

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 293 707**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12P 13/06 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.1999 E 99125406 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **13.08.2014 EP 1013765**

54

Título: **Método para producir L- aminoácidos**

30

Prioridad:

23.12.1998 RU 98123511

45

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

23.10.2014

73

Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, KYOBASHI 1-CHOME, CHUO-KU
TOKYO, JP**

72

Inventor/es:

**LIVSHITS, VITALIY ARKADYEVICH;
ZAKATAEVA, NATALIA PAVLOVNA;
ALESHIN, VLADIMIR VENIAMINOVICH;
BELAREVA, ALLA VALENTINOVNA y
TOKHMAKOVA, IRINA LYVOVNA**

74

Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 293 707 T5

DESCRIPCIÓN

Método para producir L-aminoácidos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la biotecnología, y más particularmente a un método para producir un aminoácido, especialmente a un método para producir L-homoserina, L-treonina, L-valina o L-leucina usando una bacteria que pertenece al género *Escherichia*.

10

Antecedentes de la técnica

Se ha obtenido, con respecto a K-12 de *E. coli*, un mutante que tiene la mutación *thrR* que está involucrado en la resistencia a concentraciones elevadas de treonina u homoserina en un medio mínimo (Asturova, O.B. et al., Appl. Bioch. And Microbiol., 21, 611-616 (1985)). La mutación mejoró la producción de L-treonina (patente SU nº 974817), de homoserina y de glutamato (Asturova, O.B. et al., Appl. Bioch. And Microbiol., 27, 556-561, 1991) mediante las cepas productoras de *E. coli* respectivas.

Además, se ha revelado que la mutación *thrR* existe a 18 min en el cromosoma de *E. coli*, y que la mutación surge en ORF1 entre los genes *pexB* y *ompX*. La unidad que expresa una proteína codificada por el ORF se ha designado como gen *rhtA* (rht: resistencia a homoserina y treonina). El gen *rhtA* incluye una región no codificante en 5' que incluye la secuencia de SD, el ORF1 y un terminador. También, se ha encontrado que un gen *rhtA* de tipo natural participa en la resistencia a treonina y a homoserina si se clona en un estado de múltiples copias, y que la mutación *rhtA23* es una sustitución de A por G en la posición -1 con respecto al codón de partida de ATG (ABSTRACTS of 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology junto con 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California, 24-29 de agosto de 1997, resumen nº 457).

Se ha encontrado previamente que existen en *E. coli*, durante la clonación del gen *rhtA*, al menos dos genes diferentes que proporcionan resistencia a treonina y a homoserina en un estado de múltiples copias. Uno de los genes es el gen *rhtA*, y se encontró que el otro gen era el gen *rhtB* que confiere resistencia a homoserina (solicitud de patente rusa nº 98118425).

35 **Descripción de la invención**

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método para producir un aminoácido, especialmente L-homoserina, L-treonina y aminoácidos de cadena ramificada, con un mayor rendimiento.

Se ha encontrado que una región a 86 min sobre el cromosoma de *E. coli*, cuando se clona mediante un vector de múltiples copias, imparte resistencia a L-homoserina a células de *E. coli*. Se ha encontrado además que existe en la región en dirección 5' otro gen, *rhtC*, que implica resistencia a treonina, y que cuando se amplifican estos genes la productividad de aminoácidos de *E. coli* se puede mejorar como el gen *rhtA*. En base a estos hallazgos, se ha completado la presente invención.

De este modo, es divulgado lo expuesto a continuación:

- (1) una bacteria que pertenece al género de *Escherichia*, en la que la resistencia a L-treonina de la bacteria está potenciada potenciando una actividad de proteína como se define en los siguientes apartados (A) o (B) en una célula de la bacteria:

50

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4; o

(B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que incluye la supresión, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4, y que tiene una actividad que hace que la bacteria tenga la proteína resistente a L-treonina;

55

- (2) la bacteria según (1), en la que la resistencia a L-homoserina de la bacteria está potenciada potenciando una actividad de proteína como se define en los siguientes apartados (C) o (D) en una célula de la bacteria:

60

(C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2; o

(D) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que incluye la supresión, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2, y que tiene una actividad que hace que una bacteria tenga la proteína resistente a L-homoserina;

65

- (3) la bacteria según (1) o (2), en la que la actividad de proteína como se define en los apartados (A) o (B) está

potenciada mediante la transformación de la bacteria con ADN que codifica la proteína como se define en los apartados (A) o (B);

(4) la bacteria según (2), en la que la actividad de proteína como se define en los apartados (C) o (D) está potenciada mediante la transformación de la bacteria con ADN que codifica la proteína como se define en los apartados (C) o (D);

(5) un método para producir un aminoácido, que comprende las etapas siguientes:

cultivar la bacteria como se define en uno cualquiera de los apartados (1) a (4), que tiene la capacidad de producir un aminoácido, en un medio de cultivo, para producir y acumular el aminoácido en el medio, y recuperar el aminoácido del medio;

(6) el método según (5), en el que el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-homoserina, L-treonina y aminoácidos de cadena ramificada;

(7) el método según (6), en el que el aminoácido de cadena ramificada es L-valina o L-leucina;

(8) un ADN que codifica una proteína definida en los siguientes apartados (A) o (B):

(A) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4;

(B) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4, que incluye la sustitución, supresión, inserción, adición o inversión de uno o varios aminoácidos, y que tiene una actividad para hacer que la bacteria tenga la proteína resistente a L-treonina;

(9) el ADN de (8) que es un ADN definido en los siguientes apartados (a) o (b):

(a) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 187 a 804 en SEC ID nº: 3;

(b) un ADN que se puede hibridar con una secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 187 a 804 en SEC ID nº: 3, o una sonda preparada a partir de la secuencia nucleotídica en una condición restrictiva, y que codifica una proteína que tiene la actividad de hacer que una bacteria tenga la proteína resistente a L-treonina; y

(10) el ADN de (9), en el que la condición restrictiva es una condición en la que el lavado se realiza a 60°C, y a una concentración salina que corresponde a 1 x SSC y 0,1% de SDS.

El fragmento de ADN que codifica la proteína como se define en los apartados (A) o (B) anteriores se puede denominar como "gen *rhtC*"; una proteína codificada por el gen *rhtC* se puede denominar como la "proteína *RhtC*"; el ADN que codifica la proteína como se define en los apartados (C) o (D) anteriores se puede denominar como "gen *rhtB*"; una proteína codificada por el gen *rhtB* se puede denominar como "proteína *RhtB*". Una actividad de la proteína *RhtC* que participa en la resistencia a L-treonina de una bacteria (es decir, una actividad que hace que la bacteria tenga la proteína *RhtC* resistente a L-treonina) se puede denominar como "actividad *Rt*"; y una actividad de la proteína *RhtB* que participa en la resistencia a L-homoserina de una bacteria (es decir, una actividad que hace que una bacteria tenga la proteína *RhtB* resistente a L-homoserina) se puede denominar como "actividad *Rh*". Un gen estructural que codifica la proteína *RhtC* o la proteína *RhtB* en el gen *rhtC* o *rhtB* se puede denominar como "gen estructural de *rhtC*" o "gen estructural de *rhtB*". La expresión "potenciar la actividad de *Rt* o la actividad de *Rh*" significa impartir resistencia a treonina o a homoserina a una bacteria, o potenciar la resistencia por medio del aumento del número de moléculas de la proteína *RhtC* o de la proteína *RhtB* aumentando una actividad específica de estas proteínas, o desensibilizando la regulación negativa frente a la expresión o la actividad de estas proteínas o similar. La expresión "ADN que codifica una proteína" significa un ADN que tiene una cadena que codifica la proteína cuando el ADN es bicatenario. La expresión resistencia a L-treonina significa que una bacteria crece en un medio mínimo que contiene L-treonina a una concentración a la que su cepa de tipo natural no crece, habitualmente > 30 mg/ml. La expresión resistencia a L-homoserina significa que una bacteria crece en un medio mínimo que contiene L-homoserina a una concentración a la que su cepa de tipo natural no crece, habitualmente a > 5 mg/ml. La capacidad para producir un aminoácido significa que una bacteria produce y acumula el aminoácido en un medio en una cantidad mayor que su cepa de tipo natural.

La presente invención se explicará con mayor detalle a continuación.

<1> ADN utilizado para codificar una proteína utilizada en el método de la presente invención.

El primer fragmento de ADN usado para la presente invención (gen *rhtC*) codifica una proteína que tiene la actividad de *Rt* y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4. Específicamente, el ADN se puede ejemplificar

mediante un ADN que comprende una secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 187 a 804 de una secuencia nucleotídica de SEC ID nº: 3.

El segundo fragmento de ADN usado para la presente invención (gen *rhtB*) codifica una proteína que tiene la actividad de Rh y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2. Específicamente, el ADN se puede ejemplificar mediante un ADN que comprende una secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 557 a 1171 de una secuencia nucleotídica de SEC ID nº: 1.

El gen *rhtB* que tiene la secuencia nucleotídica de SEC ID nº: 1 corresponde a una parte de la secuencia complementaria a la secuencia de número de acceso de GenBank M87049, e incluye f138 (números de nucleótidos 61959-61543 de M87049) que es un ORF (marco de lectura abierta) conocido pero de función desconocida, presente en 86 min sobre el cromosoma de *E. coli*, y sus regiones de flanco en 5' y en 3'. El f138, que sólo tenía 160 nucleótidos en la región de flanco en 5', no pudo impartir resistencia a homoserina. No había ningún codón de terminación entre los nucleótidos 62160 y 61959 de M87049 (en dirección 5' del f138 del ORF). Además, uno de los codones de ATG de esta secuencia está precedido por un sitio de unión a ribosoma (62171-62166 en M87049). Por tanto, la región codificante tiene 201 pb más, y es más larga. El ORF más grande (números de nucleótidos 62160 a 61546 de M87049) se denomina como gen *rhtB*.

El gen *rhtB* se puede obtener, por ejemplo, infectando la cepa lisogénica Mucts de *E. coli* usando un lisado de una cepa lisogénica de *E. coli*, tal como K12 o W3110, según el método en el que se usa un fagémido mini-Mu d5005 (Groisman, E.A., et al., J. Bacteriol., 168, 357-364 (1986)), y asilando los ADN de los fagémidos a partir de colonias que crecen en un medio mínimo que contiene canamicina (40 µg/ml) y L-homoserina (10 mg/ml). Como se ilustra en el Ejemplo descrito más abajo, el gen *rhtB* se cartografió en 86 min sobre el cromosoma de *E. coli*. Por lo tanto, el fragmento de ADN que incluye el gen *rhtB* se puede obtener a partir del cromosoma de *E. coli* mediante hibridación de colonias o mediante PCR (reacción en cadena de polimerasa; refiérase a White, T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)) usando un oligonucleótido u oligonucleótidos que tienen una secuencia que corresponde a la región próxima a la porción de 86 min sobre el cromosoma de *E. coli*.

Como alternativa, el oligonucleótido se puede diseñar según la secuencia nucleotídica de SEC ID nº: 1. Toda la región codificante se puede amplificar usando, como cebadores para PCR, oligonucleótidos que tienen secuencias nucleotídicas que corresponden a una región en dirección 5' desde el número de nucleótido 557, y a una región en dirección 3' desde el número de nucleótido 1171 en SEC ID nº: 1.

La síntesis de los oligonucleótidos se puede realizar mediante un método normal tal como el método de fosforamido (véase Tetrahedron Letters, 22, 1859 (1981)) usando un sintetizador de ADN comercialmente disponible (por ejemplo, el modelo 380B de sintetizador de ADN producido por Applied Biosystems). Además, la PCR se puede realizar usando un aparato de PCR comercialmente disponible (por ejemplo, el modelo PJ2000 de ciclador térmico de ADN producido por Takara Shuzo Co., Ltd.), usando *Taq* ADN polimerasa (suministrado por Takara Shuzo Co., Ltd.) según un método designado por el proveedor.

El gen *rhtC* se obtuvo en el fragmento de ADN que incluye el gen *rhtB* por casualidad cuando *rhtB* se clonó como se describe más abajo en las realizaciones. El gen *rhtC* corresponde a una secuencia corregida, como se describe más abajo, de 0128 (números de nucleótidos 60860-61480 del número de acceso de GenBank M87049) que es un ORF conocido pero de función desconocida. El gen *rhtC* se puede obtener mediante PCR o mediante hibridación usando oligonucleótidos diseñados según la secuencia nucleotídica de SEC ID nº: 3. Toda la región codificante se puede amplificar usando, como cebadores para la PCR, oligonucleótidos que tienen la secuencia nucleotídica que corresponde a una región en dirección 5' desde el número de nucleótido 187, y a una región en dirección 3' desde el número de nucleótido 804, en SEC ID nº: 3.

En la presente invención, el ADN que codifica la proteína RhtB de la presente invención puede codificar la proteína RhtB que incluye la supresión, sustitución, inserción, o adición de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones, con la condición de que no se deteriore la actividad de Rh de la proteína RhtB codificada por él. De forma similar, el ADN que codifica la proteína RhtC de la presente invención puede codificar la proteína RhtC que incluye la supresión, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones, con la condición de que no se deteriore la actividad de Rt de la proteína codificada por él.

El ADN, que codifica la sustancialmente misma proteína que la proteína RhtB o la proteína RhtC como se describe anteriormente, se puede obtener, por ejemplo, modificando la secuencia nucleotídica, por ejemplo por medio del método de mutagénesis dirigida al sitio, de forma que uno o más restos de aminoácidos en un sitio específico implican la supresión, sustitución, inserción o adición. El ADN modificado como se describe anteriormente se puede obtener mediante el tratamiento de mutación conocido convencionalmente. El tratamiento de mutación incluye un método para tratar un ADN que codifica la proteína RhtB o la proteína RhtC *in vitro*, por ejemplo con hidroxilamina, y un método para tratar un microorganismo, por ejemplo una bacteria, que pertenece al género de *Escherichia* que produce un ADN que codifica la proteína RhtB, con radiación ultravioleta o con un agente mutante tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y ácido nitroso usados habitualmente en el tratamiento de mutación.

El ADN, que codifica sustancialmente la misma proteína que la proteína RhtB o la proteína RhtC, se puede obtener expresando un ADN sometido a un tratamiento de mutación *in vitro* como se describe anteriormente en múltiple copia en una célula apropiada, investigando la resistencia a homoserina o a treonina, y seleccionando el ADN que aumenta la resistencia.

Generalmente se sabe que una secuencia de aminoácidos de una proteína, y una secuencia nucleotídica que la codifica, puede ser ligeramente diferente entre especies, cepas, mutantes o variantes.

Por lo tanto, el ADN, que codifica sustancialmente la misma proteína que la proteína RhtC, se puede obtener aislando un ADN que se hibrida con ADN que tiene, por ejemplo, una secuencia nucleotídica de los números de nucleótidos 187 a 804 de la secuencia nucleotídica de SEC ID n°: 3, o una sonda que se puede obtener a partir de ella en condiciones restrictivas, y que codifica una proteína que tiene la actividad de Rt, a partir de una bacteria que pertenece al género *Escherichia* que se somete a tratamiento de mutación, o un mutante espontáneo o una variante de una bacteria que pertenece al género *Escherichia*.

También, el ADN, que codifica sustancialmente la misma proteína que la proteína RhtB, se puede obtener aislando un ADN que se hibrida con ADN que tiene, por ejemplo, una secuencia nucleotídica de los números de nucleótidos 557 a 1171 de la secuencia nucleotídica de SEC ID n°: 1, o una sonda que se puede tener a partir de ella en condiciones restrictivas, y que codifica una proteína que tiene la actividad de Rh, a partir de la bacteria que pertenece al género *Escherichia* que se somete a tratamiento de mutación, o un mutante espontáneo o una variante de una bacteria que pertenece al género *Escherichia*.

La expresión "condiciones restrictivas", usada en la presente memoria, es una condición en la que los ADN se hibridan entre sí a una concentración salina que corresponde a una condición normal de lavado en hibridación Southern, es decir, 60°C, 1 x SSC, 0,1% de SDS, preferiblemente 0,1 x SSC, 0,1% de SDS.

<2> Bacteria que pertenece al género *Escherichia* utilizada en el método de la presente invención

La bacteria que pertenece al género *Escherichia* utilizada en el método de la presente invención es una bacteria que pertenece al género *Escherichia* cuya actividad de Rt está potenciada. Una forma de realización preferida de la bacteria es una bacteria que tiene potenciada además la actividad de Rh. Una bacteria que pertenece al género *Escherichia* se ejemplifica por *Escherichia coli*. La actividad de Rt se puede potenciar, por ejemplo, mediante amplificación del número de copias del gen estructural *rhtC* en una célula, o mediante transformación de una bacteria que pertenece al género *Escherichia* con un ADN recombinante en el que se liga un fragmento de ADN, que incluye el gen estructural *rhtC* que codifica la proteína RhtC, con una secuencia promotora que funciona eficazmente en una bacteria que pertenece al género *Escherichia*. La actividad de Rt también se puede potenciar mediante la sustitución de la secuencia promotora del gen *rhtC* en un cromosoma por una secuencia promotora que funciona eficazmente en una bacteria que pertenece al género *Escherichia*.

Además, la actividad de Rh se puede potenciar, por ejemplo, mediante amplificación del número de copias del gen estructural *rhtB* en una célula, o mediante transformación de una bacteria que pertenece al género *Escherichia* con ADN recombinante, en la que un fragmento de ADN que incluye el gen estructural *rhtB* que codifica la proteína RhtB se liga con una secuencia promotora que funciona eficazmente en una bacteria que pertenece al género *Escherichia*. La actividad de Rh también se puede potenciar mediante sustitución de la secuencia promotora del gen *rhtB* en un cromosoma por una secuencia promotora que funciona eficazmente en una bacteria que pertenece al género *Escherichia*.

La amplificación del número de copias del gen estructural *rhtC* o del gen estructural *rhtB* en una célula se puede realizar mediante la introducción de un vector de múltiples copias que porta el gen estructural *rhtC* o el gen estructural *rhtB* en una célula de una bacteria que pertenece al género *Escherichia*. Específicamente, el número de copias se puede incrementar mediante la introducción de un plásmido, un fago o un transposón (Berg, D.E. y Berg, C.M. Bio/Tecnol., 1, 417 (1983)) que porta el gen estructural *rhtC* o el gen estructural *rhtB* en una célula de una bacteria que pertenece al género *Escherichia*.

El vector de múltiples copias se ejemplifica mediante vectores plasmídicos tales como pBR322, pMV118, pUC19 o similares, y los vectores fágicos tales como λ 1059, λ BF101, M13mp19 o similares. El transposón se ejemplifica por Mu, Tn10, Tn5 o similares.

La introducción de un ADN en una bacteria que pertenece al género *Escherichia* se puede realizar, por ejemplo, mediante el método de D.A.M. Morrison (Methods in Enzymology, 68, 326 (1979)), o mediante un método en el que se trata una célula bacteriana receptora con cloruro de calcio para aumentar la permeabilidad del ADN (Mandel, M. y Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159, (1970)), y similares.

Si la actividad de Rt, o la actividad de Rt y la actividad de Rh se potencian en una bacteria que produzca aminoácidos y que pertenezca al género *Escherichia* como se describe anteriormente, la cantidad del aminoácido producida puede aumentar. Puesto que se potencia la bacteria que pertenece al género *Escherichia* que posee la

actividad de Rt, o la actividad de Rt y la actividad de Rh, se usan cepas que tengan la capacidad para producir los aminoácidos deseados. Además, la capacidad para producir un aminoácido se puede impartir a una bacteria en la que esté potenciada la actividad de Rt, o la actividad de Rt y la actividad de Rh.

5 Basándose en la amplificación del fragmento de ADN de *rhtC*, se obtuvieron las nuevas cepas MG442/pRhtC de *E. coli* que produce homoserina; la MG442/pVIC40, pRhtC de *E. coli* que produce treonina; NZ10/pRhtBC de *E. coli* y NZ10/pRhtC, pRhtC de *E. coli* que producen homoserina, valina y leucina; las cuales acumulan los aminoácidos en una cantidad mayor que aquellas que no contienen el fragmento de ADN de *rhtC* amplificado.

10 Las nuevas cepas se han depositado (según el depósito internacional basado en el Tratado de Budapest) en la All-Russian Collection for Industrial Microorganisms (VKPM). La cepa MG442/pRhtC de *E. coli* se ha depositado con el número de acceso de VKPM B-7700; la cepa MG442/pVIC40, pRhtC de *E. coli* se ha depositado con el número de acceso de VKPM B-7680; la cepa NZ10/pRhtB, pRhtC de *E. coli* se ha depositado con el número de acceso de VKPM B-7681, y la cepa NZ10/pRhtBC de *E. coli* se ha depositado con el número de acceso de VKPM B-7682.

15 La cepa MG442/pRhtC de *E. coli* (VKPM B-7700) muestra las siguientes características morfológicas y bioquímicas de cultivo.

Citomorfología

20 Bacilos Gram negativos débilmente móviles que tienen extremos redondeados. Tamaño longitudinal, 1,5 a 2 µm.

Características de cultivos

25 Agar de extracto de carne de vacuno:

Después de 24 horas de crecimiento a 37°C, produce colonias semitransparentes blanquecinas redondas de 1,0 a 3 mm de diámetro, con una superficie lisa, bordes regulares o ligeramente ondulados, con el centro ligeramente elevado, con estructura homogénea, con una consistencia parecida a una pasta, fácilmente emulsionables.

30 Agar de Luria:

Después de un crecimiento durante 24 horas a 37°C, desarrolla colonias semitranslúcidas blanquecinas de 1,5 a 2,5 mm de diámetro que tienen una superficie lisa, estructura homogénea, consistencia parecida a una pasta, fácilmente emulsionables.

Medio M9 dopado con agar mínimo:

40 Después de 40 a 48 horas de crecimiento a 37°C, forma colonias de 0,5 a 1,5 mm de diámetro, que tienen un color blanco grisáceo, semitransparentes, y ligeramente convexas, con una superficie lustrosa.

Crecimiento en un caldo de extracto de carne de vacuno:

45 Después de un crecimiento durante 24 horas a 37°C, muestra una fuerte turbidez uniforme, y tienen un olor característico.

Características fisiológicas y bioquímicas

50 Crecimientos con la inoculación violenta en un agar de extracto de carne de vacuno:

Muestra buen crecimiento en todo el área inoculada. El microorganismo demuestra ser un anaerobio facultativo. No licúa gelatina.

55 Tiene un buen crecimiento en la leche, acompañado de coagulación de la leche.

No produce indol.

60 Condiciones de temperatura: crece en caldo de extracto de carne de vacuno a 20-42°C, estando la temperatura óptima entre 33 y 37°C.

Valor de pH del medio de cultivo: crece en medio líquido que tiene el valor de pH de 6 a 8, siendo un valor óptimo 7,2.

65 Fuentes de carbono: muestra buen crecimiento sobre glucosa, fructosa, lactosa, manosa, galactosa, xilosa, glicerina, manitol, para producir un ácido y gas.

Fuentes de nitrógeno: asimila nitrógeno en forma de amonio, sales de ácido nítrico, así como a partir de algunos compuestos orgánicos.

5 Resistente a ampicilina.

Se usa L-isoleucina como un factor de crecimiento. Sin embargo, la cepa puede crecer lentamente sin isoleucina.

10 Contenido de plásmidos: las células contienen pRhtC plasmídico híbrido de múltiples copias que asegura resistencia a ampicilina (100 mg/l) y que porta el gen *rhtC* responsable del aumento de la resistencia a treonina (50 mg/ml).

15 La cepa MG442/pVIC40, pRhtC de *E. coli* (VKPM B-7680) tiene las mismas características morfológicas de cultivo y bioquímicas que la cepa de VKPM B-7700, excepto que, además de pRhtC, contiene un plásmido híbrido de múltiples copias pVIC40 que asegura resistencia a estreptomycinina (100 mg/l) y que porta los genes del operón de treonina.

20 La cepa NZ10/pRhtB, pRhtC de *E. coli* (VKPM B-7681) tiene las mismas características morfológicas de cultivo y bioquímicas que la cepa de VKPM B-7700, excepto que se usó L-treonina (0,1-5 mg/ml) como un factor de crecimiento en lugar de L-isoleucina. Además, contiene un plásmido híbrido de múltiples copias pRhtB que asegura resistencia a canamicina (50 mg/l) y que porta el gen *rhtB* que confiere resistencia a homoserina (10 mg/ml).

25 La cepa NZ10/pRhtBC de *E. coli* (VKPM B-7682) tiene las mismas características morfológicas de cultivo y bioquímicas que la cepa de VKPM B-7681, excepto que contiene un plásmido híbrido de múltiples copias pRhtBC que asegura resistencia a ampicilina (100 mg/l) y que porta tanto los genes *rhtB* como *rhtC* que confieren resistencia a L-homoserina (10 mg/ml) y L-treonina (50 mg/ml).

<3> Método para producir un aminoácido

30 Un aminoácido se puede producir eficazmente cultivando la bacteria en la que está potenciada la actividad de Rt, o la actividad de Rt y la actividad de Rh, amplificando un número de copias del gen *rhtC*, o del gen *rhtC* y del gen *rhtB* como se describe anteriormente, y que tiene la capacidad para producir el aminoácido, en un medio de cultivo, produciendo y acumulando el aminoácido en el medio, y recuperando el aminoácido del medio. El aminoácido se ejemplifica preferiblemente por L-homoserina, L-treonina y aminoácidos de cadena ramificada. Los aminoácidos de
35 cadena ramificada se pueden ejemplificar por L-valina, L-leucina y L-isoleucina, y preferiblemente se pueden ejemplificar por L-valina, L-leucina.

40 En el método de la presente invención, el cultivo de la bacteria que pertenece al género *Escherichia*, la recogida y la purificación de los aminoácidos a partir del medio líquido se pueden realizar de manera similar a aquellos del método convencional para producir un aminoácido mediante fermentación usando una bacteria. El medio usado en el cultivo puede ser un medio sintético o un medio natural, en tanto que el medio incluya una fuente de carbono y de nitrógeno y minerales, y, si es necesario, nutrientes que la bacteria usada requiere para el crecimiento, en una cantidad apropiada. La fuente de carbono puede incluir diversos hidratos de carbono tales como glucosa y sacarosa, y
45 diversos ácidos orgánicos. Dependiendo de la capacidad de asimilación de la bacteria usada, se puede usar un alcohol, incluyendo etanol y glicerina. Como fuente de nitrógeno, se usan amoníaco, diversas sales de amonio tales como sulfato de amonio, otros compuestos nitrogenados tales como aminas, una fuente de nitrógeno natural tal como peptona, hidrolizado de haba de soja y un microbio fermentador digerido. Como minerales, se usan fosfato monopotásico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, carbonato de calcio.

50 El cultivo es preferiblemente un cultivo en una condición aerobia tal como una agitación, y un cultivo con aireación y agitación. La temperatura del cultivo habitualmente es 20 a 40°C, preferiblemente 30 a 38°C. El pH del cultivo está habitualmente entre 5 y 9, preferiblemente entre 6,5 y 7,2. El pH del cultivo se puede ajustar con amoníaco, carbonato de calcio, diversos ácidos, diversas bases, y tampones. Habitualmente, un cultivo de 1 a 3 días conduce a la acumulación del aminoácido diana en el medio.

55 La recuperación del aminoácido se puede realizar eliminando los sólidos tales como células del medio, mediante centrifugación o mediante filtración con membrana tras el cultivo, y recogiendo y purificando después el aminoácido diana mediante intercambio iónico, concentración y métodos de fraccionamiento cristalino, y similares.

60 Breve explicación de los dibujos

La Fig. 1 muestra la clonación e identificación de los genes *rhtB* y *rhtC*,
la Fig. 2 muestra la estructura del plásmido pRhtB que posee el gen *rhtB*,
la Fig. 3 muestra la estructura del plásmido pRhtC que posee el gen *rhtC*, y
65 la Fig. 4 muestra la estructura del plásmido pRhtBC que posee el gen *rhtB* y el gen *rhtC*.

Mejor modo de poner en práctica la invención

La presente invención se explicará de forma más detallada a continuación con referencia a los ejemplos. En los ejemplos, un aminoácido tiene la configuración L, excepto que se señale de otro modo.

Ejemplo 1: obtención de los fragmentos de ADN de *rhtB* y *rhtC*

Etapas 1. Clonación de genes que implican resistencia a homoserina y a treonina en un fagémido mini-Mu

Los genes que implican resistencia a homoserina y a treonina se clonaron *in vivo* usando el fagémido mini-Mu d5005 (Groisman, E.A., et al., J. Bacteriol., 168, 357-364 (1986)). Como donante, se usó el lisógeno MuCts62 de la cepa MG442 (Guayatinier et al., Genetika (en ruso), 14, 947-956 (1978)). Se usaron lisados recientemente preparados para infectar un derivado lisogénico Mucts de una cepa de VKPM B-513 (Hfr K10 metB). Las células se cultivaron en placas en medio mínimo de glucosa M9 con metionina (50 µg/ml), canamicina (40 µg/ml) y homoserina (10 µg/ml). Se escogieron y se aislaron colonias que aparecieron después de 48 h. El ADN plasmídico se aisló y se usó para transformar la cepa de VKPM B-513 mediante técnicas estándar. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar con caldo L, con canamicina, según lo anterior. El ADN plasmídico se aisló de aquellas que fueron resistentes a homoserina, y se analizó mediante cartografía de restricción de la estructura de los fragmentos insertados. Parece que se habían clonado del donante dos tipos de insertos que pertenecen a regiones cromosómicas diferentes. De este modo, existen en *E. coli* al menos dos genes diferentes que en múltiples copias imparten resistencia a homoserina. Uno de los dos tipos de insertos es el gen *rhtA* que ya se dio a conocer (ABSTRACT of 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology junto con 1997 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California, 24-29 de agosto de 1997). Entre el otro de los dos tipos de insertos, sólo un fragmento de MluI-MluI de 0,8 kb imparte resistencia a homoserina (Fig. 1).

Etapas 2: identificación del gen *rhtB* y del gen *rhtC*

El fragmento de inserto se secuenció mediante el método de terminación de cadena con didesoxi, de Sanger. Ambas cadenas de ADN se secuenciaron en su totalidad, y todas las uniones se solaparon. La secuenciación mostró que el fragmento del inserto incluyó f138 (números de nucleótidos 61543 a 61959 de número de acceso GenBank M87049), que es un ORF (marco de lectura abierta) conocido pero de función desconocida, presente en 86 min del cromosoma de *E. coli* y alrededor de 350 pb de una región en dirección 5' del mismo (región en dirección 3' en la secuencia de M87049). El f138, que sólo tuvo 160 nucleótidos en la región de flaqueo en 5', no pudo impartir la resistencia a homoserina. No hay ningún codón de terminación en dirección 5' del f138 de ORF entre los nucleótidos 62160 y 61950 de M87049. Además, en la secuencia está presente un ATG tras una secuencia que se predice como un sitio de unión a ribosoma. El ORF más grande (números de nucleótidos 62160 a 61546) se denomina como gen *rhtB*. La proteína RhtB, deducida a partir del gen, tiene una región que es altamente hidrófoba y contiene posibles segmentos transmembránicos.

Como se describe a continuación, el plásmido que contiene este gen confirió a las células sólo la resistencia a concentraciones elevadas de homoserina. Puesto que el fragmento de ADN de SacII-SacII inicial contenía el segundo ORF no identificado, 0128, el gen se subclonó y se ensayó para determinar su capacidad para conferir resistencia a homoserina y a treonina. Se demostró que el plásmido que contienen 0128 (fragmento de *Clal-Eco47III*) confirió resistencia a 50 mg/ml de treonina (Fig. 1). El fragmento subclonado se secuenció y se encontró que contenía un nucleótido (G) adicional en la posición entre los nucleótidos 61213 y 61214 de M87049. La adición del nucleótido a la secuencia eliminó un desplazamiento del marco y agrandó el ORF en la región de flaqueo en 5' hasta el nucleótido 60860. Este nuevo gen se denominó como *rhtC*. Se encontró que ambos genes, *rhtB* y *rhtC*, eran homólogos al transportador implicado en la exportación de lisina de *Corynebacterium glutamicum*.

Ejemplo 2: efecto de la amplificación de los genes *rhtB* y *rhtC* sobre la producción de homoserina

<1> Construcción de la cepa NZ10/pAL4, pRhtB de *E. coli* productora de L-homoserina, y producción de homoserina

El gen *rhtB* se insertó en un plásmido pUK21 (Vieira, J. y Messing, J., Gene, 100, 189-194 (1991)), para obtener pRhtB (Fig. 2).

La cepa NZ10 de *E. coli* se transformó mediante un plásmido pAL4 que fue un vector pBR322 en el que se insertó el gen *trhA* que codifica aspartoquinasa-homoserina deshidrogenasa I, para obtener las cepas NZ10/pAL4. La cepa NZ10 es un mutante *thrB*⁻ invertido de *leuB*⁺ obtenido a partir de la cepa C600 (*thrB*, *leuB*) de *E. coli* (Appleyard R.K., Genetics, 39, 440-452, 1954).

La cepa NZ10/pAL4 se transformó con pUK21 o pRhtB para obtener las cepas NZ10/pAL4, pUK21 y NZ10/pAL4, pRhtB.

Los transformantes así obtenidos se cultivaron cada uno a 37°C durante 18 horas en un caldo de nutriente con 50 mg/l de canamicina y 100 mg/l de ampicilina, y 0,3 ml del cultivo obtenido se inoculaban en 3 ml de un medio de

fermentación que tiene la siguiente composición y que contiene 50 mg/l de canamicina y 100 mg/ml de ampicilina, en un tubo de ensayo de 20 x 200 mm, y se cultivaron a 37°C durante 48 horas con un agitador giratorio. Tras el cultivo, se determinó la cantidad acumulada de homoserina en el medio y la absorbancia a 560 nm del medio mediante métodos conocidos.

[Composición del medio de fermentación (g/l)]

Glucosa	80
(NH ₄) ₂ SO ₄	22
K ₂ HPO ₄	2
NaCl	0,8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,02
Hidrócloruro de tiamina	0,2
Extracto de levadura	1,0
CaCO ₃	30
(El CaCO ₃ se esterilizó separadamente)	

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Como se muestra en la Tabla 1, la cepa NZ10/pAL4, pRhtB acumuló homoserina en una cantidad mayor que la cepa NZ10/pAL4, pUK21, en la que el gen *rhtB* no estaba potenciado.

Tabla 1

Cepa	OD ₅₆₀	Cantidad acumulada de homoserina (g/l)
NZ10/pAL4, pUK21	14,3	3,3
NZ10/pAL4, pRhtB	15,6	6,4

<2> Construcción de la cepa MG442/pRhtC de *E. coli* productora de homoserina, y producción de homoserina

El gen *rhtC* se insertó en el vector pUC21 (Vieira, J. y Messing, J., Gene, 100, 189-194 (1991)), para obtener pRhtC (Fig. 3).

La cepa MG442 de *E. coli* conocida, que puede producir treonina en una cantidad no menor que 3 g/l (Gusyatiner, et al., 1978, Genetika (en ruso), 14:947-956), se transformó introduciendo pUC21 o pRhtC para obtener las cepas MG442/pUC21 y MG442/pRhtC.

Los transformantes así obtenidos se cultivaron cada uno a 37°C durante 18 horas en un caldo nutriente con 100 mg/ml de ampicilina, y se inocularon 0,3 ml del cultivo obtenido en 3 ml de un medio de fermentación descrito anteriormente y que contiene 100 mg/ml de ampicilina, en un tubo de ensayo de 20 x 200 mm, y se cultivaron a 37°C durante 48 horas con un agitador giratorio. Tras el cultivo, se determinó, mediante métodos conocidos, la cantidad acumulada de homoserina en el medio, y la absorbancia a 560 nm del medio. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Cepa	OD ₅₆₀	Cantidad acumulada de homoserina (g/l)
MG442/pUC21	9,7	<0,1
MG442/pRhtC	15,2	9,5

Ejemplo 3: efecto de la amplificación de los genes *rhtB* y *rhtC* sobre la producción de treonina

<1> Construcción de la cepa VG442/pVIC40, pRhtB (VKPM B-7660) de *E. coli* productora de treonina, y producción de treonina

La cepa MG442 se transformó introduciendo un plásmido conocido pVIC40 (patente U.S. nº 5.175.107 (1992)) mediante un método de transformación habitual. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar con LB que contienen 0,1 mg/ml de estreptomina. De este modo se obtuvo una nueva cepa MG442/pVIC40.

La cepa MG442/pVIC40 se transformó con pUK21 o pRhtB para obtener la cepa MG442/pVIC40, pUK21 y MG442/pVIC40, pRhtB.

Los transformantes así obtenidos se cultivaron cada uno a 37°C durante 18 horas en un caldo nutriente con 50 mg/l de canamicina y 100 mg/l de estreptomina, y se inocularon 0,3 ml del cultivo obtenido en 3 ml de un medio de fermentación descrito en el Ejemplo 2 y que contiene 50 mg/l de canamicina y 100 mg/l de estreptomina, en un

tubo de ensayo de 20 x 200 mm, y se cultivaron a 37°C durante 68 horas con un agitador giratorio. Tras el cultivo, se determinó, mediante métodos conocidos, la cantidad acumulada de treonina en el medio, y la absorbancia a 560 nm del medio.

- 5 Los resultados se muestran en la Tabla 3. Como se muestra en la Tabla 3, la cepa MG442/pVIC40, pRhtB acumuló treonina en una cantidad mayor que la cepa MG442/pVIC40, pUK21, en la que el gen *rhtB* no estaba potenciado.

Tabla 3

Cepa	OD ₅₆₀	Cantidad acumulada de treonina (g/l)
MG442/pVIC40, pUK21	16,3	12,9
MG442/pVIC40, pRhtB	15,2	16,3

10 <2> Construcción de la cepa VG442/pVIC40, pRhtC (VKPM B-7680) de *E. coli* productora de treonina, y producción de treonina

15 La cepa MG442/pVIC40 se transformó con pRhtC y pUC21. De este modo se obtuvieron los transformantes MG442/pVIC40, pRhtC y MG442/pVIC40, pUC21. De la misma manera como se describe anteriormente, se cultivó cada uno de MG442/pVIC40, pUC21 y MG442/pVIC40, pRhtC a 37°C durante 18 horas en un caldo nutriente con 100 mg/ml de ampicilina y 100 mg/l de estreptomina, y se inocularon 0,3 ml del cultivo obtenido en 3 ml de un medio de fermentación descrito anteriormente y que contiene 100 mg/l de ampicilina y 100 mg/l de estreptomina, en un tubo de ensayo de 20 x 200 mm, y se cultivaron a 37°C durante 46 horas con un agitador giratorio. Tras el cultivo, se determinaron, mediante métodos conocidos, la cantidad acumulada de treonina en el medio, y la absorbancia a 560 nm del medio.

20 Los resultados se muestran en la Tabla 4. Como se muestra en la Tabla 4, la cepa MG442/pVIC40, pRhtC acumuló treonina en una cantidad mayor que la cepa MG442/pVIC40, pUC21, en la que el gen *rhtC* no estaba potenciado.

Tabla 4

Cepa	OD ₅₆₀	Cantidad acumulada de treonina (g/l)
MG442/pVIC40, pUC21	17,4	4,9
MG442/pVIC40, pRhtC	15,1	10,2

30 Ejemplo 4: efecto concertado del gen *rhtB* y del gen *rhtC* sobre la producción de aminoácidos

El fragmento de ADN de SacII-SacII, que contiene tanto el gen *rhtB* como el gen *rhtC*, se insertó en el pUC21. De este modo se obtuvo el plásmido pRhtBC que contiene el gen *rhtB* y el gen *rhtC* (Fig. 4).

35 Después, la cepa NZ10 se transformó con pUC21, pRhtB, pRhtC o pRhtBC, y de este modo se obtuvieron los transformantes NZ10/pUC21 (VKPM B-7685), NZ10/pRhtB (VKPM B-7683), NZ10/pRhtC (VKPM B-7684), NZ10/pRhtB, pRhtC (VKPM B-7681) y NZ10/pRhtBC (VKPM B-7682).

40 Los transformantes obtenidos anteriormente se cultivaron de la misma manera como se describe antes, y se determinaron las cantidades acumuladas de diversos aminoácidos en el medio y la absorbancia a 540 nm del medio, mediante métodos conocidos.

45 Los resultados se muestran en la Tabla 5. Se concluye a partir de la Tabla 5 que existe un efecto concertado del pRhtB y del pRhtC sobre la producción de homoserina, valina y leucina. Estos resultados indican que los productos de los genes *rhtB* y *rhtC* pueden interactuar en las células.

Tabla 5

Cepa	OD ₅₆₀	Homoserina (g/l)	Valina (g/l)	Leucina (g/l)
NZ10/pUC21	18,7	0,6	0,22	0,16
NZ10/pRhtB	19,6	2,3	0,21	0,14
NZ10/pRhtC	20,1	0,7	0,2	0,15
NZ10/pRhtBC	21,8	4,2	0,34	0,44
NZ10/pRhtB, pRhtC	19,2	4,4	0,35	0,45

50 Ejemplo 5: efecto del gen *rhtB* y del gen *rhtC* sobre la resistencia a aminoácidos

Como se describe anteriormente, los plásmidos que contienen el *rhtB* y *rhtC* tienen un efecto positivo sobre la acumulación de algunos aminoácidos en caldo de cultivo por cepas diferentes. Se demostró que el patrón de aminoácido acumulado dependía del genotipo de la cepa. La homología de los productos de los genes *rhtB* y *rhtC*

con el transportador de lisina LysE de *Corynebacterium glutamicum* (Vrljic, M., Sahm, H. y Eggeling, L. (1996) Mol. Microbiol. 22, 815-826) indica la función de análogos para esas proteínas.

Por lo tanto, se ensayó el efecto de los plásmidos pRhtB y pRhtC sobre la susceptibilidad de la cepa N99, que es un mutante resistente a estreptomicina (Str^R) de la cepa conocida W3350 (VKPM B-1557), a algunos aminoácidos y análogos de aminoácidos. Se diluyeron cultivos de caldo de toda la noche (109 cfu/ml) de las cepas N99/pUC21, N99/pRhtB y N99/pRhtC en medio mínimo M9 1:100, y se hicieron crecer durante 5 h en el mismo medio. Después, los cultivos de fase log así obtenidos se diluyeron, y se aplicaron alrededor de 10^4 células viables a placas de ensayo bien secas con agar M9 (2%) que contienen incrementos del doble de aminoácidos o análogos. De este modo, se examinó la concentración inhibidora mínima (MIC) de estos compuestos.

Los resultados se muestran en la Tabla 6. Se concluye a partir de la Tabla 6 que múltiples copias de *rhtB* confieren, además de resistencia a homoserina, resistencia a ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHBA) y a S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), y 4-aza-DL-leucina; y que múltiples copias del gen *rhtC*, además de la resistencia a treonina, aumentaron la resistencia a valina, histidina y AHVA. Este resultado indica que cada uno de los transportadores que se presuponen, *RhtB* y *RhtC*, tienen especificidad por varios sustratos (aminoácidos), o pueden mostrar efectos no específicos como resultado de la amplificación.

Tabla 6

Sustrato	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	N99/pUC21 ^{res}	N99/pRhtB	N99/pRhtC
L-homoserina	1000	20000	1000
L-treonina	30000	4000	80000
L-valina	0,5	0,5	2,0
L-histidina	5000	5000	40000
AHVA	100	2000	15000
AEC	5	20	5
4-aza-DL-leucina	50	100	50
O-metil-L-treonina	20	20	20

*: Se obtuvieron los mismos datos con N99/pUK21

Listado de secuencias

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120>

<130> EPA-53286

<140> 99125406.1

<141> 20-12-1999

<150> RU-98123511

<151> 23-12-1998

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1231

<212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> CDS

<222> (557)..(1171)

<400> 1

```

agaaataatg tggagatcgc accgcccatac gaatgtgccg gtatatagcg tttacgccac 60
ggaccgggct gaacctcctg ctgccagaat gccgccagat catcaacata atcattaaag 120
cgattaacat gcccgagatg cggatcggct aacaggcgac cggaaacgtcc ctgcccgcga 180
tggctcgatga ttaagacatc aaaccocaaa tggaacaggt cataggccag ttccgcatat 240
tttacgtagc tctcaatacg ccccgggcag atgactacca cccggtcag gtgctgtgcg 300
cgaaaacgga caaagcgcac cggaatgtca tccacaccag taaactctgc ttcatacgc 360
tgacgccaga aatcagtcag cggtcctcatg gtaaaagcag caaacgcgtt ttctcttgtt 420
tcccagtcct tttgctgctg aaacatcggg taatctgcct cttaaaccac gtaaaatcgt 480
tttttttagc gtgcctgaca caacgctgcg acagtagcgt attgtggcac aaaaatagac 540
acaccgggag ttcatac atg acc tta gaa tgg tgg ttt gcc tac ctg ctg aca 592
      Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr
            1             5             10
tcg atc att tta acg ctg tgc cca ggc tct ggt gca atc aac act atg 640
Ser Ile Ile Leu Thr Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ala Ile Asn Thr Met
            15             20             25
acc acc tgc ctc aac cac ggt tat ccg gcc ggt ggc gtc tat tgc tgg 688
Thr Thr Ser Leu Asn His Gly Tyr Pro Ala Gly Gly Val Tyr Cys Trp
            30             35             40

gct tca gac cgg act ggc gat tca tat tgt gct ggt tgg cgt ggg gtt 736
Ala Ser Asp Arg Thr Gly Asp Ser Tyr Cys Ala Gly Trp Arg Gly Val
45             50             55             60
ggg acg cta ttt tcc cgc tca gtg att gcg ttt gaa gtg ttg aag tgg 784
Gly Thr Leu Phe Ser Arg Ser Val Ile Ala Phe Glu Val Leu Lys Trp
65             70             75
gca ggc gcg gct tac ttg att tgg ctg gga atc cag cag tgg cgc gcc 832
Ala Gly Ala Ala Tyr Leu Ile Trp Leu Gly Ile Gln Gln Trp Arg Ala
80             85             90
gct ggt gca att gac ctt aaa tgc ctg gcc tct act caa tgc cgt cga 880
Ala Gly Ala Ile Asp Leu Lys Ser Leu Ala Ser Thr Gln Ser Arg Arg
95             100             105
cat ttg ttc cag cgc gca gtt ttt gtg aat ctc acc aat ccc aaa agt 928
His Leu Phe Gln Arg Ala Val Phe Val Asn Leu Thr Asn Pro Lys Ser
110             115             120
att gtg ttt ctg gcg gcg cta ttt ccg caa ttc atc atg ccg caa cag 976
Ile Val Phe Leu Ala Ala Leu Phe Pro Gln Phe Ile Met Pro Gln Gln
125             130             135             140
ccg caa ctg atg cag tat atc gtg ctc ggc gtc acc act att gtg gtc 1024
Pro Gln Leu Met Gln Tyr Ile Val Leu Gly Val Thr Thr Ile Val Val
145             150             155
gat att att gtg atg atc ggt tac gcc acc ctt gct caa cgg att gct 1072
Asp Ile Ile Val Met Ile Gly Tyr Ala Thr Leu Ala Gln Arg Ile Ala
160             165             170
cta tgg att aaa gga cca aag cag atg aag gcg ctg aat aag att ttc 1120
Leu Trp Ile Lys Gly Pro Lys Gln Met Lys Ala Leu Asn Lys Ile Phe
175             180             185
ggc tgc ttg ttt atg ctg gtg gga gcg ctg tta gca tgc gcg agg cat 1168
Gly Ser Leu Phe Met Leu Val Gly Ala Leu Leu Ala Ser Ala Arg His
190             195             200
gcg tgaataataa tgcggatgc ggcgtaaacg ccttatccga cttactctga 1221
Ala
205
agacgcgtct 1231

```

<210> 2
 5 <211> 205
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 2

10

Met Thr Leu Glu Trp Trp Phe Ala Tyr Leu Leu Thr Ser Ile Ile Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Pro Gly Ser Gly Ala Ile Asn Thr Met Thr Thr Ser Leu
 20 25 30
 Asn His Gly Tyr Pro Ala Gly Gly Val Tyr Cys Trp Ala Ser Asp Arg
 35 40 45

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

<210> 3
 <211> 840
 5 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (187)..(804)

<400> 3

```

atgccgatca ccgccagcga aatgctcagc gttacggcg ttgggatgcg caagctggaa 60
cgcttttgca aaccgtttat ggccgtgatt cgtgcgcatg ttgatggcga tgacgaagag 120
tagtcagcag cataaaaaag tgccagtatg aagactccgt aaacgtttcc ccgcgagtc 180
aaatgt atg ttg atg tta ttt ctc acc gtc gcc atg gtg cac att gtg 228
Met Leu Met Leu Phe Leu Thr Val Ala Met Val His Ile Val
1 5 10
gcg ctt atg agc ccc ggt ccc gat ttc ttt ttt gtc tct cag acc gct 276
Ala Leu Met Ser Pro Gly Pro Asp Phe Phe Phe Val Ser Gln Thr Ala
15 20 25 30
gtc agt cgt tcc cgt aaa gaa gcg atg atg ggc gtg ctg ggc att acc 324
Val Ser Arg Ser Arg Lys Glu Ala Met Met Gly Val Leu Gly Ile Thr
35 40 45
tgc ggc gta atg gtt tgg gct ggg att gcg ctg ctt ggc ctg cat ttg 372
Cys Gly Val Met Val Trp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Gly Leu His Leu
50 55 60
att atc gaa aaa atg gcc tgg ctg cat acg ctg att atg gtg ggc ggt 420

```

```

Ile Ile Glu Lys Met Ala Trp Leu His Thr Leu Ile Met Val Gly Gly
65 70 75
ggc ctg tat ctc tgc tgg atg ggt tac cag atg cta cgt ggt gca ctg 468
Gly Leu Tyr Leu Cys Trp Met Gly Tyr Gln Met Leu Arg Gly Ala Leu
80 85 90
aaa aaa gag gcg gtt tct gca cct gcg cca cag gtc gag ctg gcg aaa 516
Lys Lys Glu Ala Val Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Glu Leu Ala Lys
95 100 105 110
agt ggg cgc agt ttc ctg aaa ggt tta ctg acc aat ctc gct aat ccg 564
Ser Gly Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro
115 120 125
aaa gcg att atc tac ttt ggc tgc gtg ttc tca ttg ttt gtc ggt gat 612
Lys Ala Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp
130 135 140
aac gtt ggc act acc gcg cgc tgg ggc att ttt gcg ctg atc att gtc 660
Asn Val Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val
145 150 155
gaa acg ctg gcg tgg ttt acc gtc gtt gcc agc ctg ttt gcc ctg ccg 708
Glu Thr Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro
160 165 170
caa atg cgc cgt ggt tat caa cgt ctg gcg aag tgg att gat ggt ttt 756
Gln Met Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe
175 180 185 190
gcc ggg gcg tta ttt gcc gga ttt ggc att cat ttg att att tcg cgg 804
Ala Gly Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
195 200 205
tgatgccaga cgcgtcttca gataagtcg gataag 840

```

<210> 4
 <211> 206
 5 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 4

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

100 105 110
 Arg Ser Phe Leu Lys Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asn Pro Lys Ala
 115 120 125
 Ile Ile Tyr Phe Gly Ser Val Phe Ser Leu Phe Val Gly Asp Asn Val
 130 135 140
 Gly Thr Thr Ala Arg Trp Gly Ile Phe Ala Leu Ile Ile Val Glu Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Trp Phe Thr Val Val Ala Ser Leu Phe Ala Leu Pro Gln Met
 165 170 175
 Arg Arg Gly Tyr Gln Arg Leu Ala Lys Trp Ile Asp Gly Phe Ala Gly
 180 185 190
 Ala Leu Phe Ala Gly Phe Gly Ile His Leu Ile Ile Ser Arg
 195 200 205

REIVINDICACIONES

1. Método para producir el aminoácido L-homoserina o L-treonina, que comprende las etapas siguientes:

5 cultivar una bacteria, que presenta la capacidad para producir el aminoácido, en un medio de cultivo, para producir y acumular el aminoácido en el medio, y

10 recuperar el aminoácido a partir del medio, perteneciendo dicha bacteria al género *Escherichia*, en el que la resistencia a L-treonina de dicha bacteria está potenciada potenciando la actividad de una proteína como se define en los apartados (A) o (B) siguientes en las células de dicha bacteria:

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 4 en el listado de secuencias; o

15 (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que incluye una supresión, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 4 en el listado de secuencias, y que presenta la actividad de hacer que una bacteria presente la proteína resistente a L-treonina,

20 en el que la proteína está codificada por un ADN que se define en los apartados (a) o (b) siguientes:

(a) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 187 a 804 en SEC ID nº: 3;

25 (b) un ADN que se hibrida con una secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 187 a 804 en SEC ID nº: 3 en una condición restrictiva, y que codifica una proteína que presenta la actividad de hacer que una bacteria presente la proteína resistente a L-treonina, en el que la condición restrictiva es una condición en la que el lavado se realiza a 60°C y a una concentración salina que corresponde a 1 x SSC y 0,1% de SDS.

30 2. Método según la reivindicación 1, en el que la resistencia a L-homoserina de dicha bacteria está potenciada además potenciando la actividad de una proteína como se define en los apartados (C) o (D) siguientes en las células de dicha bacteria:

(C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 2 en el listado de secuencias; o

35 (D) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que incluye una supresión, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 2 en el listado de secuencias, y que presenta la actividad de hacer que una bacteria presente la proteína resistente a L-homoserina.

40 3. Método según la reivindicación 2, en el que la proteína como se define en (C) o (D) está codificada por un ADN que se define en los puntos (c) o (d) siguientes:

(c) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 557 a 1171 en SEC ID nº: 1;

45 (d) un ADN que se hibrida con una secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 557 a 1171 en SEC ID nº: 1 en una condición restrictiva, y que codifica una proteína que presenta la actividad de hacer que una bacteria presente la proteína resistente a L-homoserina, en el que la condición restrictiva es una condición en la que el lavado se realiza a 60°C y a una concentración salina que corresponde a 1 x SSC y 0,1% de SDS.

4. Método para producir un aminoácido, que comprende las etapas siguientes:

55 cultivar una bacteria, que presenta la capacidad para producir el aminoácido, en un medio de cultivo, para producir y acumular el aminoácido en el medio, y

60 recuperar el aminoácido a partir del medio, perteneciendo dicha bacteria al género *Escherichia*, en el que la resistencia a L-treonina de dicha bacteria está potenciada potenciando la actividad de una proteína como se define en los apartados (A) o (B) siguientes en las células de dicha bacteria:

(A) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 4 en el listado de secuencias; o

65 (B) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que incluye una supresión, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 4 en el listado de secuencias, y que presenta la actividad de hacer que una bacteria presente la proteína resistente

a L-treonina,

en el que la proteína está codificada por un ADN que se define en los apartados (a) o (b) siguientes:

- 5 (a) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 187 a 804 en SEC ID nº: 3;
- (b) un ADN que se hibrida con una secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 187 a 804 en SEC ID nº: 3 en una condición restrictiva, y que codifica una proteína que presenta la actividad de hacer que una bacteria presente la proteína resistente a L-treonina, en el que la condición restrictiva es una condición en la
- 10 que el lavado se realiza a 60°C y a una concentración salina que corresponde a 1 x SSC y 0,1% de SDS, y

en el que la resistencia a L-homoserina de dicha bacteria está potenciada además potenciando la actividad de una proteína como se define en los apartados (C) o (D) siguientes en las células de dicha bacteria:

- 15 (C) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 2 en el listado de secuencias; o
- (D) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos que incluye una supresión, sustitución, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº: 2 en el
- 20 listado de secuencias, y que presenta la actividad de hacer que una bacteria presente la proteína resistente a L-homoserina.

5. Método según la reivindicación 4, en el que dicho aminoácido es un aminoácido de cadena ramificada.

25 6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho aminoácido de cadena ramificada es L-valina o L-leucina.

7. Método según la reivindicación 4, en el que la proteína como se define en (C) o (D) está codificada por un ADN que se define en los apartados (c) o (d) siguientes:

- 30 (c) un ADN que comprende la secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 557 a 1171 en SEC ID nº: 1;
- (d) un ADN que se hibrida con una secuencia nucleotídica de números de nucleótidos 557 a 1171 en SEC ID nº: 1 en una condición restrictiva, y que codifica una proteína que presenta la actividad de hacer que una bacteria presente la proteína resistente a L-homoserina, en el que la condición restrictiva es una condición
- 35 en la que el lavado se realiza a 60°C y a una concentración salina que corresponde a 1 x SSC y 0,1% de SDS.

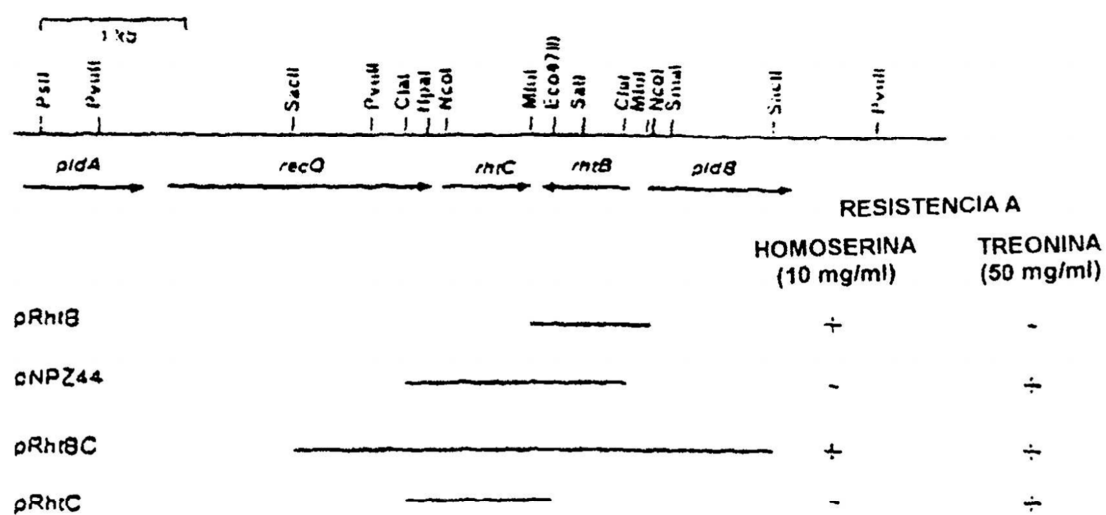


Fig. 1

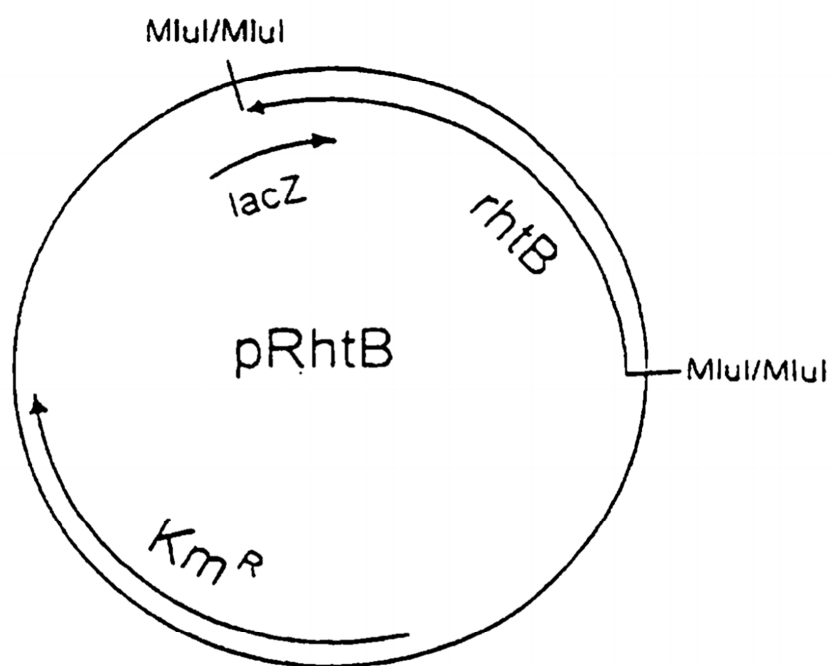


Fig. 2

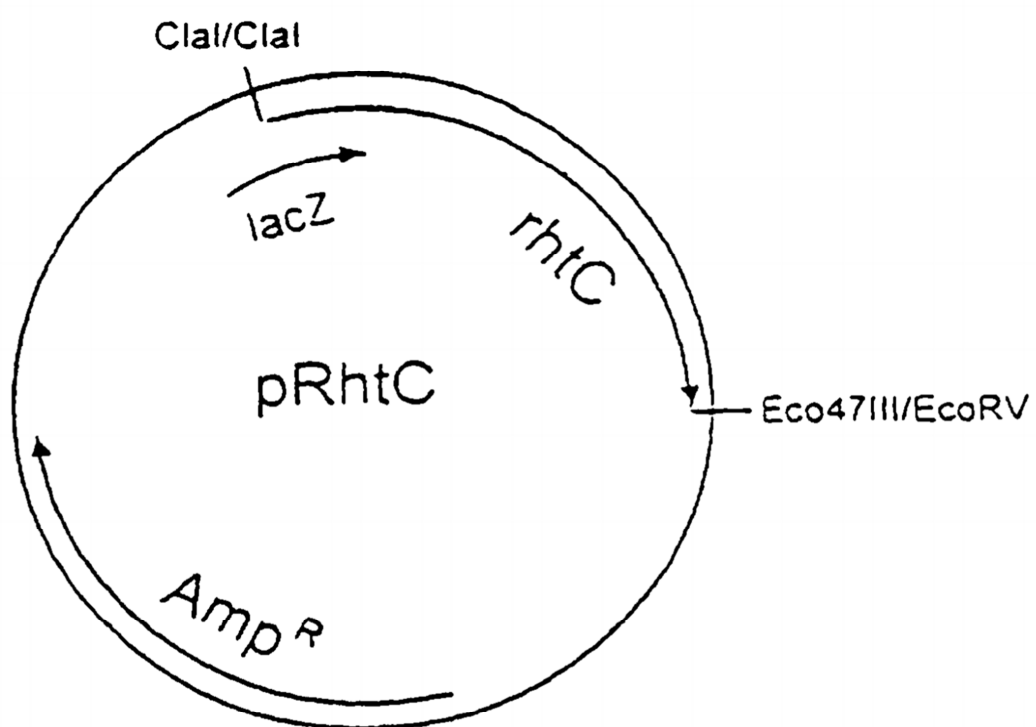


Fig. 3

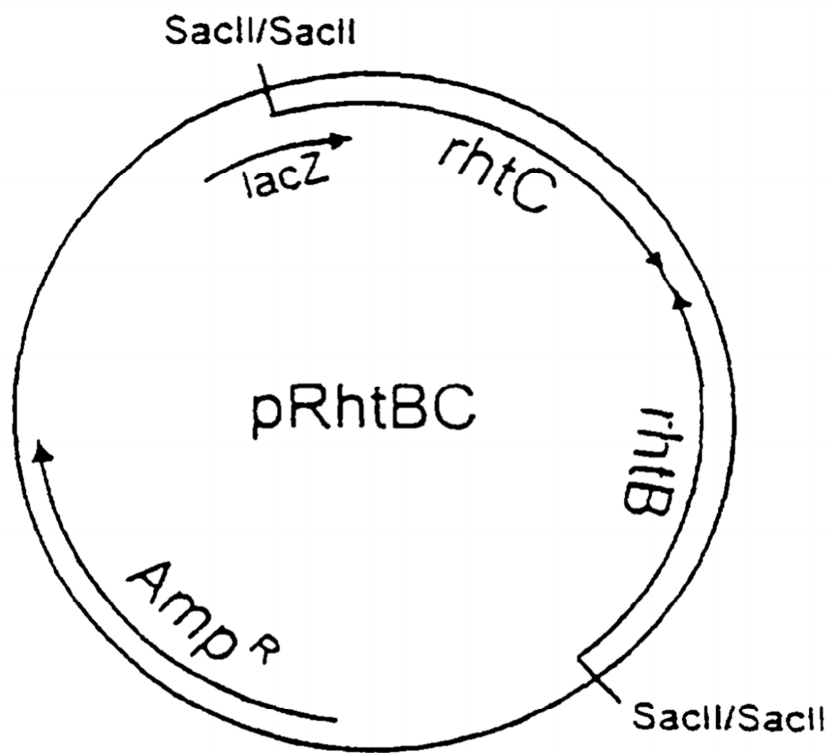


Fig. 4