



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 782**

51 Int. Cl.:
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 13/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04747680 .9**
96 Fecha de presentación : **16.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1647593**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2006**

54 Título: **Procedimiento para producir L-histidina utilizando bacterias de la familia Enterobacteriáceas.**

30 Prioridad: **16.07.2003 RU 2003121600**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

73 Titular/es: **AJINOMOTO Co., Inc.**
15-1, Kyobashi 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-8315, JP

72 Inventor/es: **Klyachko, Elena, Vitalievna;**
Shakulov, Rustam, Saidovich y
Kozlov, Yuri, Ivanovich

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 367 782 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

Procedimiento para producir L-histidina utilizando bacterias de la familia Enterobacteriáceas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la biotecnología, y especialmente a un procedimiento para producir, mediante fermentación, un L-amino ácido tal como la L-histidina. La presente invención se refiere además a un gen derivado de una bacteria *Escherichia coli*. El gen resulta útil para mejorar la producción de L-histidina.

10

Antecedentes de la técnica

Convencionalmente, los L-aminoácidos se han obtenido industrialmente mediante fermentación, utilizando cepas de microorganismos obtenidos a partir de fuentes naturales, o mutantes de los mismos, modificados para aumentar la productividad de los L-aminoácidos.

15

Se ha informado de muchas técnicas con respecto al aumento de la producción de los L-aminoácidos, por ejemplo, mediante la transformación del microorganismo mediante ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente US nº 4.278.765). Estas técnicas están basadas en el aumento de las actividades de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los aminoácidos y/o en las enzimas de desensibilización de las dianas a partir de la inhibición retroactiva por el L-aminoácido producido (véase, por ejemplo, la solicitud japonesa abierta al público nº 56-18596 (1981), WO 95/16042 o las patentes US nº 5.661.012 y nº 6.040.160).

20

El gen *talB* codifica la transaldolasa (TAL, D-sedoheptulosa-7-fosfato: D-gliceraldehído-3-fosfato-dihidroxiacetona transferasa) [EC 2.2.1.2], una enzima del ciclo no oxidativo de las pentosas fosfato (Sprenger G.A. *et al*, J. Bacteriol., 1995, Oct 177:20, 5930-6). La transaldolasa constituye una enzima clave en la biosíntesis de la ribosa-5-fosfato a partir de los productos de la glicólisis. La enzima cataliza la transferencia reversible de una fracción dihidroacetónica derivada de la fructosa-6-fosfatasa a la eritrosa-4-fosfato, formando seduheptulosa-7-fosfato y liberando gliceraldehído-3-fosfato. Entonces, la seduheptulosa-7-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato se convierten en dos moléculas de pentosa-5-fosfato mediante la actividad de la transcetolasa.

25

30

Anteriormente, se ha informado de que el aumento de la actividad de la transaldolasa es útil para la producción microbiana de sustancias a partir del metabolismo aromático, en particular los aminoácidos aromáticos tales como la L-fenilalanina (patente US nº 6.316.232).

35

Recientemente, se ha sugerido, basándose únicamente en la teoría, que puede llevarse a cabo la preparación de L-treonina mediante la fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriáceas con lo cual uno o más genes de un amplio grupo de genes, que incluyen el gen *talB*, se atenúan, y en particular, se eliminan (WO03008600A2). Al mismo tiempo, y en abierta contradicción con esto, se dio a conocer en WO03/008611A2 la preparación de L-treonina mediante fermentación de microorganismos de la familia de las Enterobacteriáceas, en la cual se aumenta, y se sobreexpresa en particular, la expresión de, por lo menos, el gen *talB*.

40

En Lu J-L *et al*: "Metabolic engineering and control analysis for production of aromatics: Role of transaldolase", Biotechnology and Bioengineering, vol. 53, nº 2, 1997, páginas 132-138, se da a conocer la utilización de una bacteria que sobreexpresa *talB* para la producción de aminoácidos aromáticos.

45

Sin embargo, hasta la fecha, no han existido informes que describan la amplificación del gen *talB* con el propósito de aumentar la producción de L-histidina utilizando cepas de la familia Enterobacteriáceas.

50 **Exposición de la invención**

Un objetivo de la presente invención consiste en desarrollar una cepa del microorganismo productor de L-histidina, que muestre un aumento de la producción de L-histidina. Otro objetivo de la invención consiste en proporcionar un procedimiento para producir L-histidina, utilizando dicha cepa.

55

La presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Una bacteria productora de L-histidina de la familia Enterobacteriáceas, en la que la bacteria se ha modificado, de forma que la actividad enzimática transaldolásica por célula sea superior a la de una cepa no modificada, aumentando el número de copias de dicho gen de la transaldolasa, o reemplazando el promotor natural del gen de la transaldolasa por un promotor más potente, en el que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína seleccionada de entre el grupo constituido por:

60

(A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID. nº:2; y

65

(B) la proteína de (A) que incluye deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de 1 a 30 aminoácidos en

la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2 y que posee actividad enzimática transaldolásica,

en la que dicha bacteria muestra un aumento de la expresión de por lo menos un gen, seleccionado de entre el grupo constituido por los genes *hisG*, *hisB*, *hisH*, *hisA*, *hisF* y *hisI*.

- 5
- (2) Una bacteria productora de L-histidina de la familia Enterobacteriáceas, en la que la bacteria se ha modificado, de forma que la actividad enzimática transaldolásica por célula sea superior a la de una cepa no modificada, aumentando el número de copias de dicho gen de la transaldolasa, o reemplazando el promotor natural del gen de la transaldolasa por un promotor más potente, en la que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína seleccionada de entre el grupo constituido por:
- 10
- (A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID. nº:2; y
- (B) la proteína de (A) que incluye deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de 1 a 30 aminoácidos en la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2 y que posee actividad enzimática transaldolásica;
- 15
- en la que dicha bacteria muestra un aumento de la expresión de un gen de la ATP fosforibosiltransferasa de *Escherichia coli*.
- (3) La bacteria según (2), en la que dicho gen de la ATP fosforibosiltransferasa es desensibilizado a la inhibición retroactiva por la L-histidina.
- 20
- (4) Un procedimiento para producir L-histidina, que comprende el cultivo de una bacteria productora de L-histidina de la familia Enterobacteriáceas en un medio de cultivo, y la recuperación a partir del medio de cultivo de la L-histidina acumulada, en el que la bacteria se ha modificado, de modo que la actividad enzimática transaldolásica por célula sea superior a la de una cepa no modificada, aumentando el número de copias de dicho gen de la transaldolasa, o reemplazando el promotor natural del gen de la transaldolasa por un promotor más potente, en el que dicho gen de la transaldolasa codifique una proteína seleccionada de entre el grupo constituido por:
- 25
- (A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID. nº:2; y
- (B) la proteína de (A) que incluye deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de 1 a 30 aminoácidos en la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2 y que posee actividad enzimática transaldolásica.
- 30
- (5) El procedimiento según (4), en el que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína que posee una identidad del 95% o más con la secuencia aminoácida de SEC. ID. nº:2, y posee actividad enzimática transaldolásica.
- 35
- (6) El procedimiento según (4), en el que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2.
- (7) El procedimiento según (4), en el que dicho gen de la transaldolasa comprende una secuencia nucleotídica de los nucleótidos 1 a 954 en SEC ID nº:1.
- 40
- (8) El procedimiento según cualquiera de (4) a (7), en el que dicha bacteria pertenece al género *Escherichia*.
- 45
- (9) El procedimiento según (8), en el que dicha bacteria es la *Escherichia coli*.
- (10) El procedimiento según cualquiera de (4) a (9), en el que el número de copias del gen de la transaldolasa aumenta mediante la transformación de dicha bacteria con un vector multicopia que alberga dicho gen de la transaldolasa.
- 50
- (11) El procedimiento según cualquiera de (4) a (10), en el que dicha bacteria posee una expresión aumentada de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por los genes *hisG*, *hisB*, *hisH*, *hisA*, *hisF* y *hisI*.
- 55
- (12) El procedimiento según cualquiera de (4) a (10), en el que dicha bacteria posee una expresión aumentada de un gen de la ATP fosforibosiltransferasa de la *Escherichia coli*.
- 60
- (13) El procedimiento según (12), en el que dicho gen de la ATP fosforibosiltransferasa es desensibilizado a la inhibición retroactiva mediante la L-histidina.

Formas de realización preferidas de la invención

65 Los objetivos mencionados anteriormente se alcanzaron identificando el gen *talB* que codifica la transaldolasa (TAL,

D-sedoheptulosa-7-fosfato:D-gliceraldehído-3-fosfato-dihidroxiacetona transferasa) [EC 2.2.1.2], que no está implicada en la vía biosintética del L-aminoácido diana, pero que puede aumentar la producción de L-histidina cuando copias adicionales se introducen en las células de la cepa productora respectiva. De este modo, se ha llevado a cabo la presente invención.

5 La presente invención se explicará con mayor detalle a continuación.

10 La bacteria de la presente invención es una bacteria de la familia Enterobacteriáceas que produce L-histidina, en la que la producción de L-histidina mediante la bacteria se realiza mediante el aumento en la bacteria de una actividad de la proteína de la presente invención. Específicamente, la bacteria de la presente invención es una bacteria que produce L-histidina, que pertenece al género *Escherichia*, en la que la producción de L-histidina por la bacteria se realiza aumentando en la bacteria una actividad de la proteína de la presente invención, especialmente transaldolasa. Más específicamente, la bacteria de la presente invención contiene ADN cromosómico o plasmídico que incluye el gen *talB*, y que muestra un aumento de la capacidad para producir L-histidina mediante la sobreexpresión del gen *talB*.

15 La expresión "Bacteria productora de L-histidina" hace referencia a una bacteria, que posee capacidad para provocar la acumulación de L-histidina en un medio, cuando la bacteria de la presente invención se cultiva en el medio. La capacidad para producir L-histidina puede provocarse o aumentarse mediante la cría. El término "bacteria productora de L-histidina" tal como se utiliza en la presente memoria, puede también significar una bacteria que puede producir y acumular en un medio de cultivo la L-histidina en una cantidad superior a en una cepa parental o de tipo salvaje, significando preferentemente el microorganismo que puede producir y provocar la acumulación en un medio de una cantidad no inferior a 0,5 g/l, más preferentemente no inferior a 1,0 g/l de L-histidina.

20 La familia de las Enterobacteriáceas incluye bacterias que pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*. Se prefiere al género *Escherichia*.

25 La frase "una bacteria que pertenece al género *Escherichia*" se refiere a que la bacteria se clasifica como el género *Escherichia* según la clasificación conocida por el experto en la materia microbiológica. Un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* tal como se utiliza en la presente invención comprende de manera no limitativa la *Escherichia coli* (*E. coli*).

30 La expresión "actividad transaldolásica" se refiere a una actividad para catalizar la reacción de transferencia reversible de una fracción dihidroacetónica derivada de la fructosa-6-fosfato a la eritrosa-4-fosfato, formando la sedoheptulosa-7-fosfato y liberando el gliceraldehído-3-fosfato. La actividad de la transaldolasa puede medirse mediante el procedimiento descrito por, por ejemplo, GA. Sprenger, U. Schorken, G. Sprenger & H. Sahn ("Transaldolase B of *Escherichia coli* K-12: cloning of its gene, *talB*, and characterization of the enzyme from recombinant strains. J. Bacteriol., 1995, 177:20: 5930-6).

35 La frase "modificada para aumentar una actividad de la transaldolasa" se refiere a que la bacteria se ha modificado de forma que la actividad por célula es superior a la de una cepa no modificada, por ejemplo, de una cepa salvaje. Por ejemplo, se incluyen células en las que aumenta el número de moléculas de transaldolasa por célula, células en las que aumenta la actividad específica por molécula de transaldolasa, y así sucesivamente. Además, la cepa salvaje que puede servir como un objeto para comparación incluye, por ejemplo, la *Escherichia coli* K-12. Como resultado del aumento de la actividad intracelular de la transaldolasa, aumenta la acumulación de L-histidina en el medio.

40 El aumento de la actividad transaldolásica en una célula bacteriana puede obtenerse aumentando la expresión de un gen que codifique la transaldolasa. Pueden utilizarse genes que codifiquen la transaldolasa derivados de bacterias de la familia Enterobacteriáceas y/o genes derivados de otras bacterias, tales como bacterias corineformes. Resultan preferidos los genes derivados de bacterias que pertenecen al género *Escherichia*.

45 Como gen que codifica la transaldolasa de la *Escherichia coli* (número EC 2.2.1.2), ya se ha informado del gen *talB*, (nucleótidos nº 8238 a nº 9191 en la secuencia de GenBank, número de registro NC_000913.1, gi:16128002). Por tanto, el gen *talB* puede obtenerse mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa; haciendo referencia a White, T.J. *et al.*, Trends Genet., 5, 185 (1989)), utilizando cebadores basados en la secuencia nucleotídica del gen. Los genes que codifican la transaldolasa de otros organismos, pueden obtenerse de forma similar.

50 Un ejemplo del gen *talB* derivado de la *Escherichia coli*, incluye un ADN que codifica la proteína (A) o (B) siguiente:

60 (A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID. nº:2; y

(B) una proteína que comprende la secuencia aminoácida que incluye delecciones, sustituciones, inserciones o adiciones de uno a varios aminoácidos en la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2 y que posee actividad transaldolásica.

El ADN que codifica las proteínas de la presente invención incluye un ADN que codifica la proteína que presenta posiblemente deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones de la proteína (A), siempre que no conduzca a la pérdida de la actividad proteica. El número de "varios" aminoácidos difiere, dependiendo de la posición de los residuos de aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína, y del tipo de aminoácidos. Sin embargo, significa entre 2 y 30 para la proteína (A). Esto es así, debido a que algunos aminoácidos presentan, entre ellos, una alta homología, y la diferencia en un aminoácido no afecta de forma acusada a la estructura tridimensional de la proteína y a su actividad. Por tanto, la proteína (B) puede consistir en una que muestre una homología no inferior a entre 30 y 50%, preferentemente no inferior a entre 50 y 70%, más preferentemente no inferior a entre 70 y 90%, y muy preferentemente no inferior a 95% con respecto a la secuencia aminoácida completa de la transaldolasa, y que presente la actividad de la transaldolasa.

Para evaluar el grado de homología, pueden utilizarse procedimientos de cálculo conocidos, tales como la investigación BLAST, la investigación FASTA y Crustal W. BLAST (Herramienta de investigación de la alineación local básica) es el algoritmo heurístico de investigación que se utiliza por los programas blastp, blastn, blastx, megablast, tblastn, y tblastx; estos programas atribuyen significado a sus hallazgos, utilizando los métodos estadísticos de Karlin, Samuel y Stephen F. Altschul ("Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes"). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87:2264-68; "Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90:5873-7). El método FASTA de investigación se describe por W. R. Pearson ("Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA"), Methods in Enzymology 1990 183:63-98). El método Clustal W es descrito por Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T.J. ("CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", Nucleic Acids Res.1994, 22:4673-4680).

Los cambios a la transaldolasa tales como los que se han descrito anteriormente, son típicamente conservadores, de forma que se mantiene la actividad transaldolásica. Los cambios sustitutos incluyen aquellos en los que un residuo, por lo menos, en la secuencia aminoácida, se elimina, insertándose un residuo distinto en su lugar. Los ejemplos de aminoácidos que pueden sustituirse por un aminoácido original en una proteína transaldolásica y que se consideran como sustituciones conservadoras incluyen: Ala, que se sustituye con ser o thr; arg, que se sustituye con gln, his, o lys; asn, que se sustituye con glu, gln, lys, his, asp; asp que se sustituye con asn, glu, o gln; cys que se sustituye con ser o ala; gln, que se sustituye con asn, glu, lys, his, asp o arg; glu que se sustituye con asn, gln, lys o asp; gly que se sustituye con pro; his que se sustituye con asn, lys, gln, arg, tyr; ile que se sustituye con leu, met, val, phe; leu que se sustituye con ile, met, val, phe; lys que se sustituye con asn, glu, gln, his, arg; met que se sustituye con ile, leu, val, phe; phe que se sustituye con trp, tyr, met, ile o leu; ser que se sustituye con thr, ala; thr que se sustituye con ser o ala; trp que se sustituye con phe, tyr; tyr que se sustituye con his, phe, o trp; y val que se sustituye con met, ile, leu.

La modificación a una transferasa tal como se ha descrito anteriormente puede llevarse a cabo teniendo en cuenta los hallazgos sobre las transaldolasas conocidas, por ejemplo, Methods Enzymol., 2002; 354:197-201; Eur. J. Biochem., abril 2001; 268(8):2408-15; FEBS Lett., 18 diciembre 1998; 441(2):247-50; Protein Sci. enero 1997; 6(1):119-24 y, Structure, 15 junio 1996; 4(6):715-24.

Puede obtenerse el ADN que codifica sustancialmente la misma proteína que la proteína definida en (A). Por ejemplo, mediante la modificación de la secuencia nucleotídica que codifica la proteína definida en (A), utilizando la mutagénesis dirigida puntualmente, de forma que uno o más residuos de aminoácidos serán suprimidos, sustituidos, insertados o añadidos. Dicho ADN modificado puede obtenerse mediante procedimientos convencionales utilizando el tratamiento con reactivos y condiciones que generen mutaciones. Dicho tratamiento incluye el del ADN que codifica las proteínas de la presente invención con hidroxilamina o el tratamiento de la bacteria que contiene el ADN con irradiación UV o un reactivo tal como la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina o el ácido nitroso.

El ADN que codifica proteínas de la presente invención incluye variantes que pueden encontrarse en distintas cepas de bacterias que pertenecen al género *Escherichia*, debido a la diversidad natural. El ADN que codifica dichas variantes puede obtenerse aislando el ADN que se hibrida al gen *talB* o a una parte suya, bajo condiciones rigurosas, y que codifica la proteína que posee una actividad transaldolásica. El término "condiciones rigurosas" puede incluir condiciones bajo las cuales se forma un denominado híbrido específico, no formándose un híbrido no específico. Por ejemplo, las condiciones rigurosas incluyen condiciones bajo las cuales los ADN que presentan una alta homología, por ejemplo, ADN que, entre ellos, presentan una homología no inferior a 70%, preferentemente no inferior a 80%, más preferentemente no inferior a 90%, todavía más preferentemente no inferior a 95%, pueden hibridarse. Alternativamente, las condiciones rigurosas pueden incluir condiciones que son condiciones típicas de lavado para la hibridación Southern, por ejemplo, 60°C, 1 x SSC, SDS al 0,1%, preferentemente 0,1 x SSC, SDS al 0,1%. Como sonda para el ADN que codifica las variantes y se hibrida con el gen *talB*, puede utilizarse asimismo una secuencia parcial de la secuencia nucleotídica de SEC ID nº:1. Dicha sonda puede prepararse mediante PCR, utilizando oligonucleótidos que se basan en la secuencia nucleotídica de SEC ID nº:1 como cebadores, y un fragmento de ADN que contiene la secuencia nucleotídica de SEC ID nº:1 como una matriz. Cuando un fragmento de ADN de 300 pares de bases aproximadamente de longitud se utiliza como sonda, las condiciones de lavado para la hibridación, pueden ser, por ejemplo, de 50°C, 2 x SSC, y SDS al 0,1%.

La transformación de la bacteria con un ADN que codifique una proteína, significa la introducción del ADN en una bacteria, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales, para aumentar la expresión del gen que codifica la proteína de la presente invención, y para aumentar la actividad de la proteína en la bacteria.

La bacteria de la presente invención incluye también una en la que la actividad de la proteína de la presente invención es aumentada mediante la transformación de dicha bacteria con ADN que codifica una proteína según se define en (A) o (B), o alterando una secuencia reguladora de la expresión de dicho ADN en el cromosoma de la bacteria.

El ADN que se utiliza para la modificación de la bacteria de la presente invención codifica una proteína que posee una actividad transaldolásica. Más específicamente, el ADN puede ser el gen *talB*. El gen *talB* puede obtenerse, por ejemplo, mediante PCR, utilizando cebadores que se basan en la secuencia nucleotídica representada en SEC ID nº:1.

Los procedimientos de aumento de la expresión génica incluyen el aumento del número de copias génicas. La introducción de un gen en un vector que pueda funcionar en una bacteria que pertenezca al género *Escherichia coli*, aumenta el número de copias del gen. Se utilizan preferentemente vectores multicopia, e incluyen pBR322, pUC19, pBluescript KS⁺, pACYC177, pACYC184, pAYC32, pMW119, pET22b, y similares. El aumento de la expresión génica puede alcanzarse introduciendo copias múltiples del gen en un cromosoma bacteriano, mediante, por ejemplo, procedimientos de recombinación homóloga y similares.

Alternativamente, el aumento de la expresión génica puede obtenerse situando el ADN de la presente invención bajo el control de un promotor más potente que el promotor natural. La intensidad de un promotor se define por la frecuencia de las acciones de iniciación de la síntesis del ARN. Los procedimientos para la evaluación de la intensidad de un promotor y los ejemplos de promotores potentes se describen por Deuschle, U., Kammerer, W., Gentz, R., Bujard, H., (Promoters in *Escherichia coli*: a hierarchy of *in vivo* strength indicates alternate structures. EMBO J. 1986, 5, 2987-2994). Por ejemplo, es conocido que el promotor P_R es un potente promotor constitutivo. Otros conocidos promotores potentes son el promotor P_L del fago lambda, el promotor *lac*, el promotor *trp*, el promotor *trc*, y similares.

El aumento de la traducción puede alcanzarse introduciendo una secuencia Shine-Dalgarno más eficiente en lugar de la secuencia original SD en el ADN de la presente invención. La secuencia SD es una región que se encuentra por encima del codón de iniciación del ARNm que interacciona con el 16S ARN del ribosoma (Shine J. y Dalgarno L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4, 1342-6).

La utilización de promotores potentes puede combinarse con la multiplicación de copias génicas.

Los procedimientos para la preparación del ADN cromosómico, hibridación, PCR, preparación del ADN plasmídico, digestión y unión del ADN, transformación, selección de un oligonucleótido como un cebador y similares, incluyen los procedimientos típicos bien conocidos por los expertos en la materia. Dichos procedimientos se describen en Sambrook, J., y Russell D., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Third Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) y similares.

La bacteria de la presente invención puede obtenerse introduciendo los ADN mencionados anteriormente en una bacteria que posee inherentemente la capacidad para producir L-histidina. Alternativamente, la bacteria de la presente invención puede obtenerse impartiendo la capacidad de producir L-histidina en la bacteria que ya contiene los ADN.

Como cepas parentales en las que se va a aumentar la actividad de la proteína de la presente invención, están comprendidas las bacterias que pertenecen al género *Escherichia* que poseen capacidad para producir L-histidina, las cepas de bacterias que producen L-histidina pertenecientes al género *Escherichia* tales como la cepa 24 de *E. coli* (VKPM B-5945, patente rusa 2003677); cepa 80 de *E. coli* (VKPM B-7270, patente rusa 2119536); cepas NRRL B-12116-B12121 de *E. coli* (patente US nº 4.388.405); cepas H-9342 (FERM BP-6675) y H-9343 (FERM BP-6676) de *E. coli* (patente US nº 6.344.347); cepa H-9341 (FERM BP-6674) de *E. coli* (solicitud de patente europea 1 085 087 A2); cepa A180/pFM201 de *E. coli* (patente US nº 6.258.554) y similares.

Es deseable que la bacteria que produce L-histidina se modifique ulteriormente para que adquiera un aumento de la expresión de los genes de la biosíntesis de la L-histidina. Los genes efectivos para la biosíntesis de la L-histidina incluyen el gen *hisG* y los genes del operón *hisBHAFI*. Resulta preferido el gen *hisG*, que codifica una ATP fosforibosil transferasa, el cual gen es desensibilizado mediante inhibición retroactiva por la L-histidina (patentes rusas 2003677 y 2119536).

El procedimiento de la presente invención incluye la producción de L-histidina, que comprende las etapas de cultivo de la bacteria de la presente invención en un medio de cultivo, que permite que se obtenga la L-histidina, y la recuperación de la L-histidina acumulada a partir del medio de cultivo.

En la presente invención, el cultivo, recuperación y purificación de la L-histidina a partir del medio y similares, puede llevarse a cabo mediante procedimientos de fermentación convencionales para la producción de un aminoácido, utilizando un microorganismo.

5 Un medio utilizado para el cultivo puede ser, bien un medio sintético o un medio natural, siempre que el medio incluya una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno y minerales y, si es necesario, las cantidades apropiadas de nutrientes que el microorganismo necesita para el crecimiento.

10 La fuente de carbono puede incluir diversos hidratos de carbono tales como glucosa y sacarosa, y varios ácidos orgánicos. Dependiendo del modo de asimilación de los microorganismos utilizados, puede utilizarse el alcohol, incluyendo el etanol y el glicerol.

15 Como fuente de nitrógeno, se utilizan varias sales amónicas tales como sulfato amónico y amoníaco, otros compuestos nitrogenados tales como aminas, una fuente natural de nitrógeno tal como peptona, hidrolizado de soja y microorganismos fermentativos digeridos.

20 Como minerales, se utilizan monofosfato potásico, sulfato magnésico, cloruro sódico, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, cloruro cálcico, y similares. Pueden añadirse al medio, si es necesario, algunos nutrientes adicionales. Por ejemplo, si el microorganismo requiere prolina para el crecimiento (auxotrofia prolínica), puede añadirse al medio para el cultivo, la cantidad suficiente de prolina.

25 El cultivo se lleva a cabo preferentemente bajo condiciones aeróbicas tales como un cultivo al que se proporciona agitación y aireación, a una temperatura de entre 20 y 42°C, preferentemente entre 37 y 40°C. El pH del cultivo se encuentra habitualmente entre 5 y 9, preferentemente entre 6,5 y 7,2. El pH del cultivo puede ajustarse con amoníaco, carbonato cálcico, varios ácidos, varias bases y tampones. Habitualmente, un cultivo de entre 1 y 5 días conduce a una acumulación del L-aminoácido diana en el medio líquido.

30 Después del cultivo, sólidos tales como células pueden eliminarse del medio líquido mediante centrifugación o filtración de membrana, y entonces, el L-aminoácido diana puede recuperarse y purificarse mediante procedimientos de intercambio iónico, concentración y cristalización.

Ejemplos

35 La presente invención se explicará con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos siguientes. En los ejemplos, un aminoácido presenta la configuración L, si no se indica lo contrario.

Ejemplo 1: Clonación del gen *talB* de *E. coli*

40 Se ha informado de la secuencia nucleotídica completa de la cepa K-12 de *E. coli* (Science, 277, 1453-1474, 1997). Basándose en la secuencia nucleotídica de la que se ha informado, se sintetizaron los cebadores representados en SEC ID nº 3 (cebador 1) y nº 4 (cebador 2). El cebador 1 es una secuencia de entre 74 a 54 pares de bases situada por encima del codón de iniciación del gen *talB*, con el sitio enzimático de restricción de reconocimiento *Bgl*III que se introduce en su extremo 5'. El cebador 2 es una secuencia complementaria a una secuencia de entre 82 a 104 pares de bases que se sitúa por debajo del codón de finalización del gen *talB*, con el sitio enzimático de restricción de reconocimiento *Xba*I que se introduce en su extremo 5'.

50 El ADN cromosómico de *E. coli* K12 que se utilizó como matriz para la PCR, se preparó mediante un procedimiento ordinario. La PCR se llevó a cabo según el "Sistema 2400 PCR de amplificación génica de Applied Biosystems", bajo las condiciones siguientes: desnaturalización inicial del ADN a 95°C durante 5 minutos; entonces, se llevaron a cabo 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, realizando la hibridación a 56°C durante 60 segundos, y el alargamiento a 72°C durante 120 segundos; y entonces, la polimerización final durante 7 minutos a 72°C utilizando la *Taq* polimerasa (Fermentas, Lituania). El fragmento PCR obtenido que contenía el gen *talB* sin promotor, se trató con *Bgl*III y *Xba*I y se insertó bajo el control del promotor P_R en el vector pMW119-P_R que había sido tratado previamente con las mismas enzimas. El vector pMW119-P_R fue construido a partir del vector pMW119 disponible comercialmente, insertando un promotor P_R del fago λ. De esta forma, se obtuvo el plásmido pMW-P_R-*talB*.

Ejemplo 2: Efecto de la expresión aumentada del gen *talB* en la producción de histidina.

60 La cepa 80 de *E. coli* productora de histidina se utilizó como cepa parental para la transformación con el plásmido pMW-P_R-*talB*. La cepa 80 se ha descrito en la patente rusa 2119536 y se ha depositado en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (Rusia, 113545 Moscú, 1st Dorozhny proezd, 1), el 15 de octubre de 1999, con el número de registro VKPM B-7270. Entonces, se transfirió a un depósito internacional el 12 de julio de 2004, según lo estipulado por el Tratado de Budapest.

Ambas cepas, la 80 y la 80/pMW-P_R-talB se cultivaron en un medio líquido L con 1 g/l de estreptomicina durante 6 horas a 29°C. Entonces, 0,1 ml del cultivo obtenido, se inocularon en 2 ml de medio de fermentación en un tubo de ensayo de 20 x 200 mm, cultivándose durante 65 horas a 29°C con un agitador rotatorio (350 rpm). Después del cultivo, se determinó la cantidad de histidina que se había acumulado en el medio, mediante cromatografía en papel. El papel se reveló con una fase móvil: n-butanol:ácido acético:agua=4:1:1 (vol/vol). Se utilizó una solución de ninhidrina (0,5%) en acetona como reactivo de visualización.

La composición del medio de fermentación (pH 6,0) (g/l):

10	Glucosa	100,0
	Mameno	0,2 de TN
	(hidrolizado proteico de soja)	
	L-prolina	1,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	25,0
15	KH ₂ PO ₄	2,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
	MnSO ₄	0,01
	Tiamina	0,001
20	Betaína	2,0
	CaCO ₃	60,0
	Estreptomicina	1,0

Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 1

25 Tabla 1

Cepa de <i>E. coli</i>	OD ₄₅₀	Cantidad de histidina, g/l
80 (VKPM B-7270)	27,5	16,2
80/pMW-P _R -talB	28,2	19,1

30 A partir de la Tabla 1 puede apreciarse que el aumento de la expresión del gen *talB* mejoró la producción de la histidina por la cepa 80 de *E. coli*.

Aplicabilidad industrial

35 Según la presente invención, puede aumentarse la productividad en fermentación de la L-histidina.

Listado de secuencias

<110> Ajinomoto Co., Inc.

40 <120> PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE L-HISTIDINA UTILIZANDO BACTERIAS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIÁCEAS

<130> C1760PC4093

45 <140>
<141> 2004-07-16

<150> RU2003121600
<151> 2003-07-16

50 <160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

55 <210> 1
<211> 954
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

60 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(954)

<400> 1

atg acg gac aaa ttg acc tcc ctt cgt cag tac acc acc gta gtg gcc 48
 Met Thr Asp Lys Leu Thr Ser Leu Arg Gln Tyr Thr Thr Val Val Ala
 1 5 10 15

gac act ggg gac atc gcg gca atg aag ctg tat caa ccg cag gat gcc 96
 Asp Thr Gly Asp Ile Ala Ala Met Lys Leu Tyr Gln Pro Gln Asp Ala
 20 25 30

aca acc aac cct tct ctc att ctt aac gca gcg cag att ccg gaa tac 144
 Thr Thr Asn Pro Ser Leu Ile Leu Asn Ala Ala Gln Ile Pro Glu Tyr
 35 40 45

cgt aag ttg att gat gat gct gtc gcc igg gcg aaa cag cag agc aac 192
 Arg Lys Leu Ile Asp Asp Ala Val Ala Trp Ala Lys Gln Gln Ser Asn
 50 55 60

gat cgc gcg cag cag atc gtg gac gcg acc gac aaa ctg gca gta aat 240
 Asp Arg Ala Gln Gln Ile Val Asp Ala Thr Asp Lys Leu Ala Val Asn
 65 70 75 80

att ggt ctg gaa atc ctg aaa ctg gtt ccg ggc cgt atc tca act gaa 288
 Ile Gly Leu Glu Ile Leu Lys Leu Val Pro Gly Arg Ile Ser Thr Glu
 85 90 95

gtt gat gcg cgt ctt tcc tat gac acc gaa gcg tca att gcg aaa gca 336
 Val Asp Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Thr Glu Ala Ser Ile Ala Lys Ala
 100 105 110

aaa cgc ctg atc aaa ctc tac aac gat gct ggt att agc aac gat cgt 384
 Lys Arg Leu Ile Lys Leu Tyr Asn Asp Ala Gly Ile Ser Asn Asp Arg
 115 120 125

att ctg atc aaa ctg gct tct acc tgg cag ggt atc cgt gct gca gaa 432
 Ile Leu Ile Lys Leu Ala Ser Thr Trp Gln Gly Ile Arg Ala Ala Glu
 130 135 140

cag ctg gaa aaa gaa ggc atc aac tgt aac ctg acc ctg ctg ttc tcc 480
 Gln Leu Glu Lys Glu Gly Ile Asn Cys Asn Leu Thr Leu Leu Phe Ser
 145 150 155 160

ttc gct cag gct cgt gct tgt gcg gaa gcg ggc gtg ttc ctg atc tcg 528
 Phe Ala Gln Ala Arg Ala Cys Ala Glu Ala Gly Val Phe Leu Ile Ser
 165 170 175

ccg ttt gtt ggc cgt att ctt gac tgg tac aaa gcg aat acc gat aag 576
 Pro Phe Val Gly Arg Ile Leu Asp Trp Tyr Lys Ala Asn Thr Asp Lys
 180 185 190

aaa gag tac gct ccg gca gaa gat ccg ggc gtg gtt tct gta tct gaa 624
 Lys Glu Tyr Ala Pro Ala Glu Asp Pro Gly Val Val Ser Val Ser Glu
 195 200 205

atc tac cag tac tac aaa gag cac ggt tat gaa acc gtg gtt atg ggc 672
 Ile Tyr Gln Tyr Tyr Lys Glu His Gly Tyr Glu Thr Val Val Met Gly
 210 215 220

gca agc ttc cgt aac atc ggc gaa att ctg gaa ctg gca ggc tgc gac 720
 Ala Ser Phe Arg Asn Ile Gly Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Cys Asp
 225 230 235 240

cgt ctg acc atc gca ccg gca ctg ctg aaa gag ctg gcg gag agc gaa 768
 Arg Leu Thr Ile Ala Pro Ala Leu Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ser Glu
 245 250 255

ggg gct atc gaa cgt aaa ctg tct tac acc ggc gaa gtg aaa gcg cgt 816
 Gly Ala Ile Glu Arg Lys Leu Ser Tyr Thr Gly Glu Val Lys Ala Arg
 260 265 270

ccg gcg cgt atc act gag tcc gag ttc ctg tgg cag cac aac cag gat 864
 Pro Ala Arg Ile Thr Glu Ser Glu Phe Leu Trp Gln His Asn Gln Asp
 275 280 285

cca atg gca gta gat aaa ctg gcg gaa ggt atc cgt aag ttt gct att 912
 Pro Met Ala Val Asp Lys Leu Ala Glu Gly Ile Arg Lys Phe Ala Ile
 290 295 300

gac cag gaa aaa ctg gaa aaa atg atc ggc gat ctg ctg taa 954
 Asp Gln Glu Lys Leu Glu Lys Met Ile Gly Asp Leu Leu
 305 310 315

- 5 <210> 2
- <211> 317
- <212> PRT
- <213> *Escherichia coli*

10 <400> 2

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

Ile Tyr Gln Tyr Tyr Lys Glu His Gly Tyr Glu Thr Val Val Met Gly
 210 215 220
 Ala Ser Phe Arg Asn Ile Gly Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Cys Asp
 225 230 235 240
 Arg Leu Thr Ile Ala Pro Ala Leu Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ser Glu
 245 250 255
 Gly Ala Ile Glu Arg Lys Leu Ser Tyr Thr Gly Glu Val Lys Ala Arg
 260 265 270
 Pro Ala Arg Ile Thr Glu Ser Glu Phe Leu Trp Gln His Asn Gln Asp
 275 280 285
 Pro Met Ala Val Asp Lys Leu Ala Glu Gly Ile Arg Lys Phe Ala Ile
 290 295 300
 Asp Gln Glu Lys Leu Glu Lys Met Ile Gly Asp Leu Leu
 305 310 315

- 5 <210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 3
 ctcagatctg acgttgcgtc gtgatatca 29
- 15 <210> 4
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 4
- 25 ctctctagac cgtttaaaca gtctcgtaa a 31
- 30 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
 <400> 5
 cgcgcttcaa atgaaacaga t 21

REIVINDICACIONES

1. Bacteria productora de L-histidina de la familia Enterobacteriáceas, en la que la bacteria ha sido modificada de manera que la actividad enzimática transaldolásica por célula sea superior a la de una cepa no modificada aumentando el número de copias de dicho gen de la transaldolasa o reemplazando el promotor natural del gen de la transaldolasa por un promotor más potente, en la que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína seleccionada de entre el grupo constituido por:
- 5
- (A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID. nº:2; y
- 10
- (B) la proteína de (A) que comprende deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de 1 a 30 aminoácidos en la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2 y que presenta una actividad enzimática transaldolásica,
- 15
- en la que dicha bacteria presenta una expresión aumentada de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por los genes *hisG*, *hisB*, *hisH*, *hisA*, *hisF* y *hisI*.
2. Bacteria productora de L-histidina de la familia Enterobacteriáceas, en la que la bacteria ha sido modificada de manera que la actividad enzimática transaldolásica por célula sea superior a la de una cepa no modificada aumentando el número de copias de dicho gen de la transaldolasa o reemplazando el promotor natural del gen de la transaldolasa por un promotor más potente, en la que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína seleccionada de entre el grupo constituido por:
- 20
- (A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID. nº:2; y
- 25
- (B) la proteína de (A) que comprende deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de 1 a 30 aminoácidos en la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2 y que presenta actividad enzimática transaldolásica,
- 30
- en la que dicha bacteria presenta una expresión aumentada de un gen de la ATP fosforibosiltransferasa de la *Escherichia coli*.
3. Bacteria según la reivindicación 2, en la que dicho gen de la ATP fosforibosiltransferasa es desensibilizado a la retroinhibición por la L-histidina.
- 35
4. Procedimiento para producir L-histidina, que comprende el cultivo de una bacteria productora de L-histidina de la familia Enterobacteriáceas en un medio de cultivo, y la recogida a partir del medio de cultivo de la L-histidina acumulada, en el que la bacteria se ha modificado de manera que la actividad enzimática transaldolásica por célula sea superior a la de una cepa no modificada aumentando el número de copias de dicho gen de la transaldolasa o reemplazando el promotor natural del gen de la transaldolasa por un promotor más potente, en el que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína seleccionada de entre el grupo constituido por:
- 40
- (A) una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID. nº:2; y
- 45
- (B) la proteína de (A) que comprende deleciones, sustituciones, inserciones o adiciones de 1 a 30 aminoácidos en la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2 y que presenta actividad enzimática transaldolásica.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína que presenta una identidad de 95% o más con la secuencia aminoácida de SEC. ID. nº:2, y presenta una actividad enzimática transaldolásica.
- 50
6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho gen de la transaldolasa codifica una proteína que comprende la secuencia aminoácida representada en SEC. ID nº:2.
- 55
7. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho gen de la transaldolasa comprende una secuencia nucleotídica de los nucleótidos 1 a 954 en SEC ID nº:1.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en el que dicha bacteria pertenece al género *Escherichia*.
- 60
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha bacteria es la *Escherichia coli*.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el número de copias del gen de la transaldolasa es aumentado mediante la transformación de dicha bacteria con un vector multicopia que contiene dicho gen de la transaldolasa.
- 65
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que dicha bacteria presenta una expresión aumentada de por lo menos un gen seleccionado de entre el grupo constituido por los genes *hisG*, *hisB*, *hisH*, *hisA*,

hisF y *hisI*.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en el que dicha bacteria presenta una expresión aumentada de un gen de la ATP fosforibosiltransferasa de la *Escherichia coli*.

5 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicho gen de la ATP fosforibosiltransferasa es desensibilizado a la retroinhibición por la L-histidina.