

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 825**

51 Int. Cl.:

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04801656 .2**

96 Fecha de presentación: **03.12.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1689876**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54

Título: **Bacteria productora de L-treonina que pertenece al género Escherichia y método para producir L-treonina**

30

Prioridad:

05.12.2003 RU 2003135292

09.07.2004 US 586222 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

14.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

14.12.2012

73

Titular/es:

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

72

Inventor/es:

AKHVERDIAN, VALERY ZAVENOVICH;
SAVRASOVA, EKATERINA ALEKSEEVNA;
KAPLAN, ALLA MARKOVNA;
LOBANOV, ANDREY OLEGOVICH y
KOZLOV, YURI IVANOVICH

74

Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 392 825 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

Bacteria productora de L-treonina que pertenece al género *escherichia* y método para producir L-treonina

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un método para producir una L-treonina mediante fermentación, y más específicamente a un gen derivado de *Escherichia coli* que ayuda en esta fermentación. El gen es útil para la mejora de la producción de L-treonina.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 Convencionalmente, se producen L-aminoácidos a escala industrial mediante métodos de fermentación utilizando cepas de microorganismos obtenidos de fuentes naturales o mutantes de los mismos, que se modifican para potenciar los rendimientos de producción de L-aminoácidos.

15 Se han notificado muchas técnicas para potenciar los rendimientos de producción de L-aminoácidos, incluyendo la transformación de microorganismos con ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.278.765). Otras técnicas para potenciar los rendimientos de producción incluyen aumentar las actividades de enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos y/o desensibilizar las enzimas diana de la inhibición por retroalimentación mediante el L-aminoácido resultante (véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/16042 o las patentes estadounidenses n.ºs 4.346.170, 5.661.012 y 6.040.160).

20 Se conocen cepas útiles en la producción de L-treonina mediante fermentación, incluyendo cepas con actividades aumentadas de enzimas implicadas en la biosíntesis de L-treonina (patentes estadounidenses 5.175.107; 5.661.012; 5.705.371; 5.939.307; EP0219027), cepas resistentes a productos químicos tales como L-treonina y sus análogos (documentos WO0114525A1, EP301572A2, US 5.376.538), cepas con enzimas diana desensibilizadas para la inhibición por retroalimentación mediante el L-aminoácido producido o sus subproductos (patentes estadounidenses 5.175.107; 5.661.012), y cepas con enzimas de degradación de treonina inactivadas (patentes estadounidenses 5.939.307; 6.297.031).

25 La cepa productora de treonina VKPM B-3996 conocida (patentes estadounidenses 5.175.107 y 5.705.371) es la mejor productora de treonina conocida en la actualidad. Para la construcción de la cepa VKPM B-3996, se introdujeron varias mutaciones y un plásmido, descritos a continuación, en la cepa original K-12 de *E. coli* (VKPM B-7). El gen *thrA* mutante (mutación *thrA442*) codifica para aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I, que es resistente a la inhibición por retroalimentación mediante treonina. El gen *ilvA* mutante (mutación *ilvA442*) codifica para treonina desaminasa que tiene actividad disminuida que da como resultado una tasa disminuida de biosíntesis de isoleucina y un fenotipo rezumante de carencia de isoleucina. En bacterias que contienen la mutación *ilvA442*, la transcripción del operón *thrABC* no se reprime por la isoleucina, y por tanto es muy eficaz para la producción de treonina. La inactivación del gen *tdh* da como resultado la prevención de la degradación de la treonina. Se transfirió el determinante genético de asimilación de sacarosa (genes *scrKYABR*) a dicha cepa. Para aumentar la expresión de los genes que controlan la biosíntesis de treonina, se introdujo el plásmido pVIC40 que contienen el operón *thrA442BC* de treonina mutante en la cepa intermedia TDH6. La cantidad de L-treonina acumulada durante la fermentación de la cepa puede ser de hasta 85 g/l.

35 Los presentes inventores obtuvieron, con respecto a *E. coli* K-12, un mutante, *thrR* (denominado en el presente documento *rhtA23*) que tiene resistencia a altas concentraciones de treonina u homoserina en medios mínimos (Asturova, O.B. *et al.*, Appl. Bioch. and Microbiol., 21, 611-616 (1985)). La mutación dio como resultado la mejora en la producción de L-treonina (patente SU n.º 974817), homoserina, y glutamato (Asturova, O.B. *et al.*, Appl. Bioch. and Microbiol., 27, 556-561, 1991, documento EP 1013765 A) mediante la respectiva cepa productora de *E. coli*, tal como la cepa VKPM B-3996. Además, los presentes inventores han revelado que el gen *rhtA* existe a 18 min sobre el cromosoma de *E. coli* cerca del operón *glnHPQ* que codifica para componentes del sistema de transporte de la glutamina, y que el gen *rhtA* es idéntico a ORF1 (gen *ybiF*, números 764 a 1651 en el número de registro de GenBank AAA218541, gi:440181), ubicado entre los genes *pexB* y *ompX*. La unidad que expresa una proteína codificada por el ORF1 se ha designado como gen *rhtA* (*rht*: resistencia a homoserina y treonina). Además, los presentes inventores han encontrado que la mutación *rhtA23* es una sustitución de A por G en la posición -1 con respecto al codón de iniciación ATG (RESÚMENES del 17º Congreso Internacional de Bioquímica y Biología Molecular en combinación con el Encuentro Anual de 1997 de la American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California 24-29 de agosto de 1997, resumen n.º 457, documento EP 1013765 A).

40 En condiciones de optimización de la ruta biosintética de treonina principal, puede lograrse una mejora adicional de las cepas productoras de treonina complementando la bacteria con cantidades crecientes de precursores distantes de treonina, tales como aspartato.

55 Se sabe que el aspartato es un donante de carbono para la síntesis de los aminoácidos de la familia del aspartato (treonina, metionina, lisina) y diaminopimelato, un compuesto constituyente de la pared celular bacteriana. Estas síntesis se realizan mediante una ruta compleja que tiene varios puntos de ramificación y un esquema regulador extremadamente sensible. En los puntos de ramificación (aspartato, aspartato semialdehído, homoserina), existen

5 tantas isoenzimas como aminoácidos que se derivan de esta etapa biosintética. La aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I codificada por parte del operón *thrABC* provoca las reacciones primera y tercera de la biosíntesis de treonina. La treonina e isoleucina regulan la expresión de aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I, y la treonina inhibe ambas actividades para catalizar las reacciones descritas anteriormente (*Escherichia coli* and *Salmonella*, segunda edición, Editor Líder: F.C.Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

10 El gen *asd* codifica para aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa (Asd; EC 1.2.1.11), que es una enzima clave en las rutas biosintéticas para lisina, metionina, treonina y diaminopimelato. La aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa convierte de manera reversible L-aspartil-4-P en L-aspartato semialdehído junto con la reducción de NADP. Se da a conocer el efecto de la amplificación del gen *asd* en la producción de L-lisina, un aminoácido de la familia del aspartato, mediante la cepa de *E. coli* (patente estadounidense 6.040.160). También se ha dado a conocer que la aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa podría ser útil para la producción de L-lisina, L-treonina y L-isoleucina mediante bacterias corineformes (documento EP 0219027 A).

Sin embargo, no se han notificado hasta la fecha el uso de una bacteria que pertenezca al género *Escherichia* con actividad aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa potenciada para la producción de L-treonina.

15 SUMARIO DE LA INVENCION

Un objeto de presente invención es potenciar la productividad de cepas productoras de L-treonina y proporcionar un método para producir L-treonina usando estas cepas.

20 Este objetivo se logró mediante el hallazgo de que el gen *asd* que codifica para aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa clonado en un vector de bajo número de copias potencia la producción de L-treonina. Por tanto, se ha completado la presente invención.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para producir L-treonina que comprende cultivar una bacteria productora de L-treonina que pertenece a *Escherichia coli* en el que dicha bacteria se ha modificado para potenciar una actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa, tal como se define en la reivindicación 1.

25 La actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa se potencia aumentando la expresión del gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa.

Dicha actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa se potencia en una realización aumentando el número de copias del gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar la bacteria tal como se describió anteriormente, en la que el número de copias se aumenta mediante la transformación de la bacteria con un vector que contiene el gen.

30 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar la bacteria tal como se describió anteriormente, en la que el gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa se deriva de una bacteria que pertenece al género *Escherichia*.

35 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar la bacteria tal como se describió anteriormente, en la que dicho gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Es un aspecto de referencia proporcionar la bacteria tal como se describió anteriormente, en la que el gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa comprende un ADN seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1 a 1196 en SEQ ID NO: 1; y

40 (b) un ADN que puede hibridarse con una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1-1196 en SEQ ID NO: 1, o una sonda que puede prepararse a partir de dicha secuencia de nucleótidos en condiciones rigurosas, y codifica para una proteína que tiene una actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa.

Dichas condiciones rigurosas comprenden aquellas en las que se realiza el lavado a 60°C a una concentración salina de 1 x SSC y SDS al 0,1%, y durante 15 minutos.

45 La bacteria tal como se describió anteriormente se ha modificado adicionalmente para potenciar la expresión de los siguientes genes.

- el gen *thrA* mutante que codifica para aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I y es resistente a la inhibición por retroalimentación mediante treonina;

- el gen *thrB* que codifica para homoserina cinasa;

- el gen *thrC* que codifica para treonina sintasa; y

50 - el gen *rhtA* que codifica para una supuesta proteína transmembrana.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar la bacteria tal como se describió anteriormente, en la que dicha bacteria se ha modificado para aumentar la expresión de dicho gen *thrA* mutante, dicho gen *thrB*, dicho gen *thrC* y dicho gen *rhtA*, tal como se describe en la reivindicación 1.

5 Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método para producir L-treonina que comprende cultivar la bacteria tal como se describió anteriormente en un medio de cultivo para provocar la acumulación de L-treonina en el medio de cultivo, y recoger la L-treonina del medio de cultivo.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

10 En la presente descripción, "bacteria productora de L-treonina" significa una bacteria que tiene la capacidad de provocar la acumulación de L-treonina en un medio cuando se cultiva la bacteria en el medio. La capacidad de producir L-treonina puede conferirse o potenciarse mediante mejora genética. La expresión "bacteria productora de L-treonina" tal como se usa en el presente documento también significa una bacteria que puede producir y provocar la acumulación de L-treonina en un medio de cultivo en una mayor cantidad que una cepa de tipo natural u original de *E. coli*, tal como la cepa K-12 de *E. coli*.

15 La expresión "una bacteria que pertenece al género *Escherichia*" significa que la bacteria se clasifica en el género *Escherichia* según la clasificación conocida por un experto en la técnica de microbiología. El microorganismo que pertenece al género *Escherichia* tal como se usa en la presente invención es *Escherichia coli* (*E. coli*).

20 La expresión "actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa" significa una actividad que cataliza la reducción dependiente de sustrato reversible de NADP en presencia de fosfato o arsenato. La actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa puede medirse mediante el método descrito mediante, por ejemplo, Preiss, J. *et al* (Curr. Microbiol., 7: 263-268 (1982)).

25 La expresión "modificada para potenciar una actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa" significa que la actividad por célula es superior a la de una cepa no modificada, por ejemplo, una cepa de tipo natural. Se definen ejemplos de tales modificaciones en la reivindicación 1. Además, una cepa de tipo natural que puede usarse para fines de comparación incluye, por ejemplo, *Escherichia coli* K-12. Como resultado de la potenciación de la actividad intracelular de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa, la cantidad de acumulación de L-treonina en el medio aumenta.

La potenciación de la actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa en una célula bacteriana se logra mediante la potenciación de la expresión de un gen que codifica para aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa.

30 Como gen que codifica para aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa de *Escherichia coli*, ya se ha dilucidado el gen *asd* (nucleótidos números 3572511 a 3571408 en la secuencia de número de registro de GenBank NC000913.1, gi: 16131307). Por tanto, el gen *asd* puede obtenerse mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa; referencia a White, T.J. *et al.*, Trends Genet., 5, 185 (1989)) utilizando cebadores preparados basándose en la secuencia de nucleótidos del gen. Los genes que codifican para la aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa de otros microorganismos pueden obtenerse de manera similar.

35 El gen *asd* derivado de *Escherichia coli* se muestra a modo de ejemplo mediante un ADN que codifica para la siguiente proteína (A)

(A) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.

40 "Transformación de una bacteria con ADN que codifica para una proteína" significa la introducción del ADN en una bacteria, por ejemplo, mediante métodos convencionales. La transformación de este ADN dará como resultado un aumento en la expresión del gen que codifica para la proteína de la presente invención, y potenciará la actividad de la proteína en la célula bacteriana.

45 Los métodos de potenciación de la expresión génica incluyen en una realización aumentar el número de copias del gen. La introducción de un gen en un vector que puede funcionar en una bacteria que pertenece al género *Escherichia* aumenta el número de copias del gen. Preferiblemente, se usan vectores de bajo número de copias. Los ejemplos de vectores de bajo número de copias incluyen pero no se limitan a pSC101, pMW118, pMW119 y similares. El término "vector de bajo número de copias" se usa para vectores cuyo número de copias es de hasta 5 copias por célula. Los métodos de transformación incluyen cualquier método conocido que se haya notificado hasta la fecha. Por ejemplo, se ha notificado un método de tratamiento de células receptoras con cloruro de calcio de modo que aumente la permeabilidad de las células al ADN para *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. e Higa, A., J. Mol. Biol, 53, 159 (1970)) y puede usarse.

50 La potenciación de la expresión génica también puede lograrse mediante la introducción de múltiples copias del gen en un cromosoma bacteriano mediante, por ejemplo, un método de recombinación homóloga, integración de Mu o similares. Por ejemplo, un acto de integración de Mu permite introducir en el cromosoma bacteriano hasta 3 copias del gen.

La potenciación de la expresión génica también puede lograrse según otra realización colocando el ADN de la presente invención bajo el control de un promotor potente, concretamente el promotor *lac*, el promotor *trp*, el promotor *trc*, y los promotores P_R y P_L del fago lambda que se sabe que son promotores potentes. El uso de un promotor potente puede combinarse con la multiplicación de las copias de los genes.

5 En un aspecto de referencia, el efecto de un promotor puede potenciarse mediante, por ejemplo, la introducción de una mutación en el promotor para aumentar el nivel de transcripción de un gen ubicado en el sentido de 3' del promotor. Además, se sabe que la sustitución de varios nucleótidos en el espaciador entre el sitio de unión al ribosoma (RBS) y el codón de iniciación, especialmente las secuencias inmediatamente en el sentido de 5' del codón de iniciación, afectan profundamente a la capacidad de traducción del ARNm. Por ejemplo, se encontró un intervalo de 20 veces en los niveles de expresión, dependiendo de la naturaleza de los tres nucleótidos que preceden al codón de iniciación (Gold *et al.*, Annu. Rev. Microbiol., 35, 365-403, 1981; Hui *et al.*, EMBO J., 3, 623-629, 1984). Previamente, se mostró que la mutación *rhtA23* es una sustitución de A por G en la posición -1 con respecto al codón de iniciación ATG (RESÚMENES del 17º Congreso Internacional de Bioquímica y Biología Molecular en combinación con la Reunión Anual de 1997 de la American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California 24-29 de agosto de 1997, resumen n.º 457). Por tanto, puede sugerirse que la mutación *rhtA23* potencia la expresión del gen *rhtA* y, como consecuencia, aumenta la resistencia a treonina, homoserina y algunas otras sustancias transportadas fuera de las células.

20 En un aspecto de referencia adicional, también es posible introducir una sustitución de nucleótido en una región promotora del gen de aspartato-□-semialdehído deshidrogenasa en el cromosoma bacteriano dando como resultado una función promotora más fuerte. Puede realizarse la alteración de la secuencia de control de la expresión, por ejemplo, de la misma manera que la sustitución del gen usando un plásmido sensible a temperatura, tal como se da a conocer en la publicación internacional WO00/18935 y la publicación de patente japonesa n.º 1-215280.

25 El aumento del número de copias del gen de aspartato-□-semialdehído deshidrogenasa también puede lograrse introduciendo múltiples copias del gen de aspartato-□-semialdehído deshidrogenasa en el ADN cromosómico de la bacteria. Con el fin de introducir múltiples copias del gen de aspartato-□-semialdehído deshidrogenasa en el cromosoma bacteriano, se lleva a cabo recombinación homóloga usando una secuencia cuyas múltiples copias existen como dianas en el ADN cromosómico. Las secuencias que tienen múltiples copias en el ADN cromosómico incluyen, pero no se limitan a ADN repetitivo, o repeticiones invertidas que existen en el extremo de un elemento transponible. Además, tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 5.595.889, es posible incorporar el gen de aspartato-□-semialdehído deshidrogenasa en un transposón, y permitir que se transfiera para introducir múltiples copias del gen en el ADN cromosómico.

30 Los métodos para la preparación de ADN de plásmido incluyen, pero no se limitan a digestión y ligación de ADN, transformación, selección de un oligonucleótido como cebador y similar, u otros métodos bien conocidos por el experto en la técnica. Estos métodos se describen, por ejemplo, en Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, segunda edición", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

35 La bacteria de la presente invención puede obtenerse mediante la introducción de los ADN mencionados anteriormente en una bacteria que tiene inherentemente la capacidad para producir L-treonina. Alternativamente, la bacteria de la presente invención puede obtenerse confiriendo una capacidad para producir L-treonina a la bacteria que ya contiene los ADN.

40 Los ejemplos de cepas originales abarcadas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a las bacterias productoras de treonina que pertenece a *Escherichia coli* tales como la cepa TDH-6/pVIC40 de *E. coli* (VKPM B-3996) (patente estadounidense 5.175.107, patente estadounidense 5.705.371), cepa NRRL-21593 de *E. coli* (patente estadounidense 5.939.307), cepa FERM BP-3756 de *E. coli* (patente estadounidense 5.474.918), cepas FERM BP-3519 y FERM BP-3520 de *E. coli* (patente estadounidense 5.376.538), cepa MG442 de *E. coli* (Gusyatiner *et al.*, Genetika (en ruso), 14, 947-956 (1978)), cepas VL643 y VL2055 de *E. coli* (documento EP 1149911 A), y similares.

45 La cepa TDH-6 es deficiente en el gen *thrC*, así como es asimilativa de sacarosa, y el gen *ilvA* tiene una mutación rezumante. Esta cepa tiene una mutación en el gen *rhtA*, que confiere resistencia a altas concentraciones de treonina u homoserina. La cepa B-3996 contiene el plásmido pVIC40 que se había obtenido insertando el operón *thrA*BC* que incluye el gen *thrA* mutante que codifica para aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I que tiene inhibición por retroalimentación sustancialmente desensibilizada mediante treonina en el vector derivado de RSF1010. La cepa B-3996 se depositó el 19 de noviembre de 1987 en el All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 113105 Moscú, Federación Rusia) con el número de registro RIA 1867. La cepa también se depositó el 7 de abril de 1987 en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Dorozhny proezd. 1, Moscú 113545, Federación Rusa) con el número de registro B-3996.

55 La bacteria de la presente invención se modifica adicionalmente para potenciar la expresión de los siguientes genes así como el gen *asd*:

- el gen *thrA* mutante que codifica para aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I resistente a la inhibición por retroalimentación mediante treonina;

- el gen *thrB* que codifica para homoserina cinasa;
- el gen *thrC* que codifica para treonina sintasa.

La bacteria también se modifica para potenciar el gen *rhtA* que codifica para una supuesta proteína transmembrana además de la potenciación del gen *asd*.

5 El método para producir L-treonina de la presente invención incluye las etapas de cultivar la bacteria de la presente invención en un medio de cultivo, permitir que la L-treonina se acumule en el medio de cultivo y recoger L-treonina del medio de cultivo.

10 En la presente invención, el cultivo, la recogida y la purificación de la L-treonina del medio y similares puede realizarse de manera similar a métodos de fermentación convencionales en los que se produce L-treonina usando un microorganismo.

15 Un medio usado para el cultivo puede ser un medio o bien sintético o bien natural, siempre que el medio incluya una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno y minerales y, si es necesario, cantidades apropiadas de nutrientes que requiere el microorganismo para su crecimiento. La fuente de carbono puede incluir diversos hidratos de carbono tales como glucosa y sacarosa, y diversos ácidos orgánicos. Dependiendo del modo de asimilación del microorganismo elegido, puede usarse alcohol incluyendo etanol y glicerol. Como fuente de nitrógeno, se usan diversas sales de amonio tales como amoniaco y sulfato de amonio, otros compuestos de nitrógeno tales como aminas, una fuente de nitrógeno natural tal como peptona, hidrolizado de soja y microorganismo fermentativo digerido. Como minerales, se usan monofosfato de potasio, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, cloruro de calcio y similares. Como vitaminas, se usan tiamina, extracto de levadura y similares. Pueden añadirse nutrientes adicionales al medio, si es necesario. Por ejemplo, si el microorganismo requiere isoleucina para su crecimiento (auxotrofia de isoleucina), puede añadirse una cantidad suficiente de isoleucina al medio de cultivo.

20 El cultivo se realiza preferiblemente en condiciones aerobias tales como un cultivo con movimiento, y cultivo con agitación con aeración, a una temperatura de 20 a 40°C, preferiblemente de 30 a 38°C. El pH del cultivo es habitualmente de entre 5 y 9, preferiblemente entre 6,5 y 7,2. EL pH del cultivo puede ajustarse con amoniaco, carbonato de calcio, diversos ácidos, diversas bases y tampones. Habitualmente, un cultivo de 1 a 5 días conduce a la acumulación de L-treonina en el medio líquido.

25 Tras el cultivo, pueden retirarse los sólidos tales como células del medio líquido mediante centrifugación o filtración por membrana, y entonces puede recogerse la L-treonina y purificarse mediante métodos de intercambio iónico, concentración y cristalización.

30 Ejemplos

La presente invención se explicará más concretamente a continuación con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1: Clonación del gen *asd* de *E. coli* en el vector pM

35 Se clonó el gen *asd* de ADN cromosómico de la cepa de *E. coli* (K12 Mu cts62 Mud5005) (VKPM B- 6804) obtenida de la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Dorozhny proezd. 1, Moscú 113545, Federación Rusa). En primer lugar, se indujo el fago mini-Mu en la cepa de *E. coli* (K12 Mu cts62 Mud5005) (VKPM B-6804). Entonces, se usó el conjunto de derivados obtenidos de plásmidos pMud5005 que contenían partes del cromosoma para la transformación de la cepa SH 309 con *asd*. La cepa SH 309 (VKPM B-3899) obtenida de la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Dorozhny proezd. 1, Moscú 113545, Federación Rusa) tiene el siguiente fenotipo: F⁻araD139 rpsL150 deoC1 ptsF25 relA1 feb5301 rbsR ugpA704::Tn10 Del (argF - lac) U169 Del (mal - *asd*) Tet^R Str^R. La cepa *asd*⁻ SH 309 no puede crecer en medio L y requiere ácido diaminopimelínico (DAPA) para su crecimiento. Se seleccionaron los clones SH 309 *asd*⁺ que albergaban el plásmido pMud5005-*asd* en el medio L. Se aisló el plásmido pMud5005-*asd* y se clonó de nuevo el fragmento de ADN de *Bam*HI-*Pst*I (1646 pb) que contenía el gen *asd* en el plásmido pMW119 previamente modificado para sustituir el promotor P_{lac} por el promotor P_R. Por tanto, se construyó el plásmido pMW-*asd* que contenía el gen *asd* bajo el control del promotor P_R. El plásmido pMW-*asd* es compatible con el plásmido pVIC40 (replicón pRSF1010), por tanto los dos plásmidos pVIC40 y pMW-*asd* podían mantenerse en las bacterias simultáneamente.

45 Se introdujo el plásmido pMW-*asd* en la cepa B-3996 de *E. coli* productora de treonina resistente a estreptomicina. Por tanto, se obtuvo la cepa B-3996(pMW-*asd*).

50 Ejemplo 2. Efecto de la amplificación del gen *asd* sobre la producción de treonina

Se hicieron crecer ambas cepas de *E. coli* B-3996 y B-3996(pMW-*asd*) durante 18-24 horas a 37°C en placas de agar L que contenían estreptomicina (100 □g/ml) y ampicilina (100 □g/ml). Para obtener el cultivo de siembra, se hizo crecer la cepa en un agitador rotatorio (250 rpm) a 32°C durante 18 horas en tubos de ensayo de 20x200 mm que contenían 2 ml de caldo L con sacarosa al 4%. Entonces, se inoculó el medio de fermentación con 0,1 ml de material de

siembra (5%). Se realizó la fermentación en 2 ml de medio mínimo para la fermentación en tubos de ensayo de 20x200 mm. Se hicieron crecer las células durante 24 horas a 32°C con agitación a 250 rpm.

5 Tras el cultivo, se determinó la cantidad acumulada de L-treonina en el medio mediante CCF. Se desarrollaron placas Sorbfil (Stock Company Sorbopolymer, Krasnodar, Rusia) con una fase móvil: propan-2-ol : acetona : agua : amoníaco acuoso al 25% = 25 : 25 : 7 : 6 (v/v). Se usó una disolución (2%) de ninhidrina en acetona como un reactivo de visualización. Los resultados se presentan en la tabla 1.

La composición del medio de fermentación (g/l) es tal como sigue:

| | |
|---|--------|
| Sacarosa | 40,0 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 10,0 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,0 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0,4 |
| FeSO ₄ · 7H ₂ O | 0,02 |
| MnSO ₄ · 5H ₂ O | 0,02 |
| Tiamina HCl | 0,0002 |
| Extracto de levadura | 1,0 |
| CaCO ₃ | 20,0 |
| L-Isoleucina | 0,05 |

10 Se esterilizan por separado la sacarosa y el sulfato de magnesio. Se esteriliza CaCO₃ con calor en seco a 180°C durante 2 h. Se ajusta el pH a 7,0. Se introduce antibiótico en el medio tras la esterilización.

Aunque se ha descrito la invención en detalle con referencia a realizaciones preferidas de la misma, resultará evidente para un experto en la técnica que pueden realizarse diversos cambios, y emplearse equivalentes, sin apartarse del alcance de la invención.

Tabla 1.

| Cepa | DO ₅₆₀ | Treonina, g/l |
|---------------------|-------------------|---------------|
| B3996/pMW-asd | 8,6 | 18,5 |
| | 8,4 | 18,3 |
| | 9,1 | 19,8 |
| | 9,5 | 19,2 |
| | 9,3 | 20,0 |
| | 8,9 | 18,6 |
| | 9,4 | 19,3 |
| | 9,0 | 19,3 |
| | 9,0 ± 0,4 | 19,1 ± 0,6 |
| B-3996 (control) | 9,3 | 18,6 |
| | 9,6 | 17,9 |
| | 10,5 | 17,9 |
| | 10,6 | 17,6 |
| | 9,8 | 17,8 |

ES 2 392 825 T3

| | | |
|--|----------------|----------------|
| | 9,9 | 18,1 |
| | 10,2 | 18,0 |
| | 10,0 | 17,9 |
| | $10,0 \pm 0,4$ | $18,0 \pm 0,3$ |

Aplicabilidad industrial

Puede producirse L-treonina de manera eficaz.

ES 2 392 825 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> BACTERIA PRODUCTORA DE L-TREONINA QUE PERTENECE AL GÉNERO *ESCHERICHIA* Y MÉTODO PARA PRODUCIR L-TREONINA

5 <130> C2540PC4231

<150> Documento RU 2003135292

<151> 05-12-2003

<150> Documento US 60/586.222

<151> 09-07-2004

10 <160> 2

<210> 1

<211> 1104

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1104)

<400> 1

```

atg aaa aat gtt ggt ttt atc ggc tgg cgc ggt atg gtc ggc tcc gtt 48
Met Lys Asn Val Gly Phe Ile Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val
  1                      5                      10                      15

ctc atg caa cgc atg gtt gaa gag cgc gac ttc gac gcc att cgc cct 96
Leu Met Gln Arg Met Val Glu Glu Arg Asp Phe Asp Ala Ile Arg Pro
                20                25                30

gtc ttc ttt tct act tct cag ctt ggc cag gct gcg ccg tct ttt ggc 144
Val Phe Phe Ser Thr Ser Gln Leu Gly Gln Ala Ala Pro Ser Phe Gly
                35                40                45

gga acc act ggc aca ctt cag gat gcc ttt gat ctg gag gcg cta aag 192
Gly Thr Thr Gly Thr Leu Gln Asp Ala Phe Asp Leu Glu Ala Leu Lys
                50                55                60

gcc ctc gat atc att gtg acc tgt cag ggc ggc gat tat acc aac gaa 240
Ala Leu Asp Ile Ile Val Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Asn Glu
  65                70                75                80

atc tat cca aag ctt cgt gaa agc gga tgg caa ggt tac tgg att gac 288
Ile Tyr Pro Lys Leu Arg Glu Ser Gly Trp Gln Gly Tyr Trp Ile Asp
                85                90                95

```

ES 2 392 825 T3

| | |
|---|-----|
| gca gca tcg tct ctg cgc atg aaa gat gac gcc atc atc att ctt gac | 336 |
| Ala Ala Ser Ser Leu Arg Met Lys Asp Asp Ala Ile Ile Ile Leu Asp | |
| 100 105 110 | |
| ccc gtc aat cag gac gtc att acc gac gga tta aat aat ggc atc agg | 384 |
| Pro Val Asn Gln Asp Val Ile Thr Asp Gly Leu Asn Asn Gly Ile Arg | |
| 115 120 125 | |
| act ttt gtt ggc ggt aac tgt acc gta agc ctg atg ttg atg tcg ttg | 432 |
| Thr Phe Val Gly Gly Asn Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ser Leu | |
| 130 135 140 | |
| ggt ggt tta ttc gcc aat gat ctt gtt gat tgg gtg tcc gtt gca acc | 480 |
| Gly Gly Leu Phe Ala Asn Asp Leu Val Asp Trp Val Ser Val Ala Thr | |
| 145 150 155 160 | |
| tac cag gcc gct tcc ggc ggt ggt gcg cga cat atg cgt gag tta tta | 528 |
| Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Gly Gly Ala Arg His Met Arg Glu Leu Leu | |
| 165 170 175 | |
| acc cag atg ggc cat ctg tat ggc cat gtg gca gat gaa ctc gcg acc | 576 |
| Thr Gln Met Gly His Leu Tyr Gly His Val Ala Asp Glu Leu Ala Thr | |
| 180 185 190 | |
| ccg tcc tct gct att ctc gat atc gaa cgc aaa gtc aca acc tta acc | 624 |
| Pro Ser Ser Ala Ile Leu Asp Ile Glu Arg Lys Val Thr Thr Leu Thr | |
| 195 200 205 | |
| cgt agc ggt gag ctg ccg gtg gat aac ttt ggc gtg ccg ctg gcg ggt | 672 |
| Arg Ser Gly Glu Leu Pro Val Asp Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly | |
| 210 215 220 | |
| agc ctg att ccg tgg atc gac aaa cag ctc gat aac ggt cag agc cgc | 720 |
| Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Gln Leu Asp Asn Gly Gln Ser Arg | |
| 225 230 235 240 | |
| gaa gag tgg aaa ggg cag gcg gaa acc aac aag atc ctc aac aca tct | 768 |
| Glu Glu Trp Lys Gly Gln Ala Glu Thr Asn Lys Ile Leu Asn Thr Ser | |
| 245 250 255 | |
| tcc gta att ccg gta gat ggt tta tgt gtg cgt gtc ggg gca ttg cgc | 816 |
| Ser Val Ile Pro Val Asp Gly Leu Cys Val Arg Val Gly Ala Leu Arg | |
| 260 265 270 | |
| tgc cac agc cag gca ttc act att aaa ttg aaa aaa gat gtg tct att | 864 |
| Cys His Ser Gln Ala Phe Thr Ile Lys Leu Lys Lys Asp Val Ser Ile | |
| 275 280 285 | |
| ccg acc gtg gaa gaa ctg ctg gct gcg cac aat ccg tgg gcg aaa gtc | 912 |

ES 2 392 825 T3

Pro Thr Val Glu Glu Leu Leu Ala Ala His Asn Pro Trp Ala Lys Val
 290 295 300

gtt ccg aac gat cgg gaa atc act atg cgt gag cta acc cca gct gcc 960
 Val Pro Asn Asp Arg Glu Ile Thr Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala
 305 310 315 320

gtt acc ggc acg ctg acc acg ccg gta ggc cgc ctg cgt aag ctg aat 1008
 Val Thr Gly Thr Leu Thr Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Asn
 325 330 335

atg gga cca gag ttc ctg tca gcc ttt acc gtg ggc gac cag ctg ctg 1056
 Met Gly Pro Glu Phe Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu
 340 345 350

tgg ggg gcc gcg gag ccg ctg cgt cgg atg ctt cgt caa ctg gcg taa 1104
 Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Gln Leu Ala
 355 360 365

<210> 2

<211> 367

<212> PRT

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 2

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

ES 2 392 825 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| Arg | Ser | Gly | Glu | Leu | Pro | Val | Asp | Asn | Phe | Gly | Val | Pro | Leu | Ala | Gly | |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Ser | Leu | Ile | Pro | Trp | Ile | Asp | Lys | Gln | Leu | Asp | Asn | Gly | Gln | Ser | Arg | |
| 225 | | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | 240 | |
| Glu | Glu | Trp | Lys | Gly | Gln | Ala | Glu | Thr | Asn | Lys | Ile | Leu | Asn | Thr | Ser | |
| | | | | 245 | | | | | | 250 | | | | 255 | | |
| Ser | Val | Ile | Pro | Val | Asp | Gly | Leu | Cys | Val | Arg | Val | Gly | Ala | Leu | Arg | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| Cys | His | Ser | Gln | Ala | Phe | Thr | Ile | Lys | Leu | Lys | Lys | Asp | Val | Ser | Ile | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | | 285 | | | |
| Pro | Thr | Val | Glu | Glu | Leu | Leu | Ala | Ala | His | Asn | Pro | Trp | Ala | Lys | Val | |
| | | 290 | | | | 295 | | | | | | 300 | | | | |
| Val | Pro | Asn | Asp | Arg | Glu | Ile | Thr | Met | Arg | Glu | Leu | Thr | Pro | Ala | Ala | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | 320 | |
| Val | Thr | Gly | Thr | Leu | Thr | Thr | Pro | Val | Gly | Arg | Leu | Arg | Lys | Leu | Asn | |
| | | | | 325 | | | | | | 330 | | | | 335 | | |
| Met | Gly | Pro | Glu | Phe | Leu | Ser | Ala | Phe | Thr | Val | Gly | Asp | Gln | Leu | Leu | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | | 350 | | |
| Trp | Gly | Ala | Ala | Glu | Pro | Leu | Arg | Arg | Met | Leu | Arg | Gln | Leu | Ala | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | | 365 | | | |

REIVINDICACIONES

1. Método para producir L-treonina que comprende cultivar una bacteria productora de L-treonina que pertenece a *Escherichia coli*, en el que dicha bacteria se ha modificado para potenciar la actividad de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa aumentando la expresión del gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa, en el que dicha bacteria se ha modificado además para potenciar la expresión del gen thrA mutante que codifica para aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I y es resistente a la inhibición por retroalimentación mediante treonina; el gen thrB que codifica para homoserina cinasa; el gen thrC que codifica para treonina sintasa; y el gen rhtA que codifica para una proteína que confiere resistencia a homoserina y treonina, en un medio de cultivo para provocar la acumulación de L-treonina en el medio de cultivo, y recoger la L-treonina del medio de cultivo, en el que las expresiones de los genes se potencian colocando los genes bajo el control de un promotor potente y/o aumentando el número de copias de los genes, en el que dicho promotor bajo el cual se coloca el gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa se selecciona del grupo que consiste en promotor trp, promotor trc, promotor P_R y promotor P_L, en el que dicho gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa codifica para una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el número de copias se aumenta mediante la transformación de la bacteria con un vector que contiene el gen.
3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho promotor bajo el cual se coloca el gen rhtA tiene la mutación rhtA23 que es una sustitución de A por G en la posición -1 con respecto al codón de iniciación ATG.
4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho promotor bajo el cual se coloca el gen de aspartato- α -semialdehído deshidrogenasa es un promotor P_R.