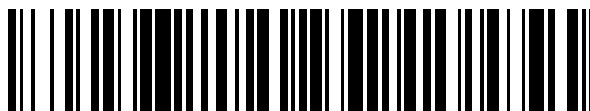


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 513**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2005** **E 05356023 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 1591520**

54 Título: **Microorganismo que produce L-treonina teniendo el gen tyrR inactivado, procedimiento de producción del mismo y procedimiento de producción de L-treonina usando el microorganismo**

30 Prioridad:

05.02.2004 KR 2004007528

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

16.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PARK, YOUNG HOON,111-102 MUJIGAE DAERIM
APT.;
LEE, BYOUNG CHOON;
PARK, JAE YONG;
CHO, KWANG MYUNG y
SHIN, YONG UK

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 659 513 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

Microorganismo que produce L-treonina teniendo el gen *tyrR* inactivado, procedimiento de producción del mismo y procedimiento de producción de L-treonina usando el microorganismo

Antecedentes de la invención

- 5 La presente invención reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente coreana N.º 10-2004-0007528, enviada el 5 de febrero de 2004, en la Oficina de la Propiedad Intelectual Coreana.

1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo que tiene un gen *tyrR* inactivado, a un procedimiento para producir el mismo y a un procedimiento para producir L-treonina usando el microorganismo.

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

La L-treonina es un aminoácido esencial y se usa ampliamente como un alimento y un aditivo alimenticio y también como un producto farmacéutico y materia prima para sintetizar algunos fármacos. Se ha producido por fermentación con mutantes artificiales del género *Escherichia*, bacterias coryneformes, *Serratia* y *Providencia*. Por ejemplo, la Publicación de Patente japonesa N.º 10037/81 desvela un procedimiento para producir L-treonina usando una cepa que pertenece al género *Escherichia* que tiene un requisito de ácido diaminopimélico y metionina y tiene la resistencia a la inhibición por retroalimentación por treonina del sistema biosintético de la treonina. La Solicitud de Patente japonesa abierta al público N.º 224684/83 desvela un procedimiento para producir L-treonina usando una cepa que pertenece al género *Brevibacterium* que es resistente a S-(2-aminoetil)-L-cisteína y ácido α -amino- β -hidroxi valérico y tiene un requisito nutricional de L-isoleucina y L-lisina. La Solicitud de Patente coreana abierta al público N.º 8022/87 desvela un procedimiento para producir L-treonina usando una cepa que requiere ácido diaminopimélico y metionina; resistente a ácido α -amino- β -hidroxi valérico que pertenece al género *Escherichia* que tiene una resistencia adicional a al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en rifampicina, lisina, metionina, ácido aspártico y homoserina, o tiene una capacidad reducida para descomponer L-treonina. La Solicitud de Patente japonesa abierta al público N.º 219582/90 desvela un procedimiento para producir L-treonina usando una cepa que pertenece al género *Providencia* que es resistente a ácido α -amino- β -hidroxi valérico, L-etionina, tiaisoleucina, oxitiamina y sulfaguanidina y tiene un requisito de L-leucina y también un requisito escaso de L-isoleucina.

Sin embargo, los procedimientos anteriores conocidos tienen las desventajas de que fallan proporcionando una alta producción de L-treonina o requieren requisitos costosos tales como ácido diaminopimélico e isoleucina. En otras palabras, el uso de cepas que requieren ácido diaminopimélico en la producción de L-treonina incluye una fermentación adicional de ácido diaminopimélico y de esta manera puede aumentar los costes. Cuando se usa una cepa que tenga un requisito de isoleucina para la producción de L-treonina, debe añadirse isoleucina costosa al medio de fermentación, lo que aumenta el coste.

En un intento de superar estas desventajas, los presentes inventores desarrollaron una cepa de *Escherichia coli* productora de L-treonina que es resistente a L-metionina, L-treonina y análogos de L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito escaso de isoleucina. Produjeron exitosamente L-treonina por fermentación con la cepa en rendimientos más altos que con las cepas anteriores. La cepa y un procedimiento para producir L-treonina usando dicha cepa se desvelan en la Publicación de Patente coreana N.º 92-8365.

La descomposición oxidativa de la tirosina tiene dos vías, es decir, la descomposición a fumarato y acetoacetato y la descomposición después de la conversión en 3,4-hidroxifenilacetato por la tirosinasa. En el primer caso, la L-tirosina reacciona con α -cetoglutarato para producir L-glutamato y 4-hidroxifenilpiruvato (Neidhardt FC y col., (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2ª edición ASM Press. Washington DC, 1996, páginas 2649-2660). La biosíntesis de tirosina y fenilalanina incluye la transaminación. Una enzima importante en la transaminación se codifica por los genes *tyrB*, *aspC* e *ilvE* (Ji Yang y James Pittard, *Journal of Bacteriology*, 1987, 167, páginas 4710-4715). Esto es, el gen *tyrB* codifica una subunidad de la aminoácido aromático transaminasa. Una proteína TyrB codificada por el gen *tyrB* está implicada en la transaminación por la aminoácido aromático transaminasa en la tercera y la última etapas de la biosíntesis de tirosina como la subunidad (Neidhardt FC y col., (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2ª edición. ASM Press. Washington DC, 1996, pp. 2649-2660). El gen *tyrB* también tiene una función similar al gen *aspC* para estar implicado en la síntesis del aspartato (ASP) a partir de oxalacetato (OAA) así como la biosíntesis de tirosina y fenilalanina. ASP es un intermedio para la biosíntesis de L-treonina (Neidhardt FC y col., (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2ª edición, ASM Press. Washington DC, 1996, páginas 358-403).

El gen *tyrB* pertenece al regulón *tyrR* y se somete a represión de la expresión durante la transcripción por un producto codificado por el gen *tyrR* (Ji Yang y James Pittard, *Journal of Bacteriology*, 1987, 167, páginas 4710-4715). El documento EP1479775 se refiere a la producción de L-treonina en *E. coli* que se ha modificado para potenciar una actividad de la aspartato aminotransferasa. El documento JPH05344881 se refiere a la producción de L-fenilalanina con una *E. coli* con un TyrR inactivado.

Los presentes inventores han estudiado intensamente la selección de cepas que tengan una capacidad mejorada para producir treonina a base de tecnologías convencionales y ahora han descubierto que la biosíntesis de L-treonina puede facilitarse por la inactivación del gen *tyrR*.

Sumario de la invención

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

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir el microorganismo.

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir eficientemente L-treonina usando el microorganismo.

- 10 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un microorganismo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* capaz de producir L-treonina y que tiene un gen *tyrR* inactivado, siendo dicho microorganismo *Escherichia coli*, en el que *Escherichia coli* es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina.

- 15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención; se proporciona un procedimiento para producir un microorganismo productor de L-treonina, comprendiendo el procedimiento:

- preparar un gen *tyrR* inactivado o un fragmento de ADN del mismo;
- introducir el gen *tyrR* inactivado o el fragmento de ADN del mismo en un microorganismo capaz de producir L-treonina para producir la recombinación con un gen *tyrR* presente en un cromosoma del microorganismo, en el que *Escherichia coli* es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina; y
- seleccionar microorganismos que tengan un gen *tyrR* inactivado.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir L-treonina, incluyendo el procedimiento: cultivar el microorganismo como se describe anteriormente; y aislar L-treonina del cultivo.

Breve descripción de los dibujos

Los rasgos y ventajas anteriores y otros se volverán más evidentes por las realizaciones ejemplares de los mismos que los describen con detalle con referencia a los dibujos unidos en los que:

La Figura 1 representa una construcción de un plásmido recombinante pTblue/*tyrR* que incluye un gen *tyrR*;

y

- 30 La Figura 2 representa una construcción del fragmento de ADN Δ *tyrR::loxP*CAT del plásmido recombinante pT7blue/*tyrR::loxP*CAT.

Descripción detallada de la invención

- La presente invención proporciona un microorganismo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* capaz de producir L-treonina y que tiene un gen *tyrR* inactivado, siendo dicho microorganismo *Escherichia coli*, en el que *Escherichia coli* es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina.

- En la presente invención, el microorganismo puede producir L-treonina e incluye microorganismos procarióticos y eucarióticos que tienen un gen *tyrR* inactivado. Por ejemplo, pueden incluirse cepas que pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Erwinia*, *Serratia*, *Providencia*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*. Preferentemente, el microorganismo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y, más preferentemente, al género *Escherichia*. Más preferentemente, el microorganismo es *Escherichia coli* FTR7624 (KCCM-10538).

- Además, el microorganismo puede incluir mutantes que producen L-treonina así como microorganismos naturales. Los ejemplos de los mutantes incluyen microorganismos que pertenecen a *Escherichia coli* que produce L-treonina que son resistentes a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tienen un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina; y microorganismos mutados en los que se inserta al menos una copia del gen de la fosfoenol piruvato carboxilasa (*ppc*) y los genes *thrA*, *thrB* y *thrC* contenidos en un operón de treonina, en un ADN cromosómico, además del gen *ppc* y los genes intrínsecos en el operón de treonina. El análogo de L-metionina puede ser al menos un compuesto seleccionado del 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 del grupo que consiste en ácido α -amino- β -hidroxi valérico e hidroxamato de D,L-treonina. 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.

En la presente invención, el gen *tyrR* codifica una proteína que representa la transcripción por *tyrB* que codifica TyrB (aminoácido aromático transaminasa) que actúa en las etapas tercera y final de la ruta de biosíntesis de la tirosina. Para la *Escherichia coli*, el gen *tyrR* se conoce y puede obtenerse de la secuencia genómica publicada por Blattner y col. (Science 277: 1453-1462 (1997)) (N.º de acceso: AAC74405). La secuencia genómica también puede obtenerse del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en EE.UU. y DNA Data Bank of Japan (DDBJ). El gen *tyrR* también incluye un alelo generado por la atenuación del código genético o mutación. La "inactivación" como se usa en el presente documento se refiere a la no expresión de una proteína *tyrB* activa. De esta manera, la inactivación del gen *tyrR* da lugar a un aumento de la expresión del gen *tyrB*.

El microorganismo de la presente invención puede producirse inactivando un gen *tyrR* presente en un cromosoma de un microorganismo capaz de producir L-treonina. El procedimiento de inactivación puede incluir provocar la mutación usando luz, tal como luz UV, o químicos y cepas aisladas que tengan un gen *tyrR* inactivado de los mutantes. El procedimiento de inactivación también incluye una tecnología de recombinación de ADN. La recombinación de ADN puede lograrse, por ejemplo, inyectando una secuencia de nucleótidos o un vector que incluye una secuencia de nucleótidos con homología al gen *tyrR* en el microorganismo para provocar la recombinación homóloga. La secuencia de nucleótidos y el vector inyectado pueden incluir un marcador seleccionable dominante.

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir un microorganismo productor de L-metionina, comprendiendo el procedimiento:

- preparar un gen *tyrR* inactivado o un fragmento de ADN del mismo;
- introducir el gen *tyrR* inactivado o el fragmento de ADN del mismo en un microorganismo capaz de producir L-treonina para producir la recombinación con un gen *tyrR* presente en un cromosoma del microorganismo, en el que *Escherichia coli* es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina; y
- seleccionar microorganismos que tengan un gen *tyrR* inactivado.

El "gen *tyrR* inactivado o un fragmento de ADN del mismo" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de polinucleótido que tiene una homología de secuencia con el gen *tyrR* en un hospedador pero siendo incapaz de expresar una proteína *tyrR* activa debido a pérdida, sustitución, truncación e inversión. La introducción del gen *tyrR* inactivado o un fragmento de ADN del mismo en una célula hospedadora puede lograrse, por ejemplo, por transformación, conjugación, transducción o electroporación, pero no se limita a las mismas.

Cuando el gen *tyrR* inactivado o un fragmento de ADN del mismo se introduce en la célula hospedadora por transformación, el procedimiento de inactivación puede llevarse a cabo mezclando la secuencia de polinucleótido con un cultivo de la cepa. Aunque la cepa es competente de forma natural para la toma de ADN para transformar, se prefiere que la cepa se haga competente previamente para la toma de ADN por cualquier procedimiento adecuado (véase por ejemplo LeBlanc y col., Plasmid 28, 130-145, 1992; Pozzi y col., J. Bacteriol. 178, 6087-6090, 1996). El gen *tyrR* inactivado o un fragmento de ADN del mismo tiene una parte de ADN extraño introducido en un fragmento de ADN genómico y reemplaza la copia cromosómica de tipo silvestre de la secuencia con un estado inactivado. En una realización de la presente invención, la secuencia de polinucleótido inactivada incluye "colas" que comprenden una parte del ADN en el sitio diana en los extremos 5' y 3' de los mismos. Las colas deben ser de al menos 50 pares de bases y preferentemente más de 200 a 500 pares de bases para la recombinación y/o la conversión génica eficientes. Por conveniencia, la secuencia de polinucleótidos inactivada puede incluir un marcador seleccionable, por ejemplo; un gen de resistencia a antibióticos. Cuando el ADN diana se interrumpe con un gen de resistencia a antibióticos, se lleva a cabo la selección de transformantes en placas de agar que contienen niveles adecuados de un antibiótico apropiado. Después de la transformación, la secuencia de polinucleótido inactivada introducida en la célula hospedadora se somete a recombinación homóloga con las colas de ADN genómico, dando como resultado la inactivación de la secuencia genómica de tipo silvestre. Los casos de recombinación de inactivación se confirman fácilmente mediante, por ejemplo, transferencia Southern, o más adecuadamente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En una realización de la presente invención, un procedimiento para producir el microorganismo productor de L-treonina de la presente invención comprende los siguientes procedimientos.

En primer lugar, el ADN se aísla a partir de una cepa que es capaz de producir L-treonina y la PCR se realiza usándolo como molde por una tecnología convencional para amplificar el gen *tyrR*.

A continuación, el gen *tyrR* obtenido se clona en un plásmido adecuado o en otro vector. El vector recombinante se introduce por transformación en una célula hospedadora tal como *E. coli*. Después de que el transformante se haga crecer y las células se aíslan, el vector recombinante que tiene los genes *tyrR* se extrae. Después se inserta un fragmento de gen de resistencia a antibiótico en el gen *tyrR* del vector recombinante extraído para formar un vector recombinante para formar un vector recombinante que tiene un gen *tyrR* inactivado. Este vector recombinante se introduce por transformación en una célula hospedadora y la célula hospedadora se cultiva en un medio de cultivo adecuado. Después, el vector recombinante propagado se aísla del transformante resultante y la secuencia de polinucleótido que tiene un gen *tyrR* inactivado se obtiene por digestión o digestiones de enzimas de restricción

adecuadas. En lo sucesivo, esta secuencia de polinucleótido se introduce en un hospedador que es capaz de producir L-treonina por una técnica convencional tal como electroporación, en la que la célula hospedadora en la etapa (c) es *Escherichia coli* y *Escherichia coli* es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina. Los microorganismos que tienen una resistencia a antibióticos se seleccionan para aislar microorganismos que tienen un gen *tyrR* inactivado.

Los expertos en la materia reconocerán que la secuencia de polinucleótido de la presente invención puede generarse por procedimientos generales de clonación. Por ejemplo, pueden usarse los procedimientos de amplificación por PCR que usan cebadores de oligonucleótidos dirigidos al gen *tyrR*. Los procedimientos para la amplificación por PCR se conocen ampliamente en la técnica (véase por ejemplo PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Ed. M. Innis et al., Academic Press (1990)). La PCR comprende ADN genómico, enzimas adecuadas, cebadores y tampones y se lleva a cabo adecuadamente en un Ciclador Térmico de ADN (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn. EE.UU.). Un resultado de PCR positivo se determina mediante, por ejemplo, la detección de un fragmento de ADN de tamaño apropiado después de electroforesis en gel de agarosa.

En una realización de la presente invención, se prepararon los plásmidos recombinantes pT7blue/*tyrR* y pT7blue/*tyrR::loxP*CAT se prepararon y se obtuvo a partir de los mismos una secuencia de polinucleótidos Δ *tyrR::loxP*CAT. Después, una cepa de *Escherichia coli* que es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y que tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina, es decir, *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM 10236, se transformó con la secuencia de polinucleótido inactivada Δ *tyrR::loxP*CAT por electroporación. Como resultado, el gen *tyrR* tipo silvestre se inactiva en tres tipos de cepas novedosas capaces de producir una mayor concentración de L-treonina que la cepa prototipo. Las cepas novedosas se designaron como *Escherichia coli* FTR7624 y se depositaron bajo el Tratado de Budapest en el Korean Culture Center of Microorganisms el 4 de diciembre de 2003 y se les asignó el N.º de acceso KCCM-10538.

Escherichia coli FTR7624 derivó de *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM 10236 que derivó de *Escherichia coli* TF4076. La *Escherichia coli* TF4076 (KFCC10718) requiere metionina y tiene resistencia a los análogos de treonina (por ejemplo, ácido α -amino- β -hidroxi valérico, AHV), análogos de lisina (por ejemplo, S-2-aminoetil-L-cisteína, AEC), análogos de isoleucina (por ejemplo, ácido α -aminobutírico), análogos de metionina (por ejemplo, etionina) y similares. *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM TF4076 se describe en la Publicación de Patente coreana N.º 92-8365 a la que puede referirse el experto en la materia. El fosfoenol piruvato (PEP) es un precursor del oxalacetato que es un intermedio de la ruta biosintética de la L-treonina. El gen *ppc* y el operón de treonina originados a partir de los cromosomas de *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM TF4076 se amplificaron por PCR y se integraron adicionalmente en los cromosomas de *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM TF4076 para generar *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM 10236. De esta manera, *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM 10236 posee dos genes *ppc* y dos operones de treonina. *Escherichia coli* N.º de acceso KCCM 10236 es, por lo tanto, capaz de expresar mayores niveles de los genes *ppc* catalizando la formación de oxalacetato 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); habilitando de esta manera un aumento en la producción de L-treonina.

La presente invención también proporciona un procedimiento para producir L-treonina, incluyendo: cultivar el microorganismo capaz de producir L-treonina, incluyendo: cultivar el microorganismo capaz de producir L-treonina y que tiene un gen *tyrR* inactivado; y aislar 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 en condiciones de cultivo adecuadas conocidas en la técnica y pueden ajustarse fácilmente de acuerdo con el tipo de cepa seleccionada por aquellos expertos en la materia. El cultivo puede llevarse a cabo por funcionamiento en lotes, funcionamiento continuo; o funcionamiento semi-continuo (véase por ejemplo "Biochemical Engineering" por James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, páginas 138-176).

El medio de cultivo debe cumplir apropiadamente los requerimientos de acuerdo con la cepa seleccionada. Una diversidad de medios de cultivo se desvelan en las referencias bibliográficas (véase por ejemplo "Manual of Methods for General Bacteriology" by the 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 tales 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 maíz fermentado (CSL) y soja; y sustancias inorgánicas tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación. En el medio de cultivo, pueden incluirse las fuentes de fosfato tales como dihidrogenofosfato potásico, hidrogenofosfato dipotásico y las sales que contienen sodio correspondientes. Además, el medio de cultivo puede incluir sales metálicas tales como sulfato magnésico o sulfato ferroso. Además, pueden incluirse aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. El medio de cultivo o el precursor pueden añadirse al cultivo en forma de lotes o de forma continua.

El hidróxido de amonio, el hidróxido potásico, el amoníaco, el fosfato o el ácido sulfúrico, etc. se añade apropiadamente al cultivo durante el cultivo para ajustar el pH del cultivo. Además, se añade un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso al cultivo para prevenir la formación de espuma. El cultivo se lleva a cabo en condiciones aeróbicas inyectando oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) al cultivo. La temperatura de cultivo está en el intervalo de 20 a 45 °C; preferentemente 25 a 40 °C. El cultivo se lleva a cabo en el intervalo de 20 a 45 °C; preferentemente 25 a 40 °C. El cultivo puede continuarse hasta que se obtiene la cantidad deseada de L-treonina, preferentemente durante 10 a 160 horas.

La L-treonina puede aislarse del cultivo por procedimientos ordinarios conocidos en la técnica. Los procedimientos de aislamiento incluyen centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio iónico y cristalización, etc. Por ejemplo, el sobrenadante obtenido centrifugando el cultivo a baja velocidad para retirar la biomasa puede aislarse a través de cromatografía de intercambio iónico.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente por los ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos se proporcionan solamente por ilustración y de esta manera la presente invención no se limita a o por ellos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de plásmido recombinante y desactivación del gen *tyrR*

En el presente ejemplo, un gen *tyrR* en un cromosoma de *Escherichia coli* se desactivó por recombinación homóloga. Para esto, se preparó un vector que incluye una porción del gen *tyrR* y después se transformó en la célula hospedadora de *Escherichia coli*, seguido de la selección de cepas que tengan un gen *tyrR* desactivado.

El ADN genómico se extrajo de la cepa de *Escherichia coli* que produce L-treonina N.º de acceso KCCM 10236 usando el Sistema QIAGEN Genomic-tip. El fragmento de ADN (aproximadamente 1,7 kb) incluyendo el ORF (marco de lectura abierta) del gen *tyrR* se amplificó por PCR usando el ADN genómico extraído como un molde. Los cebadores usados fueron un par de oligonucleótidos (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2). La PCR se realizó durante 30 ciclos, consistiendo cada uno en desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, hibridación durante 30 segundos a 60 °C y extensión durante 90 segundos a 72 °C en orden.

El producto de PCR se cargó en un gel de agarosa al 1,0 % y se sometió a electroforesis. El ADN se purificó a partir de la banda del gen *tyrR* de 1,7 kb. El ADN purificado se ligó al sitio EcoRV del vector de clonación pT7Blue (Novagen Inc., EE.UU.) durante toda la noche a la temperatura de 16 °C para construir el plásmido recombinante pT7Blue/*tyrR* (véase la Figura 1). La construcción del plásmido resultante se transformó en *Escherichia coli* NM522. La cepa transformada se colocó en placa en medio sólido que contenía 50 mg/l de carbencilina y se cultivó durante toda la noche a una temperatura de 37 °C.

Las colonias formadas se cogieron con un lazo de platino y se inocularon en 3 ml de medio LB líquido que contenía carbencilina. Después del cultivo durante toda la noche, los ADN plasmídicos se extrajeron del cultivo usando el Kit Mini Prep de QIAGEN. El extracto de ADN plasmídico se digirió con la enzima de restricción Xmn I y confirmó la clonación del gen *tyrR*. El plásmido confirmado pT7Blue/*tyrR* se escindió con la enzima de restricción Xmn I y el ADN se purificó a partir de una banda de aproximadamente 4,6 kb en gel de agarosa al 0,8 %. El ADN purificado se ligó con extremos romos con un fragmento de aproximadamente 1,2 kb del gen de la resistencia a cloranfenicol incluyendo la región *loxP*, que se obtuvo digiriendo el plásmido ploxP-CAT2 (U. Guldenre y col, Nucleic Acid Research 24 (13), 1996, pp 2519-2524) con la enzima de restricción Hinc II, para construir un plásmido recombinante pT7Δ*tyrR*::*loxP*-CAT de aproximadamente 5,8 kb (véase la Figura 2).

Escherichia coli NM522 se transformó con el plásmido recombinante pT7Δ*tyrR*::*loxP*-CAT. El transformante resultante se cambió a una placa de medio LB sólido que contenía 50 mg/l de carbencilina y 50 mg/l de cloranfenicol y se cultivó durante toda la noche a 32 °C. Las colonias formadas se recogieron con un lazo de platino y se inocularon en 3 ml de medio LB líquido que contenía carbencilina y cloranfenicol. Después de cultivar durante toda la noche, los ADN plasmídicos se extrajeron usando el Kit Mini Prep de QIAGEN. El fragmento de ADN (aproximadamente 2,9 kb) incluyendo el ORF del gen *tyrR* y el sitio *loxP*-CAT se amplificó por PCR usando el ADN plasmídico extraído como un molde. Los cebadores usados fueron un par de oligonucleótidos (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2). La PCR se realizó durante 30 ciclos, consistiendo cada uno en desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, hibridación durante 30 segundos a 60 °C y extensión durante 90 segundos a 72 °C en orden.

El fragmento de ADN resultante Δ*tyrR*::*loxP*-CAT se transformó en cepa de *Escherichia coli* que produce L-treonina N.º de acceso KCCM 10236 por electroporación y el transformante resultante se movió a un medio LB sólido que contenía cloranfenicol para seleccionar colonias que tenían un gen *tyrR* desactivado. Las colonias seleccionadas se ensayaron para su producción de L-treonina en cultivos en matraz.

Ejemplo 2: producción de L-treonina en matraz Erlenmeyer por cepas seleccionadas

Treinta colonias seleccionadas en el Ejemplo 1 se cultivaron en un matraz Erlenmeyer que contenía el medio de titulación de treonina dado en la Tabla 1 a continuación y se comparó la producción de L-treonina.

Tabla 1

Medio de titulación de treonina	
Ingredientes	Concentración (por litro)
Glucosa	70 g
Sulfato de amonio	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 g
Extracto de levadura	2 g
pH 7,0	

Cada colonia se cultivó durante toda la noche en medio LB sólido en una incubadora a 32 °C. Después, se inoculó un lazo de platino del cultivo en 25 ml del medio de titulación y se cultivó a 32 °C y 250 rpm durante 48 horas.

- 5 La L-treonina del cultivo se analizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los resultados del análisis se dan en la Tabla 2 a continuación. Puede verse a partir de los resultados que la cepa prototipo N.º de acceso KCCM 10236 produce 23 g/l de L-treonina y *Escherichia coli* FTR7624 de la presente invención en el que el gen *tyrR* se ha desactivado produce 26 g/l de L-treonina. Por lo tanto, se observó que los presentes microorganismos transformados aumentan la producción de L-treonina hasta aproximadamente un 8 % en comparación con la cepa prototipo. La *Escherichia* seleccionada denominada FTR7624 se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms el 4 de diciembre de 2003 y se les asignó el N.º de acceso KCCM-10538.

Tabla 2

Resultados de análisis de cepas de titulación en matraz		
Cepa	KCCM 10236	FTR7624
L-treonina (g/l)	23	26

- 15 Como se demuestra por los Ejemplos, la capacidad de los microorganismos de biosintetizar L-treonina se mejora por la desactivación del gen *tyrR*. Esto es probablemente porque la expresión del gen *tyrB* se aumenta por la inactivación del gen *tyrR*, aumentando de esta manera la velocidad de suministro de aspartato (APP) que es un intermedio de la biosíntesis de L-treonina. Sin embargo, la mejora en la productividad del microorganismo no se basa solamente en este mecanismo.

- 20 Como se describe anteriormente, el microorganismo que tiene un gen *tyrR* inactivado de la presente invención puede producir L-treonina por fermentación en alto rendimiento.

También de acuerdo con el procedimiento para producir L-treonina de la presente invención, puede producirse un alto rendimiento de L-treonina.

<110> CJ Corporation

- 25 <120> Un microorganismo que produce L-treonina teniendo el gen *tyrR* inactivado, procedimiento para producir el mismo y procedimiento para producir L-treonina usando el microorganismo

<130> PN052459

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

- 30 <210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 659 513 T3

	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 1	
	gcccgcgtgcc gtggattgac gat	23
5	<210> 2	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 2	
	agtttgcgcg tgctgggata attg	24

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* capaz de producir L-treonina y que tiene un gen *tyrR* inactivado, siendo dicho microorganismo *Escherichia coli*, en el que *Escherichia coli* es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina.
2. El microorganismo de la reivindicación 1, en el que el análogo de L-metionina es D,L-etionina, Norleucina, α -metilmetionina o L-metionina-D,L-sulfoximina.
3. El microorganismo de la reivindicación 1, en el que el análogo de L-treonina es ácido α -amino- β -hidroxi valérico o hidroxamato de D,L-treonina.
4. El microorganismo de la reivindicación 1, en el que el análogo de L-lisina es S-(2-aminoetil)-L-cisteína o δ -metil-L-lisina.
5. El microorganismo de la reivindicación 1, en el que al menos una copia del gen de la fosfoenol piruvato carboxilasa (*ppc*) y los genes *thrA*, *thrB* y *thrC* se insertan en un ADN cromosómico, además del gen *ppc* y los genes intrínsecos.
6. El microorganismo de la reivindicación 1, que es *Escherichia coli* FTR7624 KCCM-10538.
7. Un procedimiento de producción de un microorganismo que produce L-treonina, comprendiendo el procedimiento:
 - preparar un gen *tyrR* inactivado o un fragmento de ADN del mismo;
 - introducir el gen *tyrR* inactivado o el fragmento de ADN del mismo en un microorganismo capaz de producir L-treonina para producir la recombinación con un gen *tyrR* presente en un cromosoma del microorganismo, en el que *Escherichia coli* es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina; y
 - seleccionar microorganismos que tengan un gen *tyrR* inactivado.
8. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el gen *tyrR* inactivado o el fragmento de ADN del mismo se prepara insertando una casete que contiene un marcador de antibiótico (*loxP*CAT) en un gen *tyrR*.
9. Un procedimiento de producción de L-treonina que comprende cultivar el microorganismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y aislar L-treonina del cultivo.
10. Un procedimiento de producción del microorganismo que produce L-treonina en el que:
 - (a) el ADN genómico se aísla de una cepa que es capaz de producir L-treonina y se realiza una PCR usándolo como un molde para amplificar el gen *tyrR*,
 - (b) el gen *tyrR* obtenido se clona en un plásmido u otro vector,
 - (c) el vector recombinante se introduce por transformación en una célula hospedadora,
 - (d) el vector recombinante que tiene genes *tyrR* se extrae después de que el transformante se haga crecer y las células se aíslan,
 - (e) se inserta un fragmento génico resistente a antibióticos en el gen *tyrR* del vector recombinante extraído para formar un vector recombinante que tiene un gen *tyrR* inactivado,
 - (f) el vector recombinante se introduce por transformación en una célula hospedadora y la célula hospedadora se cultiva en un medio de cultivo,
 - (g) el vector recombinante propagado se aísla del transformante resultante y la secuencia de polinucleótido que tiene un gen *tyrR* inactivado se obtiene por digestión o digestiones de enzimas de restricción,
 - (h) la secuencia de polinucleótido se introduce en un hospedador que es capaz de producir L-treonina, en la que la célula hospedadora en la etapa (c) es *Escherichia coli* y *Escherichia coli* es resistente a análogos de L-metionina, L-treonina y L-lisina y ácido α -aminobutírico y tiene un requisito nutricional de metionina y un requisito parcial de isoleucina.

FIG. 1

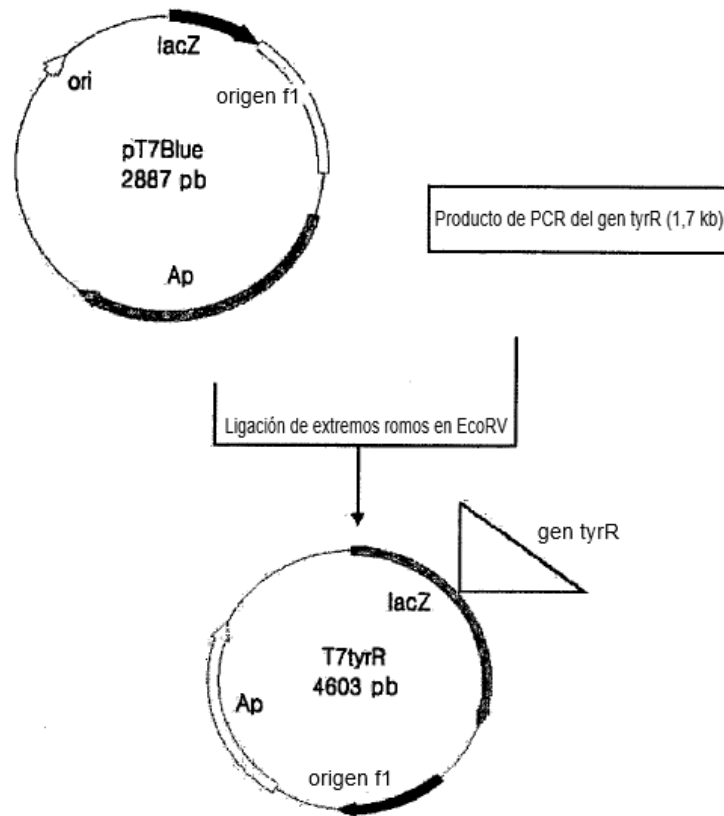


FIG. 2

