

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 732**

51 Int. Cl.:

C12N 15/04 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2009 E 09700769 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2233570**

54 Título: **Escherichia coli productora de L-treonina y proceso para producir L-treonina usando la misma**

30 Prioridad:

08.01.2008 KR 20080002310

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

14.05.2015

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
500 Namdaemunro 5-ga, Jung-gu
Seoul 100-749 , KR**

72 Inventor/es:

**LEE, KWANG HO;
JU, JAE YEONG;
LEE, JI SUN;
HWANG, YOUNG BIN;
JHON, SUNG HOO;
KOH, EUN SUNG;
KIM, CHUL HA y
SHIN, SOO AN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 732 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

Escherichia coli productora de L-treonina y proceso para producir L-treonina usando la misma

5 **Referencia cruzada a solicitudes de patente relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Coreana N° 10-2008-0002310, presentada el 8 de enero de 2008, en la Oficina de Propiedad Intelectual Coreana.

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

15 Una o más realizaciones de la presente invención se refieren a una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) productora de L-treonina con productividad de L-treonina potenciada en la que se sustituye un promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) en el cromosoma por un promotor del gen de cisteína sintasa (*cysK*), y un método para producir L-treonina usando la misma.

20 **2. Descripción de la técnica relacionada**

La L-treonina es un aminoácido esencial y se usa ampliamente como aditivo para piensos de animales o como aditivo alimentario, y también se usa como materia prima para fluidos médicos o para la síntesis de fármacos. Mientras que las proteínas animales contienen una cantidad suficiente de L-treonina, la proteína vegetal es deficiente en L-treonina. Por lo tanto, es probable que la L-treonina sea deficiente en animales con dieta principalmente vegetariana, y por lo tanto, en particular, se usa ampliamente como aditivo para piensos de animales.

La L-treonina se produce principalmente mediante un proceso de fermentación que usa *Escherichia coli* (*E. coli*) o *Corynebacterium*, que se desarrolla mediante mutagénesis artificial o recombinación genética. Para producir L-treonina se usa una cepa mutante derivada de una cepa de tipo silvestre de *Escherichia coli* (*E. coli*), *Corynebacteria sp.*, *Serratia sp.* o de *Providencia sp.* Los ejemplos de la cepa mutante incluyen una cepa resistente a análogos de aminoácidos o fármacos, y una cepa mutante auxotrófica para ácido diaminopimélico, metionina, lisina o isoleucina que también tiene resistencia a análogos de aminoácidos o a fármacos. Entre los métodos para producir L-treonina usando una cepa mutante, se divulga un método para usar un microorganismo que pertenece a la especie *Escherichia coli*, que tiene fenotipos auxótrofos para el ácido diaminopimélico y la metionina, y está mutada de modo que la biosíntesis de L-treonina no se vea afectada por la inhibición por retroalimentación de treonina, en la Patente Japonesa N° 10037/81.

También puede usarse un proceso de fermentación que usa una cepa recombinante en la producción de L-treonina. Por ejemplo, la Publicación Solicitud de Patente Japonesa N° 05-227977 divulga un método para producir L-treonina que usa una *E. coli* recombinante en la que se introduce un operón de treonina que consiste en los genes que codifican la aspartoquinasa, homoserina deshidrogenasa, homoserina quinasa y treonina sintasa en una forma de plásmido, y un método para producir la L-treonina usando *Brevibacterium flavum* productora de treonina en el que se introduce un operón de treonina derivado de *E. coli* (TURBA E, *et al*, Agric. Biol. Chem. 53:2269-2271, 1989).

45 En general, la expresión de un gen específico en un microorganismo puede potenciarse aumentando el número de copias del gen en el microorganismo. Para esto, se usa un plásmido que da un número mayor de copias para un microorganismo [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, 2º, 1989, 1.3-1.5]. Es decir, el número de genes puede aumentar en la misma cantidad que el número de copias del plásmido para un solo microorganismo insertando un gen diana en el plásmido cuyo número de copias puede mantenerse a un nivel alto y después transformando el microorganismo con el plásmido recombinante obtenido. Se han hecho intentos de potenciar la productividad de treonina usando este método y se ha notificado un éxito parcial (Patente de EE.UU. N° 5.538.873). Sin embargo, esta tecnología que usa un plásmido induce la expresión excesiva de un solo gen específico en la mayor parte de los casos, imponiendo de este modo una carga pesada sobre un microorganismo hospedador. Además, los plásmidos pueden perderse durante el cultivo de una cepa recombinante, disminuyendo de este modo la estabilidad del plásmido. Para abordar estos problemas del método para producir treonina usando una cepa recombinante en la cual se introduce un plásmido, se han desarrollado la adición de un antibiótico a un cultivo y métodos para usar un plásmido cuya expresión es controlable [Sambrook *et al.* Molecular Cloning, 2º, 1989, 1.5-1.6, 1.9-1.11]. En el caso de usar el plásmido cuya expresión es controlable, para aliviar la carga en un microorganismo hospedador y obtener una gran cantidad de células, durante la fase de crecimiento, se cultiva un microorganismo hospedador en condiciones en las que no ocurra la expresión de un gen diana en el plásmido, y después del crecimiento suficiente del microorganismo hospedador, se induce la expresión temporal del gen, obteniendo de este modo un material diana. Sin embargo, los métodos que usan plásmidos cuya expresión es controlable pueden usarse solamente cuando el producto génico final es una proteína o un metabolito secundario. En caso de que el producto sea un metabolito primario que se produzca al mismo tiempo en que los microorganismos empiezan a crecer, la expresión del gen diana debe inducirse durante la fase de crecimiento. De otro modo, es difícil anticipar la acumulación del metabolito primario. Dado que la treonina pertenece a uno de los metabolitos primarios, este último caso también se

aplica a la treonina.

5 Por lo tanto, para potenciar la productividad de la treonina, que es un metabolito primario, se divulga la inserción de genes implicados en la biosíntesis de treonina en el ADN cromosómico de un microorganismo en la Patente de EE.UU. N° 5.939.307, en lugar de usar un método de introducción de un plásmido con genes relacionados con la biosíntesis de treonina en un microorganismo. Los métodos para aumentar los genes relacionados con la biosíntesis de treonina y la expresión de los mismos se han desarrollado de diversos modos, pero aún existe una necesidad para desarrollar un método para producir de un modo más económico L-treonina con un alto rendimiento.

10 Para aumentar el rendimiento de la producción de L-treonina, se ha llevado a cabo de manera intensiva una investigación de una ruta de biosíntesis del oxalacetato a la treonina. A este respecto, primero se pretendió inducir el flujo de carbono a lo largo de una ruta desde el fosfoenolpiruvato a oxalacetato, potenciando la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, implicada en una etapa inmediatamente anterior a la biosíntesis de L-treonina. Para esto, se estudió y se descubrió una cepa de microorganismos capaz de producir L-treonina en la que se sustituyó un
15 promotor de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) del cromosoma por un promotor de un gen que codifica la cisteína sintetasa (*cysK*) de modo que aumentara la expresión de un gen que codifica la *ppc*, que es una primera enzima de la biosíntesis de L-treonina que después de la glucólisis, produjo L-treonina con alto rendimiento, completando por lo tanto la presente invención.

20 Sumario de la invención

Una o más de las realizaciones de la presente invención proporcionan una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) capaz de producir L-treonina con alto rendimiento.

25 Una o más realizaciones de la presente invención también proporcionan un método para producir L-treonina usando la cepa de *E. coli* mediante el cual la L-treonina puede producirse de manera eficaz.

Breve descripción de los dibujos

30 Las anteriores y otras características y ventajas de la presente invención serán más evidentes describiendo en detalle las realizaciones ejemplares de la misma con referencia a los dibujos acompañantes en los que:

La FIG. 1 es un diagrama que ilustra un proceso para construir un vector recombinante pUC-PcysK; y
la FIG. 2 es un diagrama que ilustra un proceso para construir un vector recombinante pUCpcysKmloxP.

35

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un microorganismo productor de L-treonina en el que se sustituye un promotor natural de un gen (*ppc*) en el cromosoma por un promotor de un gen de cisteína sintetasa (*cysK*).

40

En el microorganismo productor de L-treonina, la expresión de *ppc* aumenta de manera que un promotor de un gen que codifica *ppc*, que convierte el fosfoenolpiruvato producido después de la glucólisis en oxalacetato, el material de partida de la biosíntesis de L-treonina, se sustituye por el promotor del gen *cysK*, y por consiguiente puede aumentar la productividad de L-treonina.

45

El microorganismo puede incluir una célula procariota o eucariota capaz de producir L-treonina en la que se sustituye un promotor de un gen *ppc* del cromosoma por un promotor de un gen *cysK*. Por ejemplo, el microorganismo puede ser una cepa de microorganismos que pertenece al género *Escherichia*, género *Erwinia*, género *Serratia*, género *Providencia*, género *Corynebacterium* o género *Brevibacterium*. En particular, el microorganismo puede ser un
50 microorganismo que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, y más particularmente, un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*. Más particularmente, el microorganismo puede ser *Escherichia coli* CA030031 (KCCM 10910).

55

La *E. coli* CA030031 deriva de *E. coli* KCCM 10541, que deriva de una *E. coli* productora de L-treonina, KFCC 10718 (Publicación de Patente Coreana N° 92-8395). La *E. coli* KFCC 10718 tiene resistencia a un análogo de L-metionina, un fenotipo auxótrofo de metionina, resistencia a un análogo de L-treonina, un fenotipo auxótrofo defectuoso de isoleucina, resistencia a un análogo de L-lisina, y resistencia al ácido α -aminobutírico, y es capaz de producir L-treonina. Por lo tanto, el microorganismo puede incluir también un microorganismo mutante para producir L-treonina, además de un microorganismo de tipo silvestre. Por ejemplo, el microorganismo mutante puede ser un
60 microorganismo que tiene resistencia a un análogo de L-metionina, un fenotipo auxótrofo de metionina, resistencia a un análogo de L-treonina, un fenotipo auxótrofo defectuoso de isoleucina, resistencia a un análogo de L-lisina, y resistencia al ácido α -aminobutírico, y pertenece a *E. coli* capaz de producir L-treonina.

65

En una realización, el microorganismo puede ser una *E. coli* que tiene un fenotipo auxótrofo de metionina y resistencia a un análogo de treonina, a un análogo de lisina, a un análogo de isoleucina y a un análogo de metionina. Por ejemplo, el análogo de L-metionina puede ser al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

D,L-metionina, norleucina, α -metilmetionina, y L-metionina-D,L-sulfoximina, el análogo de L-metionina puede incluir al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en ácido α -amino- β -hidroxi valérico e hidroxamato de D,L-treonina, y el análogo de L-lisina puede ser al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en S-(2-aminoetil)-L-cisteína y δ -metil-L-lisina. Los ejemplos del microorganismo mutante pueden incluir un microorganismo en el que está inactivado el gen *pckA* implicado en la conversión de oxalacetato (OAA) en fosfoenol piruvato (PEP), que es un intermediario implicado en la biosíntesis de L-treonina, un microorganismo en el que está inactivado el gen *tyrR*, que reprime al gen *lysC*, que está implicado en la conversión de oxalacetato en aspartato, o un microorganismo en el que está inactivado el gen *galR* que reprime la expresión de un gen *galP* que está implicado en la entrada de glucosa.

En el microorganismo de la presente invención, el promotor del gen *ppc* en el cromosoma se sustituye por el promotor del gen *cysK* para aumentar la expresión del mismo. El promotor del gen *cysK* usado en el presente documento puede derivarse de un gen *cysK* con una tasa de expresión alta, y puede tener una secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 10.

La presente invención también proporciona un método para producir L-treonina, incluyendo el método: cultivar un microorganismo transformado con productividad de L-treonina potenciada en el que se sustituye un promotor de un gen *ppc* natural en el cromosoma por el gen *cysK*; y aislar la L-treonina del cultivo del microorganismo.

En el método para producir L-treonina, el microorganismo transformado puede ser *E. coli*, por ejemplo, *E. coli* CA030031 (KCCM 10910).

Una o más de las realizaciones de la presente invención se describirán ahora de forma más completa con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos se proporcionan solo con fines ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Construcción del vector recombinante pUCpcysKloxP

(1) Preparación del fragmento *PcysK*

Para obtener el fragmento de ADN de 0,3 kb que contiene un promotor de un gen *cysK* (SEC ID N°: 10), el ADN genómico (ADNg) de W3110, que es la cepa de *E. coli* de tipo silvestre, se extrajo usando un sistema Genomic-tip de QIAGEN, y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADNg como un molde y un kit de premezcla PCR HL (fabricado por BIONEER, Corea). Para amplificar el promotor del gen *cysK*, la PCR se realizó usando los cebadores de las SEC ID N°: 1 y 2 del siguiente modo: 30 ciclos de desnaturalización a 94 durante 30 segundos, hibridación a 55 durante 30 segundos y elongación a 72 durante 2,5 minutos.

Los productos de PCR se digirieron con KpnI y EcoRV, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %, y después se eluyeron para obtener un fragmento de ADN de 0,3 Kb (en lo sucesivo, citado como "fragmento *PcysK*").

(2) Construcción del vector recombinante pUC-*PcysK*

La FIG. 1 es un diagrama que ilustra un proceso de construcción de un vector recombinante pUC-*PcysK* que contiene un promotor de un gen *cysK*.

El plásmido pUC19 (New England Biolabs, EE.UU.) y el fragmento *PcysK* obtenido de acuerdo con el Ejemplo 1-(1) se digirieron cada uno con las enzimas de restricción KpnI y SmaI, y se ligaron entre sí para construir el vector pUC-*PcysK*.

(3) Construcción del vector recombinante pUCpcvsKloxP

La FIG. 2 es un diagrama que ilustra un proceso para construir el vector recombinante pUCpcysKloxP.

En general, en un experimento de delección génica causada por inactivación en una etapa, cada vez que se elimina un gen, permanece una secuencia de un sitio de reconocimiento de la recombinasa *loxP* en el ADN cromosómico. Se ha comunicado que debido a que las secuencias de *loxP* permanecen en el ADN cromosómico, cuando se modifican las cepas adicionalmente para desarrollo adicional, la eficacia puede disminuir significativamente (Nagy A., Genesis, 26:99, 2000). Se ha propuesto un método mejorado de delección usando los mutantes de *loxP*, que se denominan *lox71* y *lox66* por Suzuki (Appl. Environ. Microbiol. 71:8472, 2005). Por lo tanto, para sustituir más eficazmente un promotor de un gen *ppc* en el cromosoma por un promotor de un gen *cysK* usando los mutantes de *loxP*, se construyó el vector pUCpcysKloxP que tenía tanto un casete *loxP*-Cm^R-*loxP* mutante como el promotor del gen *cysK*.

Tal como se muestra en la FIG. 2, se llevó a cabo la PCR usando el plásmido pACYC184 (New England Biolab) como molde usando los cebadores de las SEC ID N°: 3 y 4 del siguiente modo: 30 ciclos de desnaturalización a 94

5 durante 30 segundos, hibridación a 55 durante 30 segundos y elongación a 72 durante 1 minuto para obtener un fragmento de PCR de 1,1 kb. El vector pUC-PcysK construido de acuerdo con el Ejemplo 1-(2) y el fragmento de ADN de 1,1 kb que se obtuvieron usando pACYA184 como molde se digirieron cada uno con las enzimas de restricción NdeI/KpnI, se ligaron entre sí, y se transformaron en *E. coli*. Después, se seleccionaron las células que tenían el ADN ligado con precisión usando un método general, y se purificó el plásmido pUCpcysKmloxP a partir del cultivo de las células.

Ejemplo 2: Preparación de *E. coli* recombinante KCCM 10541-PcyK-ppc

10 Para sustituir un promotor nativo de un gen *ppc* (SEC ID N°: 9) que codifica la fosfoenolpiruvato carboxilasa en el cromosoma con un promotor de un gen *cysK*, se llevó a cabo un método de activación en una etapa conocido (Warner et al., PNAS, 6;97(12):6640, 2000) en *E. coli* KCCM 10541.

15 En primer lugar, se realizó la PCR usando el plásmido pUCpcysKmloxP construido de acuerdo con el Ejemplo 1 como molde usando los cebadores de las SEC ID N°: 5 y 8 del siguiente modo: 30 ciclos de desnaturalización a 94 durante 30 segundos, hibridación a 55 durante 30 segundos y elongación a 72 durante 1 minuto para obtener fragmentos de ADN y los fragmentos de ADN obtenidos se purificaron usando un kit de QIAGEN (kit de Purificación de PCR). Posteriormente, se llevó a cabo la PCR adicionalmente usando los cebadores de las SEC ID N°: 6 y 7 y los fragmentos de ADN purificados como molde del siguiente modo: 30 ciclos de desnaturalización a 94 durante 30 segundos, hibridación a 55 durante 30 segundos y elongación a 72 durante 1 minuto. Los fragmentos de ADN resultantes se purificaron; los fragmentos de ADN purificados se introdujeron por electroporación en *E. coli* KCCM 20 10541 en las que se había introducido el vector pKD46 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12), 6640-6645(2000)), y se seleccionó una sola colonia en una placa Luria-Bertani (LB) que contenía 15 /ml de cloranfenicol. La cepa seleccionada fue una cepa en la que se insertó el fragmento de ADN en un sitio del promotor de un gen *ppc*. El vector pJW168 (BMG Biothechnol. 2001;1:7. Publicado electrónicamente el 26 de septiembre de 2001) se introdujo en la cepa seleccionada para preparar *E. coli* KCCM 10541-PcyK-ppc recombinante en la que el promotor nativo del gen *ppc* se sustituyó por el promotor del gen *cysK*, eliminando el gen de resistencia a antibióticos.

Ejemplo 3: Comparación de la productividad de L-treonina entre microorganismos recombinantes

30 El microorganismo recombinante preparado de acuerdo con el Ejemplo 2 se cultivó en un medio de titulación de treonina, tal como se muestra en la Tabla 1 a continuación, en un matraz Erlenmeyer, y se confirmó si mejoraba la productividad de L-treonina.

35

Tabla 1

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	70 g
K ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ ·4H ₂ O	5 mg
DL-metionina	0,15 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	30 g
pH	6,8

40 Se inoculó con un asa de siembra de platino cada una de las *E. coli* KCCM 10541 y *E. coli* KCCM 10541-PcysK-ppc, que se cultivaron en un medio LB sólido en un incubador a 33 durante toda la noche con 25 ml de medio de titulación, tal como se muestra en la Tabla 1, y se cultivaron en el incubador a 33 a 200 rpm durante 48 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

45 Tal como se muestra en la Tabla 2, cuando la cepa parental de *E. coli* KCCM 10541 se cultivó durante 48 horas, esta produjo 29,8 g/l de L-treonina, mientras que la *E. coli* KCCM 10541-PcysK-ppc del Ejemplo 2 produjo 34,7 g/l de L-treonina, teniendo una productividad de 4,9 g/l mayor que la de la cepa parental. Por lo tanto, se confirmó que la cepa recombinante en la que el promotor del gen *ppc* se había sustituido por el promotor del gen *cysK* tiene una productividad de L-treonina potenciada. La *E. coli* KCCM 10541-PcysK-ppc transformada se denominó *E. coli* CA030031 y se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 20 de diciembre de 2007 (N° de

referencia: KCCM 10910).

Tabla 2

Cepa	L-Treonina (g/l)
KCCM10541 (cepa parental)	29,8
KCCM10541-PcysK-ppc	34,7

Tal como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con la presente invención, en un microorganismo en el que se sustituye un promotor de un gen *ppc* en el cromosoma por un promotor de un gen *cysK*, la expresión del gen *ppc*, que es una enzima que convierte el fosfoenolpiruvato en oxalacetato, que es un precursor de la biosíntesis de L-treonina, aumenta, potenciando de ese modo de forma significativa la productividad de L-treonina en un 16 % o más. El microorganismo puede producir L-treonina con alto rendimiento, y por lo tanto puede usarse ampliamente en la industria médica, farmacéutica y alimentaria, en particular para alimentos para animales.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> CJ Corporation

<120> *Escherichia coli* productora de L-treonina y proceso para producir L-treonina usando la misma

10 <160> 10

<170> KopatentIn 1.71

20 <210> 1
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador para el promotor *cysK*

<400> 1
cagaggtacc ccagcctggt tacgatgatc 30

30 <210> 2
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> cebador para el promotor *cysK*

40 <400> 2
gactgatatc gtgaccgata gtcagcgagt 30

45 <210> 3
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

50 <400> 3
atatcatatg tacggttcgt atagcataca ttatacgaag ttatctgccc tgaaccgacg 60
accg 64

55 <210> 4
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 535 732 T3

<220>
 <223> Cebador

 <400> 4
 5 aattccatgg taccgttcgt ataatgtatg ctatacgaag ttatgcatca cccgacgcac 60

 tttgc 65

 <210> 5
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 5

 cttgcgcatc ttatccgacc tacacctttg gtgttacttg gggcgatttt aaggcgatta 60
 agttgggtaa 70

 20 <210> 6
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 6
 atccggcact gttgccaaac tccagtgcog caataatgtc ggatgcgata cttgcgcatc 60
 30 ttatccgacc 70

 <210> 7
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador

 <400> 7
 40 ttgccgagca tactgacatt actacgcaat gcggaatatt gttcgttcat gatatctcct 60
 taactgtatg 70

 <210> 8
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 8

ES 2 535 732 T3

gttcaagaat gtgttctccc aacgcacct tgatggtttc tcccagcact ttgccgagca 60

tactgacatt 70

<210> 9
 <211> 2652
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 9

atgaacgaac aatattccgc attgocgtagt aatgtcagta tgctcggcaa agtgctggga 60

gaaaccatca aggatgcggt gggagaacac attcttgaac gcgtagaaac tatccgtaag 120

ttgtogaaat ctccacgcgc tggcaatgat gctaacccgc aggagttgct caccacctta 180

caaaatgttgc cgaacgacga gctgctgccc gttgcgcgtg cgtttagtca gttcctgaac 240

ctggccaaca ccgccgagca ataccacagc atttcgccga aaggcgaagc tgccagcaac 300

ccggaagtga tgcgccgac cctgcgtaaa ctgaaaaacc agccggaact gagcgaagac 360

accatcaaaa aagcagtgga atcgcgtgctg ctggaactgg tcctcacggc tcaccaaac 420

gaaattaccc gtcgtacact gatccacaaa atggtggaag tgaacgcctg tttaaaacag 480

ctcgataaca aagatatcgc tgactacgaa cacaaccagc tgatgcgtcg cctgcgccag 540

ttgatcgccc agtcatggca taccgatgaa atccgtaagc tgcgtccaag cccggtagat 600

gaagccaaat ggggctttgc cgtagtggaa aacagcctgt ggcaaggcgt accaaattac 660

ctgcgcgaac tgaacgaaca actggaagag aacctcggct acaaactgcc cgtcgaat 720

gttccggtcc gttttacttc gtggatgggc ggcgaccgcg acggcaaccg gaacgtcact 780

gccgatatca ccgccacgt cctgctactc agccgctgga aagccaccga tttgttctg 840

aaagatattc aggtgctggt ttctgaactg tcgatggttg aagcgacccc tgaactgctg 900

gcgctggttg gcgaagaagg tgccgcagaa ccgatcgct atctgatgaa aaacctgcgt 960

tctgcctga tggcgacaca ggcattgctg gaagcgcgcc tgaaaggcga agaactgcca 1020

aaaccagaag gcctgctgac acaaacgaa gaactgtggg aaccgctcta cgcttctac 1080

cagtcacttc aggcgtgtgg catgggtatt atcgccaacg gcgatctgct cgacaccctg 1140

cgccgcgtga aatgtttcgg cgtaccgctg gtccgtattg atatccgtca ggagagcacg 1200

cgtcataccg aagcgtggtg cgagctgacc cgctacctcg gtatcggcga ctacgaaagc 1260

tggtcagagg ccgacaaaca ggcgttctg atccgcgaac tgaactcaa acgtccgctt 1320

ctgccgcgca actggcaacc aagcgcgaa acgcgcgaag tgctcgatac ctgccaggtg 1380

attgccgaag caccgcaagg ctccattgcc gcctacgtga tctcgatggc gaaaacgccg 1440

tccgacgtac tggtgtgcca cctgctgctg aaagaagcgg gtatcgggtt tgcgatgccg 1500

gttgctccgc tgtttgaac cctcgatgat ctgaacaacg ccaacgatgt catgacccag 1560

10

ES 2 535 732 T3

ctgctcaata ttgactggta tcgtggcctg attcagggca aacagatggt gatgattggc 1620
tattccgact cagcaaaaaga tgcgggagtg atggcagctt cctgggcgca atatcaggca 1680
caggatgcat taatcaaaac ctgcaaaaa gcggtattg agctgacgtt gttccacggt 1740
cgcgggcggt ccattggtcg cggcgggcgca cctgctcatg cggcgctgct gtcacaaccg 1800
ccaggaagcc tgaaaggcgg cctgcgcgta accgaacagg gcgagatgat ccgctttaa 1860
tatggtctgc cagaaatcac cgtcagcagc ctgtcgcttt ataccggggc gattctggaa 1920
gccaacctgc tgccaccgcc ggagccgaaa gagagctggc gtcgcattat ggatgaactg 1980
tcagtcatct cctgcatgt ctaccgggc tacgtaoctg aaaacaaaga ttttgtgcct 2040
tacttccgct ccgctaccgc ggaacaagaa ctgggcaaac tgccgttggg ttcacgtccg 2100
gcgaaacgtc gcccaaccgg cggcgctcag tcaactacgg ccattccgtg gatcttccgc 2160
tggacgcaaa accgtctgat gctccccgcc tggctgggtg caggtacggc gctgcaaaaa 2220
gtggtcgaag acggcaaaaca gagcgagctg gaggtatgt gccgcgattg gccattcttc 2280
tcgacgcgtc tcggcatgct ggagatggtc ttcgccaaag cagacctgtg gctggcgjaa 2340
tactatgacc aacgcctggt agacaaagca ctgtggccgt taggtaaaga gttacgcaac 2400
ctgcaagaag aagacatcaa agtgggtgctg gcgattgcca acgattccca tctgatggcc 2460
gatctgccgt ggattgcaga gtctattcag ctacggaata ttacaccga ccgctgaac 2520
gtattgcagg ccgagttgct gcaccgctcc cgcaggcag aaaaagaagg ccaggaaccg 2580
gatcctcggc tcgaacaagc gttaatggtc actattgccg ggattgcggc aggtatgcgt 2640
aataccggct aa 2652

<210> 10
<211> 148
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

<400> 10

ggcctgtcct taactgtatg aaattgggat acaacaggta gcataccgc cagagaatat 60
gcggaagtaa ggatttagca tatctatata cagaagggaa ataatgacag caagatggaa 120
taagggcgcg cataagccac ccctgttt 148

5

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de *Escherichia coli* productora de L-treonina en la que se sustituye un promotor de un gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*) en el cromosoma por un promotor de un gen de cisteína sintasa (*cysK*).
2. La cepa de *Escherichia coli* de la reivindicación 1, que tiene un fenotipo auxótrofo de metionina, y resistencia a un análogo de treonina, a un análogo de lisina, a un análogo de isoleucina y a un análogo de metionina.
- 10 3. La cepa de *Escherichia coli* de la reivindicación 1, que es *Escherichia coli* CA030031 (Nº de referencia: KCCM 10910).
4. Un método para producir L-treonina, comprendiendo el método: cultivar la cepa de *Escherichia coli* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y aislar la L-treonina del cultivo de la cepa de *Escherichia coli*.

FIG. 1

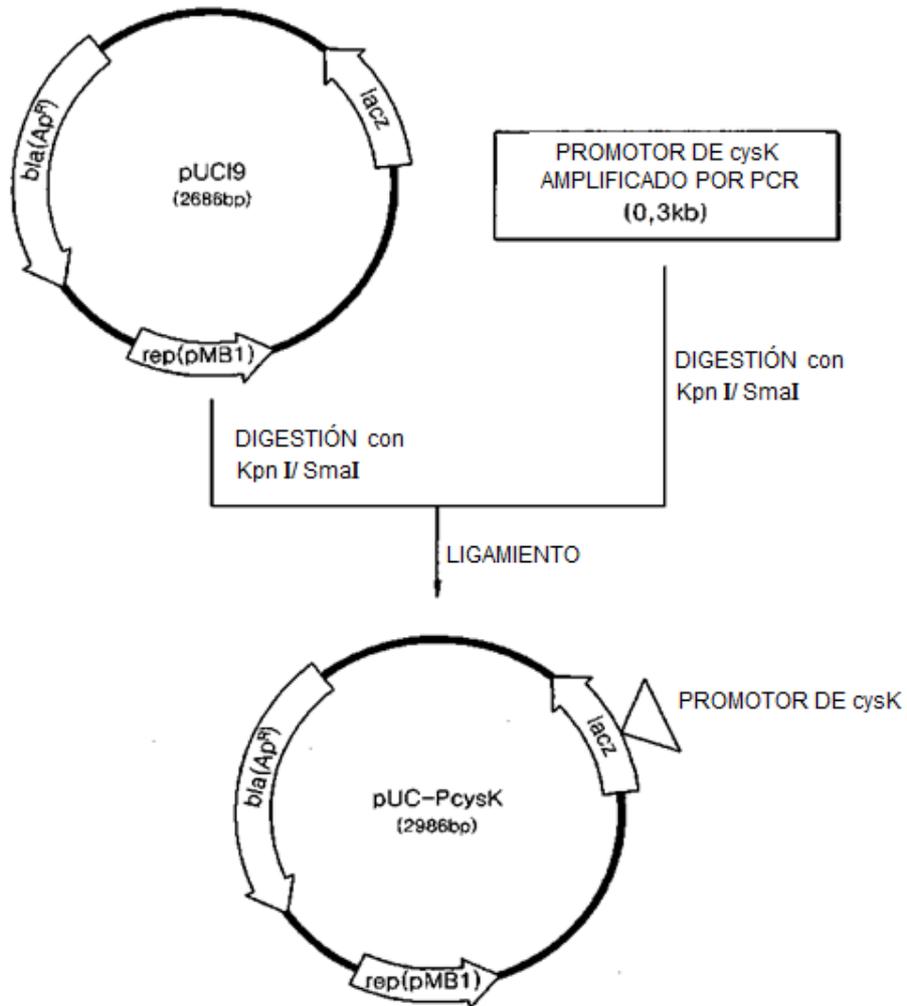


FIG. 2

