

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 473**

51 Int. Cl.:
C12P 13/08 (2006.01)
C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05356022 .3**
96 Fecha de presentación: **04.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1561811**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.08.2005**

54 Título: **Procedimiento de producción de L-treonina usando un microorganismo que tiene el gen galR inactivado**

30 Prioridad:
05.02.2004 KR 2004007529

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2012

73 Titular/es:
CJ CheilJedang Corporation
500, NAMDAEMUNRO 5-GA
JUNG-GU SEOUL, KR

72 Inventor/es:
Park, Young Hoon;
Lee, Byoung Choon;
Cho, Kwang Myung;
Kim, Dae Cheol;
Shin, Yong Uk y
Lee, Jin Ho

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 382 473 T3

DESCRIPCION

Procedimiento de producción de L-treonina usando un microorganismo que tiene el gen galR inactivado

Antecedentes de la invención**1. Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de L-treonina usando un microorganismo.

2. Descripción de la técnica relacionada

La L-treonina es un aminoácido esencial y está siendo ampliamente usado como un aditivo de piensos y alimentos, e igualmente como un producto farmacéutico y materia prima para la síntesis de algunos fármacos. Está siendo producido mediante fermentación con mutantes artificiales del género *Escherichia*, bacterias *Corineformes*, *Serratia* y *Providencia*. Por ejemplo, la Publicación de Patente Japonesa No.10037/81 divulga un procedimiento de producción de L-treonina que usa una cepa pertenece al género *Escherichia*, la cual tiene una necesidad por el ácido diaminopimérico y la metionina, y tiene la resistencia a la inhibición del retorno por treonina del sistema de biosíntesis de la treonina. La Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Consulta Pública No. 224684/83 divulga un procedimiento de producción de L-treonina que usa una cepa que pertenece al género *Brevibacterium*, la cual es resistente a la S-(2-aminoetil)-L-cisteína y al ácido α -amino- β -hidroxi valérico y tiene una necesidad nutricional por la L-treonina y la L-lisina. La Solicitud de Patente Coreana Abierta a Consulta Pública No. 8022/87 divulga un procedimiento de producción de L-treonina que usa un ácido diaminopimérico y una cepa resistente al ácido α -amino- β -hidroxi valérico, que requiere metionina, que pertenece al género *Escherichia*, la cual tiene una resistencia adicional a al menos una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en rifampicina, lisina, metionina, ácido aspártico, y homoserina, o tiene una capacidad reducida para descomponer la L-treonina. La Solicitud de Patente Japonesa Abierta a Consulta Pública No. 219582/90 divulga un procedimiento de producción de L-treonina que usa una cepa que pertenece al género *Providencia*, la cual es resistente al ácido α -amino- β -hidroxi valérico, L-etionina, tiaisoleucina, oxitiamina, y sulfaguanidina, y tiene una necesidad por la L-leucina e igualmente una merma de necesidad por la L-isoleucina.

Sin embargo, los procedimientos conocidos anteriores tienen las desventajas de que no permiten proporcionar una alta producción de L-treonina o bien requieren costosas necesidades tales como ácido diaminopimérico e isoleucina. En otras palabras, el uso de cepas que requieren ácido diaminopimérico en la producción de L-treonina incluye una fermentación adicional de ácido diaminopimérico y, en consecuencia, puede incrementarse el costo. Cuando se usa una cepa que tiene una necesidad por la isoleucina para la producción de L-treonina, la costosa isoleucina debe agregarse al medio de fermentación, lo cual incrementa el costo.

En un intento para obviar estas desventajas, los autores de la presente invención han desarrollado una cepa para la producción de L-treonina de *Escherichia coli* que es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico, y tiene una necesidad nutricional por la metionina y una merma de necesidad por la isoleucina. Los presentes autores han producido con éxito L-treonina mediante fermentación con la cepa con rendimientos más altos que con las cepas anteriores. La cepa y un procedimiento para la producción de L-treonina usando dicha cepa están divulgados en la Publicación de Patente Coreana No. 92-8365.

La proteína galP se la conoce como permeasa, la cual transporta diversos sacáridos tales como galactosa y glucosa al interior de las células (véase, por ejemplo, V. Hernández-Montalvo, F. Valle, F. Bolívar, G. Gosset., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 57, págs. 186-71, (2001)). La proteína galR reprime la expresión del gen galP en las células (véase, por ejemplo, Mark Geanakopoulou y Sankar Adhya, *Journal of Bacteriology*, vol. 179, no.1, págs. 228-234, Enero 1997).

Los autores de la presente invención han estudiado intensivamente la forma de seleccionar cepas que tengan capacidad mejorada para producir L-treonina en base a las tecnologías convencionales y han descubierto que la biosíntesis de L-treonina puede facilitarse mediante la inactivación del gen galR.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona un microorganismo que tiene una capacidad mejorada para producir L-treonina.

La presente invención proporciona igualmente un procedimiento para la producción de manera eficaz de L-treonina usando el microorganismo.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un procedimiento de producción de L-treonina, tal como se define en la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

Las anteriores y otras características y ventajas de la presente invención resultarán más evidentes mediante la descripción detallada de realizaciones a modo de ejemplo de las mismas con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

La FIG. 1 representa una construcción del plásmido recombinante pTblue/galR que incluye un gen galR; y

La FIG. 2 representa una construcción de un fragmento de ADN Δ galR::loxpKAN a partir del plásmido recombinante pT7bluegalR::loxpKAN.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona un microorganismo capaz de producción de L-treonina y que tiene un gen galR inactivado.

En la presente invención, el microorganismo puede producir L-treonina y tiene un gen galR inactivado. El microorganismo está seleccionado entre el grupo que consiste en *Escherichia coli* FTR2541 (KCCM-10539), *Escherichia coli* FTR2537 (KCCM-10540) y *Escherichia coli* FTR2533 (KCCM-10541).

10 Igualmente, el microorganismo puede incluir mutantes que producen L-treonina así como microorganismos naturales. Los ejemplos de estos mutantes incluyen microorganismos que pertenecen a *Escherichia coli* que produce L-treonina, los cuales son resistentes a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico, y tienen una necesidad nutricional por la metionina y una merma de necesidad por la isoleucina; y microorganismo mutado en el cual el menos una copia del gen fosfoenol piruvato carboxilasa (pcc) y los genes thrA, thrB, y thrC contenidos en un operón de treonina está insertada adicionalmente en un ADN cromosómico, además del gen pcc intrínseco y de genes en el operón de treonina; los microorganismos que tienen un gen pckA activado el cual está implicado en la conversión de oxaloacetato (OAA), el cual es un compuesto intermedio para la biosíntesis de L-treonina, dentro del fosfoenolpiruvato (PEP); microorganismos mutados que tienen el gen pckA inactivado y el gen aspA que convierten el aspartato (Asp), el cual es otro compuesto intermedio para la biosíntesis de L-treonina, en fumarato; y microorganismos que tienen un gen tyrR inactivado, el cual reprime la expresión del gen tyrB necesario para la biosíntesis de L-treonina. El análogo de L-metionina puede ser al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en D,L-etionina, norleucina, α -metilmetionina y L-metionina-D,L-sulfoximina. El análogo de L-treonina puede ser al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en ácido α -amino- β -hidroxi valérico e hidroximato de D,L-treonina. El análogo de L-lisina puede ser al menos un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en S-(2-aminoetil)-L-cisteína y δ -metil-L-lisina.

En la presente invención, la proteína galR reprime la expresión del gen galP que codifica la galactosa permeasa, la cual transporta la galactosa al interior de las células. Para la *Escherichia coli*, el gen galR es conocido y puede obtenerse a partir de la secuencia del genoma publicado por Blattner y otros, (*Science*, vol. 277, págs. 1453-1462, (1997)) (No. de Acceso AAC75876). La secuencia del genoma puede igualmente obtenerse del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en los Estados Unidos de América y del DNA DATA Bank of Japan (DDBJ). Igualmente, el gen galR incluye un alelo generado por la atenuación del código genético o por mutación. La "inactivación" tal como se usa en la presente invención, se refiere a la no expresión de una proteína galR activa. En consecuencia, la inactivación del gen galR conduce a un incremento en la expresión del gen galP.

El microorganismo de la presente invención puede producirse mediante la inactivación de un galR presente sobre un cromosoma de un microorganismo capaz de producir L-treonina. El procedimiento de inactivación puede incluir el causar la mutación usando luz, tal como rayos UV, o productos químicos y el aislamiento de cepas que tienen un gen galR inactivado a partir de los mutantes. El procedimiento de inactivación incluye igualmente una tecnología de recombinación de ADN. La recombinación de ADN puede lograrse, por ejemplo, inyectando una secuencia de nucleótido o un vector que incluya una secuencia de nucleótido con homología con respecto al gen galR dentro del microorganismo para causar la recombinación del homólogo. La secuencia de nucleótido y el vector inyectado puede incluir un marcador seleccionable dominante.

La presente invención proporciona igualmente un procedimiento de producción de un microorganismo que produce L-treonina, el cual incluye: la preparación de un gen galR inactivado o fragmento de ADN del mismo; la introducción del gen galR inactivado o del fragmento de ADN del mismo dentro de un microorganismo capaz de producir L-treonina para causar la recombinación con un gen galR presente sobre un cromosoma del microorganismo; y la selección del microorganismo que tiene un gen galR inactivado.

El "gen galR inactivado o fragmento de ADN del mismo" tal como se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de polinucleótido que tiene una homología de secuencia con respecto al gen galR en un huésped, pero que no es capaz de expresar una proteína galR activa debido a la pérdida, sustitución, truncado, e inversión. La introducción del gen galR inactivado o fragmento de ADN del mismo dentro de una célula huésped puede lograrse, por ejemplo, mediante transformación, conjugación, transducción o electroporación, pero no está limitada a los mismos.

Cuando el gen galR inactivado o fragmento del mismo se introduce dentro de la célula huésped mediante transformación, el procedimiento de inactivación puede llevarse cabo mezclando la secuencia del polinucleótido con un cultivo de la cepa. Aunque la cepa sea competente de manera natural para captar el ADN a transformar, se prefiere que la cepa pueda transformarse previamente en competente para captar el ADN mediante cualquier procedimiento adecuado (véanse, por ejemplo, LeBlanc, y otros, *Plasmid*, vol. 28, págs. 130-145, (1992); Pozzi y otros, *J. Bacteriol.*, vol. 178, págs. 6087-6090, (1996)). El gen galR inactivado o fragmento de ADN del mismo tiene una pieza de

ADN extraño introducida en un fragmento de ADN del genoma y reemplaza la copia cromosómica de tipo salvaje de la secuencia con un estado inactivado. En una realización de la presente invención, la secuencia del polinucleótido inactivado incluye "colas" que comprenden una parte del ADN del sitio diana en los extremos 5' y 3' del mismo. Las colas deberían ser de al menos 50 pares de bases y preferiblemente mayores de 200 a 500 pares de bases para una eficaz recombinación y/o conversión del gen. Por motivos de conveniencia, la secuencia del polinucleótido inactivado puede incluir un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos. Cuando el ADN diana es interrumpido con un gen de resistencia a antibióticos, la selección de los transformantes se lleva a cabo sobre placas de agar que contienen proporciones adecuadas de un antibiótico apropiado. Después de la transformación, la secuencia del polinucleótido inactivado introducida dentro de la célula huésped lleva cabo la recombinación del homólogo con las colas de ADN genómico, dando como resultado la inactivación de la secuencia genómica de tipo salvaje. Los episodios de recombinación de inactivación pueden confirmarse fácilmente, por ejemplo, mediante transferencia Southern, o de manera más conveniente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Un procedimiento de producción del microorganismo que produce L-treonina de la presente invención comprende los procedimientos siguientes.

En primer lugar, el ADN genómico se aísla a partir de una cepa que es capaz de producir L-treonina y se lleva a cabo el PCR usándolo como un molde mediante una tecnología convencional con el fin amplificar el gen galR.

A continuación, el gen galR obtenido se clona dentro de un plásmido adecuado u otro vector. El vector recombinante se introduce mediante transducción dentro de una célula huésped tal como E. coli. Después de que el transformante se ha desarrollado y las células se han aislado, se extrae el vector recombinante que tiene los genes galR. A continuación, se inserta un gen resistente a antibióticos dentro del gen galR del vector recombinante extraído para formar un vector recombinante que tiene un gen galR inactivado. Este vector recombinante se introduce mediante transformación dentro de una célula huésped y se cultiva la célula huésped. A continuación, el vector recombinante propagado se aísla del transformante resultante, y la secuencia del polinucleótido que tiene el gen galR inactivado se obtiene mediante la digestión(es) de la enzima de restricción adecuada. A continuación, esta secuencia del polinucleótido se introduce dentro de un huésped que es capaz de producir L-treonina mediante una técnica convencional tal como electroporación. Los microorganismos que tienen una resistencia a antibióticos son los seleccionados para aislar microorganismos que tienen un gen galR inactivado.

Los técnicos expertos reconocerán que la secuencia del polinucleótido inactivado de esta invención puede generarse mediante procedimientos de clonación generales. Por ejemplo, pueden usarse procedimientos de amplificación por PCR que usan cebadores de oligonucleótidos dirigidos al gen galR. Los procedimientos de amplificación por PCR son ampliamente conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Ed. M. Innis y otros, Academic Press, (1990)). La PCR comprende ADN genómico, enzimas, cebadores, y tampones adecuados, y se lleva a cabo de manera conveniente en un DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn. USA). Un resultado por PCR positivo se determina, por ejemplo, mediante la detección de un fragmento de ADN de tamaño apropiado, seguido de electroforesis en gel de agarosa.

En una realización de la presente invención, se prepararon los plásmidos recombinantes pT7blue/galR y pT7bluegalR::loxpKAN y, a partir de ellos, se obtuvo una secuencia del polinucleótido inactivada Δ galR::loxpKAN. A continuación, una cepa de Escherichia coli que es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene una necesidad nutricional por la metionina y una merma de necesidad por la isoleucina, fundamentalmente Escherichia coli No. de Acceso KCCM 10236; Escherichia coli FTR2717 que tiene un gen pckA inactivado; Escherichia coli FTR8625 que tiene un gen pckA y un gen aspA (No. de Acceso KCCM 10544 inactivados; y Escherichia coli FTR7624 que tiene un gen tyrR inactivado que hace regresar la expresión del gen tyrR necesario para la biosíntesis de L-treonina (No. de Acceso KCCM 10538), se transformaron con la secuencia del polinucleótido inactivada Δ galR::loxpKAN mediante electroporación. Como un resultado de ello, el gen galR de tipo salvaje se inactivó para los tres tipos de nuevas cepas capaces de producir una mayor concentración de L-treonina que las cepas prototipo. Las nuevas cepas se designaron como Escherichia coli FTR2541, Escherichia coli FTR2537 y Escherichia coli FTR2533 y se depositaron de acuerdo con Tratado de Budapest en el Korean Culture Center of Microorganisms el 4 de Diciembre de 2004 asignándoselas los Nos. de Registro KCCM-10539, KCCM-10540 y KCCM-10541.

La Escherichia coli FTR2541 se obtuvo a partir de la Escherichia coli No. de Acceso KCCM 10236 la cual se había obtenido de la Escherichia coli TFT4076. La Escherichia coli TF4076 (KFCC10718) requiere metionina y tiene resistencia a análogos de treonina (por ejemplo, ácido α -amino- β -hidroxi valérico, AHV), análogos de lisina (por ejemplo, S-(2-aminooetil-L-cisteína, AEC), análogos de isoleucina (por ejemplo, ácido α -aminobutírico), análogos de metionina (por ejemplo, etionina), y similares. La Escherichia coli No. de Acceso KCCM TF4076 ha sido descrita en la Publicación de Patente Coreana No. 92-8365 a la cual el técnico experto puede referirse. El fosfoenol piruvato (PEP) es un precursor de oxaloacetato el cual es un compuesto intermedio de la vía de la biosíntesis de L-treonina. El gen ppc y el operón thr originados a partir de los cromosomas de Escherichia coli No. de Acceso KCCM TF4076, se amplificaron mediante PCR y se integraron adicionalmente dentro de los cromosomas de la Escherichia coli No. de Registro KCCM TF4076 para generar la Escherichia coli No. de Acceso KCCM 10236. De esta forma, la Escherichia coli No. de Acceso KCCM 10236 posee dos genes ppc y dos operones treonina. La Escherichia coli No. de Acceso KCCM 10236 es, en consecuencia, capaz de expresar mayores niveles de los genes pcc que catalizan la formación de oxaloacetato a partir de PEP y las enzimas necesarias para la biosíntesis de treonina a partir de aspartato (thrA:

aspartoquinasa I-homoserina deshidrogenasa, thrB: homoserina quinasa, thrC: treonina sintasa), haciendo posible, de esta forma, un incremento en la producción de L-treonina. La *Escherichia coli* FTR2537 se obtuvo a partir de *Escherichia coli* TFR8625 la cual se había obtenido a partir de la *Escherichia coli* No. de Acceso KCCM 10236. El gen pckA y el gen aspA se inactivaron en un cromosoma de la *Escherichia coli* No. de Acceso KCCM 10236 para mejorar la producción de L-treonina. La *Escherichia coli* FTR2533 se obtuvo a partir de la *Escherichia coli* TFR7624 la cual se había obtenido de la *Escherichia coli* No. de Acceso KCCM 10236. El gen tyrR se inactivó en un cromosoma de la *Escherichia coli* No. de Acceso KCCM 10236 para mejorar la producción de L-treonina.

La presente invención proporciona un procedimiento de producción de L-treonina: cultivo del microorganismo capaz de producir L-treonina y que tiene un gen galR inactivado; y aislamiento de la L-treonina a partir del cultivo.

En el procedimiento de producción de L-treonina, el cultivo puede llevarse a cabo en un medio de cultivo adecuado bajo condiciones de cultivo adecuadas conocidas en la técnica y puede ajustarse fácilmente de acuerdo con el tipo de cepa seleccionada por los expertos en la técnica. El cultivo puede llevarse a cabo mediante operación discontinuas, operación continua, u operación por suministro de lotes (véase, por ejemplo, Biochemical Engineering, por James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, págs. 138-176).

El medio de cultivo debería cumplir de manera adecuada las exigencias de acuerdo con una cepa seleccionada. En la literatura, se encuentran descritos una diversidad de medios de cultivo (véase, por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology de la American Society for Bacteriology, Washington D.C., USA, (1981)). El medio de cultivo contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y cantidades traza de ingredientes. Los ejemplos de las fuentes de carbono incluyen carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, celulosa; grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino, aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tal como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden usarse solas o en combinación. Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno incluyen sustancias orgánicas tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración del maíz (CSL) y harina de soja; y sustancias inorgánicas tales como urea, sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato potásico y nitrato amónico. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación. En el medio de cultivo, pueden incluirse igualmente fuentes de fosfato tales como fosfato diácido potásico, fosfato ácido dipotásico, y las sales conteniendo sodio correspondientes. Igualmente, el medio de cultivo puede incluir sales de metales tales como sulfato magnésico o sulfato ferroso. Además, pueden incluirse aminoácidos, vitaminas, y los precursores apropiados. El medio de cultivo o el precursor puede agregarse al cultivo de manera discontinua o continua.

El hidróxido amónico, hidróxido potásico, amoníaco, o ácido sulfúrico, etc., se agrega de manera apropiada al cultivo durante su cultivo para ajustar el pH del cultivo. Igualmente, se agrega al cultivo un agente antiespuma tal como éster poliglicol de ácido graso para prevenir la formación de espuma. El cultivo se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas mediante la inyección de oxígeno o de gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) al cultivo.

La temperatura de cultivo está dentro del intervalo de 20 a 45°C, preferiblemente 25 a 40°C. El cultivo puede continuarse hasta que se obtenga la cantidad deseada de L-treonina, preferiblemente durante 10 a 160 horas.

La L-treonina puede aislarse a partir del cultivo mediante procedimientos ordinarios conocidos en la técnica. Los procedimientos de aislamiento incluyen centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio de iones y cristalización, etc. Por ejemplo, el sobrenadante obtenido mediante la centrifugación del cultivo a una baja velocidad para eliminar la biomasa, puede aislarse mediante cromatografía de intercambio de iones.

En lo que sigue a continuación, la presente invención se describirá más específicamente mediante ejemplos. No obstante, los ejemplos siguientes se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y, en consecuencia, la presente invención no está limitada a ellos o por ellos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de plásmido recombinante y anulación del gen galR

En el presente Ejemplo, se anuló un gen galR en un cromosoma de *Escherichia coli* mediante la recombinación de homólogos. Para ello, se preparó un vector que incluye una porción del gen galR y, a continuación, se transformó dentro de una célula del huésped *Escherichia coli*, seguido de la selección de las cepas que tienen un gen galR anulado.

El ADN genómico se extrajo a partir de la cepa de *Escherichia coli* No. de Acceso KCCM 10236 que produce L-treonina usando el QIAGEN Genomic-tip System. El fragmento de ADN (aproximadamente de 850 pb) que incluye el ORF (marco de lectura abierto) del gen galR se amplificó mediante PCR usando el ADN genómico extraído como un molde. Los cebadores usados fueron un par oligonucleótidos (SEC ID NO:1 y SEC ID NO:2). La PCR se llevó a cabo mediante 30 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en la desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, reasociación durante 30 segundos a 60°C y extensión durante 60 segundos a 72°C, en este orden.

El producto de PCR se cargó sobre gel de agarosa al 1,0% y se sometió a electroforesis. El ADN se purificó a partir de la banda del gen galR de 856 pb. El ADN purificado se ligó al sitio EcoRV del vector de clonación pT7Blue (Novagen Inc., USA) durante una noche a la temperatura de 16°C para construir el plásmido recombinante pT7Blue/galR (véase FIG. 1). El constructo del plásmido resultante se transformó dentro de Escherichia coli NM522. La cepa transformada se sembró en placa sobre medios sólidos que contenían 50 mg/l de carbenicilina y se cultivó durante una noche a una temperatura de 37°C.

Las colonias formadas se entresacaron con un anillo de platino y se inocularon dentro de 3 ml de medio LB líquido que contenía carbenicilina. Después de cultivo durante una noche, los ADNs plásmidos se extrajeron del cultivo usando QIAGEN Mini Prep Kit. El extracto de ADN plásmido se digirió con la enzima de restricción Mlu I y se confirmó la clonación del gen galR. El plásmido pT7Blue/galR confirmado se escindió con la enzima de restricción Hinc II y el ADN se purificó a partir de una banda de aproximadamente 3,8 kb en gel de agarosa al 0,8%. El ADN purificado se terminó en extremos romos mediante tratamiento con la enzima de Klenow. El fragmento de ADN resultante se ligó con los extremos romos con un fragmento de aproximadamente 1,5 kb del gen de resistencia a la kanamicina que incluía la región loxp, la cual se obtuvo mediante la digestión del plásmido pUG6 (U. Guldenre y otros, *Nucleic Acid Research*, vol. 24, (no. 13), págs. 2519-2524, (1996)) con la enzima de restricción Hinc II y EcoRV, para construir aproximadamente 5,3 kb del plásmido pT7ΔgalR::loxpKAN (véase FIG. 2).

La Escherichia coli NM522 se transformó con el plásmido recombinante pT7ΔgalR::loxpKAN. El transformante resultante se raspó y depositó sobre una placa de medio LB sólido que contenía 50 mg/l de carbenicilina y 50 mg/l de kanamicina y se cultivó durante una noche a 32°C. Las colonias formadas se entresacaron con un anillo de platino y se inocularon dentro de 3 ml de medio LB líquido que contenía carbenicilina y kanamicina. Después de cultivo durante una noche, los ADNs plásmidos se extrajeron usando QIAGEN Mini Prep Kit. El fragmento de ADN (aproximadamente de 2,3 kb) que incluía el ORF del gen galR y el sitio loxpKAN se amplificó mediante PCR usando el ADN plásmido extraído como un molde. Los cebadores usados fueron un par de oligonucleótidos (SEC ID NO:1 y SEC ID NO:2). La PCR se llevó a cabo mediante 30 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en la desnaturalización durante 30 segundos a 94°C, reasociación durante 30 segundos a 60°C y extensión durante 60 segundos a 72°C, en este orden.

El fragmento de ADN resultante ΔgalR::loxpKAN se transformó dentro de la cepa de Escherichia coli No. de Acceso KCCM 10236, la Escherichia coli FTR8625 y la Escherichia coli FTR7624 que producen L-treonina mediante electroporación y el transformante resultante se raspó y depositó sobre un medio LB sólido que contenía kanamicina para seleccionar colonias que tienen un gen galR anulado. Las colonias seleccionadas se ensayaron para determinar su producción de L-treonina en cultivos de matraces.

Ejemplo 2: Producción de L-treonina en matraz Erlenmeyer mediante cepas seleccionadas

Se cultivaron treinta colonias seleccionadas en el Ejemplo 1 en un matraz Erlenmeyer que contenía el medio de valoración de treonina mostrado en la Tabla 1 a continuación, y se comparó la producción de L-treonina.

Tabla 1

Medio de valoración de treonina	
Ingredientes	Concentración (por litro)
Glucosa	70 g
Sulfato amónico	28 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·8H ₂ O	5 mg
Carbonato cálcico	30 g
L-metionina	0,15
Extracto de levadura	2 g
pH 7,0	

Cada colonia se cultivó durante una noche sobre medio LB sólido en una incubadora a 32°C.

A continuación, un anillo de platino del cultivo se inoculó dentro de 25 ml del medio de valoración y se cultivó a 32°C y 250 rpm durante 42 a 48 horas.

La L-treonina procedente del cultivo se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 2, más adelante. Puede observarse a partir de los resultados que la cepa prototipo No. de Registro KCCM 10236 produce 23 g/l de L-treonina durante 48 horas y la *Escherichia coli* FTR2541 de la presente invención en la cual ha sido anulado el gen galR produce 25 g/l de L-treonina durante 44 horas. Las cepas prototipos *Escherichia coli* FTR8625 y FTR7624 producen 26 g/l de L-treonina durante 48 horas y la *Escherichia coli* FTR2537 y FTR2533 de la presente invención en las cuales ha sido anulado el gen galR producen 28 g/l de L-treonina durante 44 horas y 42 horas, respectivamente. De acuerdo con ello, se observó que los presentes microorganismos transformados mejoran el tiempo de fermentación y la concentración de L-treonina en hasta aproximadamente el 7-9% e incrementan la producción de L-treonina en hasta aproximadamente un 18-25%, en comparación con las cepas prototipo. Las *Escherichia coli* FTR2541, *Escherichia coli* FTR2537 y *Escherichia coli* FTR2533 seleccionadas, se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganisms el 4 de Diciembre de 2003, asignándoselas los Nos. de Acceso KCCM-10539, KCCM-10540 y KCCM-10541. Igualmente, las cepas prototipo *Escherichia coli* FTR8625 y *Escherichia coli* FTR7624 se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganisms el 4 de Diciembre de 2003, asignándoselas los Nos. de Acceso KCCM-10544 y KCCM-10538.

Tabla 2

Resultados del ensayo de valoración de las cepas de los matraces						
Cepas	KCCM-10236	FTR2541 (KCCM-10539)	FTR8625 (KCCM-10544)	FTR2537 (KCCM-10540)	FTR7624 (KCCM-10538)	FTR2533 (KCCM-10541)
L-treonina (g/l)	23	25	26	28	26	28
Tiempo (hr)	48	44	48	44	48	42
Producción (g/l/hr)	0,48	0,57	0,54	0,64	0,54	0,67

Tal como se ha demostrado mediante los Ejemplos, la capacidad de biosíntesis de L-treonina de microorganismos se mejora mediante la anulación del gen galR. Esto es probablemente debido a que la expresión del gen galP se incrementa mediante la anulación del gen galR, incrementándose, de esta forma, la proporción de suministro de sacárido al interior de la cepa, lo cual incrementa la proporción de crecimiento específico de las cepas que producen L-treonina. No obstante, la mejora en la productividad del microorganismo no está basada únicamente en este mecanismo.

Tal como se ha descrito anteriormente, el microorganismo que tiene un gen galR inactivado de la presente invención puede producirse mediante fermentación con alto rendimiento.

Igualmente, de acuerdo con el procedimiento de producción del microorganismo, pueden producirse el microorganismo capaz de producir L-treonina con alto rendimiento.

Igualmente, de acuerdo con el procedimiento de producción de L-treonina de la presente invención, puede producirse alto rendimiento de L-treonina.

<110> CJ Corporation

<120> Un microorganismo que produce L-treonina que tiene un gen galR inactivado, procedimiento para la producción del mismo y procedimiento para la producción de L-treonina usando el microorganismo

<130> PN052460

<160> 2

<170> Kopatentin 1.71

	<210> 1			
	<211> 24			
	<212> ADN			
	<213> Secuencia artificial			
5				
	220>			
	<223> cebador			
	<400> 1			
10	ctcccgacac	gctcaacc	gatt	24
	<210> 2			
	<211> 21			
	<212> ADN			
15	<213> Secuencia artificial			
	220>			
	<223> cebador			
20	<400> 2			
	tgcccgccag	aaaaagtcag	c	21

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de L-treonina que comprende:

- 5 el cultivo de un microorganismo capaz de producir L-treonina y que tiene un gen galR inactivado, en el que el microorganismo está seleccionado entre el grupo que consiste en *Escherichia coli* FTR2541 depositada como KCCM-10539, *Escherichia coli* FTR2537 depositada como KCCM-10540 y *Escherichia coli* FTR2533 depositada como KCCM-10541; y el aislamiento de L-treonina a partir del cultivo.

FIG. 1

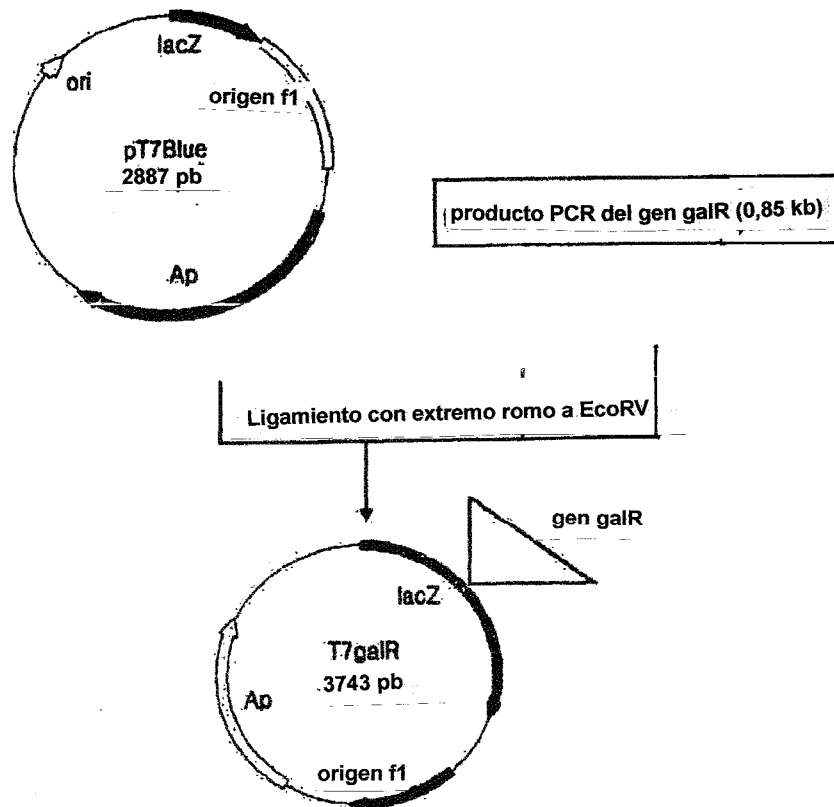


FIG. 2

