L-tirosina	1 g/l
KOH	0,8 g/l
GD-113	0,05 ml/l

Después de 46 horas del cultivo principal, se midió la concentración de L-fenilalanina en el medio. El rendimiento basado en el sacárido y la tasa de producción se muestran en la Tabla 7. En la Tabla 7, los resultados obtenidos al añadir metilcelulosa se muestran como proporciones con respecto a los resultados obtenidos sin añadir metilcelulosa, que se toman como 1. Se encontró que si se añadía metilcelulosa, tanto el rendimiento basado en el sacárido como la tasa de producción mejoraron en comparación con los obtenidos sin añadir metilcelulosa.

Tabla 7: Resultados de la fermentación por cultivo principal

	Sin adición de MC	Con la adición de MC
Rendimiento (%)	1	1,07
Tasa de producción (g/l/h)	1	1,08

Aplicabilidad industrial

Según la presente invención, en un método para producir un L-aminoácido por fermentación usando un microorganismo que tiene capacidad de producción de L-aminoácido, se hace posible mejorar la productividad del L-aminoácido y/o reducir las impurezas en los cristales del L-aminoácido precipitado en el medio. La mejora de la productividad del L-aminoácido incluye una mejora en el rendimiento basada en sacárido y/o una mejora en la tasa de producción.

Lista de secuencias

10	<110> Ajinomoto Co., Inc.	
	<120> Un método para producir L-aminoácido	
	<130> C871-C7227	
15	<150> Documento JP2006-276659	
	<151> 10-10-2006	
	<160> 4	
20	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 1	
	gggttaattg ttttctgcg	20
	<210> 2	
	<211> 20	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
40	<400> 2	
	cgcacatctga ctgcacggtg	20
	<210> 3	
45	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> cebador	
	<400> 3	
	gccgaattca agtgtgtgaa gtgtatg	27
55	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 4	
65	gccaaagcttc cgacacgctc aaccag	27

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un L-aminoácido mediante fermentación que comprende cultivar un microorganismo que tiene la capacidad de producción de L-aminoácido en un medio líquido para acumular el L-aminoácido en el medio con precipitación del L-aminoácido, en el que el medio contiene un polímero seleccionado del grupo que consiste en un derivado de celulosa soluble en agua, un compuesto de polivinilo soluble en agua, un compuesto de polivinilo soluble en disolvente orgánico polar, una sal de ácido alginico y una sal de ácido poliacrílico.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el polímero se selecciona del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), dietilaminoacetato de polivinilacetato, arginato de sodio y poliacrilato de sodio.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el microorganismo es una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* o una bacteria corineforme.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicha bacteria pertenece al género *Escherichia* o género *Pantoea*.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha bacteria es *Escherichia coli*.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-leucina, L-iso-leucina, L-valina, L-triptófano, L-fenilalanina, L-tirosina, L-treonina y ácido L-glutámico.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polímero es metilcelulosa y el medio líquido contiene 1 g/l o más de metilcelulosa.
8. Método según la reivindicación 6, en el que dicho L-aminoácido es L-fenilalanina.
9. Método para producir un éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina, que comprende producir L-fenilalanina mediante el método según las reivindicaciones 8 y sintetizar el éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina a partir de ácido aspártico o su derivado y la L-fenilalanina obtenida.
10. Método según la reivindicación 9, que comprende además esterificar la L-fenilalanina para generar un éster alquílico inferior de L-fenilalanina, condensar el éster alquílico inferior de L-fenilalanina con el derivado de ácido aspártico, en el que el derivado es anhídrido N-acil-L-aspartico, separar el éster alquílico inferior de N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina de la mezcla de reacción e hidrogenar el éster alquílico inferior de N-acil- α -L-aspartil-L-fenilalanina para generar el éster alquílico inferior de α -L-aspartil-L-fenilalanina.