

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 522**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2014 PCT/KR2014/003613**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14208884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2014 E 14818556 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3015547**

54 Título: **Variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 y método de producción de L-treonina utilizando un microorganismo que exprese la variante**

30 Prioridad:

24.06.2013 KR 20130072181

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

12.12.2018

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center 330, Dongho-ro Jung-gu
Seoul 04560, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, JI SUN;
LEE, KWANG HO;
KOH, EUN SUNG;
KIM, HYUNG JOON;
LEE, KEUN CHEOL y
HWANG, YOUNG BIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 693 522 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

Variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 y método de producción de L-treonina utilizando un microorganismo que exprese la variante

5

Campo Técnico

La presente solicitud se refiere a una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 y a un método de producción de L-treonina utilizando la misma.

10

Técnica anterior

El uso de la L-treonina, un tipo de aminoácido esencial, está muy extendido como aditivo para piensos y alimentos, y también se utiliza de un modo eficaz en soluciones de rehidratación y materiales sintéticos para uso médico y farmacéutico.

15

La L-treonina se produce principalmente por fermentación utilizando *Escherichia coli* o *Corynebacterium*, desarrolladas por métodos de mutación artificial o métodos de recombinación genética. Las cepas mutantes artificiales procedentes de cepas de tipo silvestre, incluyendo *Escherichia coli*, *Serratia*, *Providencia* o *Corynebacterium*, se utilizan en general para la producción de L-treonina.

20

Con el desarrollo de la tecnología de la recombinación genética, para cepas que tienen productividad de L-treonina por mutación al azar, se han descrito tecnologías de manipulación tales como el reemplazo génico específico de sitio, la amplificación y delección génica, etc. para mejorar la productividad de L-treonina. Se han desarrollado genes relacionados con la biosíntesis de la treonina y varios métodos para aumentar la expresión de estos genes, pero aún existe una demanda de un método que sea capaz de producir L-treonina con un rendimiento más alto.

25

La maquinaria de transcripción global funciona controlando los transcritos en todos los sistemas celulares (procariotas y eucariotas). La modificación por ingeniería genética de la maquinaria de transcripción global proporciona células recombinantes que comprenden un regulador global que tiene caracteres mejorados mutando ya sea un ácido nucleico que codifica el regulador global o un promotor que controla su expresión, y mediante este método pueden producirse células con fenotipos mejorados.

30

Un factor sigma es un tipo de regulador global que desempeña un papel importante en la regulación de la transcripción global en función de la preferencia del promotor de la holoenzima ARN polimerasa. Un factor sigma es un factor de inicio de la transcripción procariota, que permite la unión específica de la ARN polimerasa con genes promotores. Cada factor sigma se activa en respuesta a diferentes condiciones ambientales, y cada molécula de ARN polimerasa contiene una subunidad de factor sigma. Se sabe que *E. coli* tiene al menos ocho factores sigma y que el número de factores de sigma varía dependiendo de la especie bacteriana.

35

40

Los autores de la presente invención han realizado estudios para modificar el gen rpoH que codifica el factor sigma-32, que se sabe que controla la respuesta al choque térmico con el fin de potenciar adicionalmente la resistencia al estrés a alta temperatura de una cepa de *E. coli* que tiene productividad de L-treonina. Como resultado, los autores de la presente invención han desarrollado una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 que regula el mecanismo transcripcional para que la productividad de la treonina no disminuya en gran medida incluso a altas temperaturas, y han introducido la variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 en una cepa productora de treonina, completando así la presente solicitud.

45

El documento US 5.200.341 desvela un gen rpoH que codifica una proteína σ^{32} en la que en el resto de aminoácido 268 en lugar de arginina hay cisteína, que se aisló de un mutante de la cepa W3110 de *Escherichia coli*. El gen rpoH tiene timina en lugar de citosina en la posición del nucleótido correspondiente a 802 en el gen rpoH de tipo silvestre.

50

El documento US 6.156.532 desvela un microorganismo utilizado para producir sustancias útiles, tales como aminoácidos, cultivando el microorganismo en un medio para permitir que se produzca un producto fermentativo y se acumule en el medio y recoger el producto fermentativo, en el que el microorganismo a utilizar se modifica introduciendo al menos uno de un gen que codifica una proteína de choque térmico y un gen que codifica un factor σ que funciona específicamente para que el gen de la proteína de choque térmico para potencie la cantidad de expresión de la proteína de choque térmico en las células, por lo que se permite que el microorganismo tenga resistencia añadida al estrés que, de otro modo, restringiría el crecimiento del microorganismo y/o la producción del producto fermentativo.

55

60

Divulgación

Problema técnico

65

Es un objeto de la presente solicitud proporcionar una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32.

Otro objeto de la presente solicitud es proporcionar una secuencia de nucleótidos que codifique la variante de ARN polimerasa de factor sigma 32.

5 Incluso otro objeto de la presente solicitud, es proporcionar es un vector que comprenda la secuencia de nucleótidos.

Incluso otro objeto de la presente solicitud, es proporcionar un microorganismo recombinante del género *Escherichia* que tenga productividad de L-treonina, que exprese la variante.

10 Incluso otro objeto de la presente solicitud, es proporcionar un método de producción de L-treonina utilizando el microorganismo del género *Escherichia*.

Solución técnica

15 Para lograr los objetos anteriores, la presente solicitud proporciona una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 17

20 La presente solicitud también proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la variante de ARN polimerasa de factor sigma 32.

La presente solicitud también proporciona un microorganismo recombinante del género *Escherichia* que tiene productividad de L-treonina, que expresa la variante.

25 La presente solicitud también proporciona un método de producción de L-treonina utilizando el microorganismo del género *Escherichia*.

Efectos ventajosos

30 De acuerdo con la presente solicitud, una cepa transformada con un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 tiene resistencia al estrés a alta temperatura, tiene resistencia a la temperatura y también puede producir L-treonina con un rendimiento aumentado. Por tanto, puede producir treonina con una productividad significativamente alta en comparación con las cepas convencionales, incluso cuando se cultiva a altas temperaturas. Por consiguiente, puede utilizarse de un modo eficaz para producir treonina en alto rendimiento.

35 Modo para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, en el presente documento, la presente solicitud se describirá con detalle.

40 La presente solicitud proporciona una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 17.

45 Tal y como se usa en el presente documento, la expresión "factor sigma 32 (σ^{32})" se refiere al factor sigma regulador global conocido como un factor sigma principal que controla la respuesta al choque térmico en la fase logarítmica y que está codificado por el gen *ropH*.

50 Además, fuera del alcance de las reivindicaciones, se desvelan variantes que tienen una homología de al menos 80 %, específicamente de al menos 90 %, más específicamente de al menos 95 % y, en particular, específicamente de al menos 99 %, con las secuencias de aminoácidos de la variante de la presente solicitud. La homología de la secuencia de aminoácidos puede determinarse utilizando, por ejemplo, el algoritmo de BLAST o de Karlin y Altschul (véase Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)) o FASTA (véase Methods Enzymol., 183, 63 (1990)). Los programas denominados BLASTN y BLASTX se han desarrollado basándose en este algoritmo de BLAST (consúltese www.ncbi.nlm.nih.gov). Fuera del alcance de las reivindicaciones, la variante de la presente solicitud incluye mutantes que tienen una sustitución, delección e inserción de aminoácidos y similar, en comparación con la secuencia de aminoácidos de la variante, y también mutantes que tienen una sustitución codónica.

60 En una realización de la presente solicitud, se seleccionó una variante de un conjunto de ADN de *ropH* mutado obtenido introduciendo mutaciones al azar en la cepa W3110 de *E. coli* de tipo silvestre, y la variante seleccionada se denominó *ropH*^{2-G6}. La secuencia de nucleótidos de la variante extraída se analizó, y como resultado, pudo observarse que se producía una mutación en la secuencia de aminoácidos de la variante en comparación con la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de una ARN polimerasa factor sigma 32 de tipo silvestre (Ejemplo 3).

La presente solicitud también proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica la variante.

65 En una realización de la presente solicitud, la variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 puede tener específicamente una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15.

En una realización de la presente solicitud, el código genético de la secuencia de nucleótidos que codifica la variante puede estar generado. En este caso, la degeneración del código genético es un fenómeno en el que la última letra del código genético no tiene sentido. Si las dos primeras bases son iguales, codifican lo mismo, incluso cuando los códigos en las posiciones son diferentes.

5 Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos de la variante desvelada puede tener una homología de al menos 80 %, específicamente de al menos 90 %, más específicamente de al menos 95 %, lo más específicamente de 99 %, con una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15.

10 La presente solicitud también proporciona un vector que comprende la secuencia de nucleótidos.

El vector utilizado en la presente solicitud no está específicamente limitado y puede ser cualquier vector conocido en la técnica, siempre que pueda replicarse en un hospedador. Como ejemplos de vectores que se utilizan normalmente se incluyen plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos, naturales o recombinantes. Por ejemplo, el vector de fago o vector de cósmido utilizado en la presente solicitud puede ser pWE15, M13, λ MBL3, λ MBL4, λ XII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, Charon21A o similares, y el vector de plásmido utilizado en la presente solicitud puede ser el tipo pBR, tipo pUC, tipo pBluescriptII, tipo pGEM, tipo pTZ, tipo pCL, tipo pET o similares. Un vector que puede utilizarse en la presente solicitud no está específicamente limitado y puede ser cualquier vector de expresión conocido en la técnica. Específicamente, puede utilizarse un vector pACYC177, pACYC184, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322, pMW118 o pCCIBAC. Más específicamente, puede utilizarse un vector pACYC177, pCL o pCCIBAC.

La presente solicitud proporciona un microorganismo recombinante del género *Escherichia* que tiene productividad de L-treonina, que expresa la variante.

25 En la presente solicitud, la expresión de la variante puede realizarse bien por transformación con un vector recombinante que comprende operativamente un gen que codifica la variante o por inserción de un polinucleótido que codifica la variante en el cromosoma del microorganismo, pero no está específicamente limitado a esto.

30 Como se usa en el presente documento, el término "transformación" significa introducir, en la célula hospedadora, un vector que comprenda un polinucleótido que codifique una proteína diana, para permitir que exprese una proteína codificada por el nucleótido. El polinucleótido introducido puede insertarse y localizarse en el cromosoma de la célula hospedadora o localizarse fuera del cromosoma, siempre que pueda expresarse en la célula hospedadora. Además, los polinucleótidos incluyen ADN y ARN, que codifican la proteína diana. Siempre que el polinucleótido pueda introducirse en la célula hospedadora y expresarse en su interior, este puede introducirse en cualquier forma. Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en la célula hospedadora en forma de un casete de expresión que es una construcción polinucleotídica que incluye todos los elementos necesarios para la autoexpresión. El casete de expresión incluye generalmente un promotor que está unido operativamente a la fase de lectura abierta (en lo sucesivo abreviada como "ORF" de las siglas en inglés *Open Reading Frame*) del gen, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma, y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión autorreplicable. Además, el polinucleótido puede introducirse en la célula hospedadora por sí mismo y unirse operativamente a la secuencia necesaria para la expresión en la célula hospedadora.

45 En la presente solicitud, la transformación puede realizarse bien por transducción de un vector que comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique la variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 o por inserción de la secuencia de nucleótidos en el cromosoma del microorganismo, pero no está específicamente limitado a esto.

50 El microorganismo de la presente solicitud incluye un microorganismo procariota, siempre y cuando pueda producir L-treonina. Por ejemplo, puede incluir un microorganismo perteneciente al género *Escherichia*, al género *Erwinia*, al género *Serratia*, al género *Providencia*, al género *Corynebacterium* o al género *Brevibacterium*. Específicamente, el microorganismo utilizado en la presente solicitud es el género *Escherichia*. Más específicamente, es la especie *Escherichia coli*.

55 En una realización de la presente solicitud, como cepa precursora, puede utilizarse una cepa productora de treonina. La cepa productora de treonina puede ser una cepa de *E. coli* que tenga un fenotipo auxótrofo para la metionina, resistencia a un análogo de treonina, resistencia a un análogo de lisina, resistencia a un análogo de isoleucina y resistencia a un análogo de metionina. Además, la cepa productora de treonina puede ser una cepa de *E. coli* recombinante obtenida manipulando el gen de la biosíntesis de treonina o similar. Por ejemplo, puede ser una cepa de *E. coli* recombinante que tenga introducida en su interior una copia de cada uno del gen de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc) y un operón que comprenda aspartoquinasa L-homoserina deshidrogenasa (thrA), homoserina quinasa (thrB) y treonina sintasa (thrC). Como alternativa, puede ser una cepa de *E. coli* recombinante obtenida inactivando tanto un gen de operón (tdcBc), que está implicado en la degradación de la L-treonina, como una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (pckA).

65

Específicamente, una cepa utilizada en la presente solicitud puede ser una cepa seleccionada del grupo que consiste en *E. coli* KCCM10541P (Patente Coreana N. ° 10-0576342), *E. coli* ABA5G/pAcscBAR¹-M, pC-P_{trc}-scrAB (Patente Coreana N. ° 10-1145943) y *E. coli* KCCM11167P (Publicación de Patente Coreana abierta a inspección pública N. ° 10-2012-0083795).

En una realización de la presente solicitud, el microorganismo transformado puede ser *E. coli*. FTR2700.

En una realización de la presente solicitud, el microorganismo de la presente solicitud puede ser una cepa de *E. coli* que tenga uno o más fenotipos deseados para potenciar la productividad de LA L-treonina. Específicamente, el uno o más fenotipos deseados son fenotipos resistentes a temperatura.

La presente solicitud también proporciona un método de producción de L-treonina utilizando la cepa transformada.

El método de cultivo en la presente solicitud puede realizarse en medios adecuados y en condiciones de cultivo adecuadas conocidos en la materia. Dependiendo del tipo de cepa que se seleccione, este método de cultivo puede modificarlo fácilmente cualquier persona experta en la materia. Como ejemplos de métodos de cultivo se incluyen, pero sin limitación, el cultivo discontinuo, el cultivo continuo y el cultivo semicontinuo.

El medio y las condiciones de cultivo que se utilizan en el cultivo del microorganismo de la presente solicitud, pueden ser cualquiera de los que se utilizan generalmente en el cultivo de microorganismos del género *Escherichia*, pero estos deben satisfacer adecuadamente los requisitos del microorganismo de la presente solicitud.

En una realización específica, el microorganismo de la presente solicitud puede cultivarse en un medio convencional que contenga fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y similares, que sean adecuados, en condiciones aerobias, ajustando al mismo tiempo la temperatura, el pH y parámetros similares.

Las fuentes de carbono que pueden utilizarse en la presente solicitud incluyen hidratos de carbono tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, sorbitol; alcoholes, tal como, alcohol de azúcar, glicerol, ácido pirúvico, ácido láctico y ácido cítrico; y aminoácidos, tales como, ácido orgánico, ácido glutámico, metionina y lisina. Además, pueden utilizarse fuentes de nutrientes orgánicos naturales, tales como, hidrolizados de almidón, melazas, melazas residuales, salvado de arroz, yuca, bagazo y licor de macerado de maíz. Específicamente, pueden utilizarse hidratos de carbono tales como glucosa y melazas estériles previamente tratadas (es decir, melazas convertidas en azúcares reducidos). Además, pueden utilizarse, sin limitación, cantidades adecuadas de otras fuentes de carbono. Las fuentes de nitrógeno que pueden utilizarse en la presente solicitud incluyen fuentes de nitrógeno inorgánico tales como amoniaco, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio; aminoácidos, tales como, ácido glutámico, metionina y glutamina; y fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta, licor de macerado de maíz, hidrolizado de caseína, harina de pescado o su producto digerido, torta de soja desgrasada o su producto digerido, etc. Estas fuentes de nitrógeno pueden utilizarse solas o en combinación. El medio puede contener, como fuentes de fósforo, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico y sales correspondientes que contengan sodio. Los compuestos inorgánicos que pueden utilizarse en la presente solicitud incluyen cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de hierro, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sulfato de manganeso y carbonato de calcio. Además, el medio puede contener aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. Estas fuentes o precursores pueden añadirse al medio de manera discontinua o continua.

Durante el cultivo, para ajustar el pH del medio de cultivo, pueden añadirse al medio, de manera adecuada, compuestos tales como, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. Además, durante el cultivo, puede utilizarse un agente antiespumante, tal como éster de poliglicol de ácido graso, para suprimir la formación de burbujas. Además, para mantener el medio de cultivo en un estado aerobio, puede inyectarse oxígeno o un gas que contenga oxígeno en el medio de cultivo. Además, para mantener el medio de cultivo en un estado anaerobio o no aerobio, no se inyecta gas o puede inyectarse nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono en el medio de cultivo. El medio de cultivo puede mantenerse típicamente a una temperatura que varíe de 27 °C a 37 °C, y específicamente de 30 °C a 37 °C. El cultivo del microorganismo puede continuar hasta que se obtenga el nivel deseado de la sustancia útil. Específicamente, el periodo de cultivo puede ser de 10 a 100 horas.

El método de la presente solicitud puede comprender adicionalmente una etapa de purificación o de recuperación de la L-treonina producida en la etapa de cultivo. El método de purificación o de recuperación puede realizarse purificando o recuperando la L-treonina deseada del medio de cultivo utilizando un método adecuado dependiendo de un método utilizado para el cultivo del microorganismo en la presente solicitud, por ejemplo, un método discontinuo, continuo o semidiscontinuo.

En lo sucesivo, la presente solicitud se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, debe entenderse, que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente solicitud.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción del vector recombinante pCC1BAC-rpoH

5 (1) Preparación del fragmento génico *rpoH*

Para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb que comprenda el gen *rpoH* (secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 y secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16), el ADN genómico (ADNg) de la cepa W3110 de *E. coli* de tipo silvestre, se aisló con un sistema Genomic-tip (Qiagen). Utilizando el ADNg como
10 molde, se realizó una reacción en cadena de polimerasa (en lo sucesivo abreviada como "PCR" por sus siglas del inglés *polymerase chain reaction*) utilizando un kit de PCR HL premix (BIONEER, en lo sucesivo el mismo).

La reacción de la PCR para amplificar el gen *rpoH* se realizó utilizando los cebadores de las SEQ ID NO: 1 y 2 durante 27 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C
15 durante 30 s y elongación a 72 °C durante 1 min.

El producto de la PCR se digirió con *EcoRI*, y el fragmento de ADN de 1,0 kb (en lo sucesivo denominado "fragmento *rpoH*") se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % y después se recogió por elución.

20 (2) Construcción del vector recombinante pCC1BAC-rpoH

Cada uno de un vector listo para clonación, copycontrol pCC1BAC *EcoRI* (EPICENTRE (USA)) y el *rpoH* obtenido en el Ejemplo 1-(1), se trataron con la enzima de restricción *EcoRI* y se ligaron entre sí, construyendo de este modo un
25 plásmido pCC1BAC-rpoH.

Ejemplo 2: Construcción de una biblioteca de variantes del vector recombinante pCC1BAC-rpoH

(1) Preparación de variantes de *rpoH* por PCR propensa a error

Para obtener un conjunto de ADN que consistía en fragmentos de variantes de *rpoH* que tenían mutaciones al azar introducidas en su interior, se realizó PCR utilizando como molde el ADNg de la cepa W3110 (extraído en el Ejemplo 1-(1)), en las condiciones de reacciones de mutagénesis 4 mostradas en la Tabla III del manual de usuario de un kit de mutagénesis al azar por PCR diversificada (catálogo N. ° K1830-1; Clontech). La PCR se realizó utilizando los
30 cebadores de las SEQ ID NO: 1 y 2 durante 25 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 94 °C durante 30 s y elongación a 68 °C durante 1 min.

El producto de la PCR se digirió con *EcoRI*, y el fragmento de ADN de 1,0 kb (en lo sucesivo denominado "fragmento *rpoH*^m") se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % y después se recogió por elución.

40 (2) Construcción de una biblioteca de variantes del vector recombinante pCC1BAC-rpoH

Un vector listo para clonación copycontrol pCC1BAC *EcoRI* se ligó con el fragmento *rpoH*^m obtenido en el Ejemplo 2-(1), construyendo de este modo un vector pCC1BAC-*rpoH*^m.

El vector construido se transformó en *E. coli* Electrocompetente TransforMax EPI300 (EPICENTRE) y después, en una placa con caldo LB (Luria Bertani) + cloranfenicol 15 µg/ml + X-Gal 40 µg/ml + IPTG 0,4 mM, se realizó la selección de las colonias. Se confirmó que no se detectaron colonias de color azul. Las colonias seleccionadas se recogieron y se sometieron a una preparación de plásmidos construyendo así una biblioteca de variantes de
45 pCC1BAC-rpoH.

50 (3) Introducción de variantes de pCC1BAC-rpoH en una cepa productora de treonina

Cada una de la biblioteca de variantes de pCC1BAC-rpoH, obtenida en el Ejemplo 1-(2) y pCC1BAC-rpoH obtenida en el Ejemplo 2-(2), se introdujo por transformación en la cepa KCCM 10541 de *E. coli* productora de treonina preparada de una manera competente, y las cepas resultantes se denominaron "KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH" y "biblioteca de mutantes de KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH", respectivamente.
55

La cepa KCCM10541 de *E. coli* utilizada como cepa precursora en este Ejemplo, es una cepa que tiene productividad de L-treonina potenciada como resultado de la inactivación del gen *tyrR* y del gen *galR* presentes en el cromosoma de la cepa precursora KCCM 10236 de *Escherichia coli* con características, entre las que se incluyen, un fenotipo auxótrofo de metionina, un fenotipo auxótrofo de isoleucina permeable, resistencia a un análogo de L-treonina (por ejemplo, ácido α-amino-β-hidroxi valérico (AHV), resistencia a un análogo de L-lisina (por ejemplo, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC)), resistencia a un análogo de isoleucina (por ejemplo, ácido α-aminobutírico) y resistencia a un análogo de metionina (por ejemplo, etionina) (Patente Coreana registrada N.º 10-0576342).
60

65

Ejemplo 3: Selección de una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 que tiene resistencia a la temperatura

En este Ejemplo, se realizó un experimento para seleccionar una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 que tiene resistencia a la temperatura.

Cada una de la biblioteca de mutantes de *E. coli* KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH y *E. coli* KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH preparada en el Ejemplo 2-(3) se cultivó durante una noche en medio sólido con LB en una incubadora a 37 °C y 33 °C. Un asa de siembra de platino de cada una de las cepas cultivadas, se inoculó en 25 ml del medio de titulación mostrado a continuación en la Tabla 1, y después se cultivó durante 48 horas en una incubadora con agitación a 37 °C, 33 °C y a 200 rpm .

Tabla 1

| Composición | Concentración (por litro) |
|---|---------------------------|
| Glucosa | 70 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 27,5 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 |

Cada una de las colonias que tenía la biblioteca de variantes de *rpoH* introducida en su interior, se cultivó a 37 °C, y las variantes que mostraban un aumento en la concentración de treonina en comparación con KCCM10541/pCC1BAC-rpoH, se seleccionaron y se cultivaron a 33 °C. De esta manera, se realizó la evaluación de la biblioteca de mutantes de *rpoH* repitiendo el cultivo y el método de selección. A través de este método, se seleccionó un clon mejorado tanto en resistencia a la temperatura como en rendimiento. Se extrajo un vector del clon seleccionado y se denominó pCC1BAC-rpoH^{2-G6}.

Para detectar una mutación en pCC1BAC-rpoH^{2-G6}, pCC1BAC-rpoH^{2-G6} se amplificó por PCR utilizando los cebadores de pIB FP (SEQ ID NO: 3) y pIB RP (SEQ ID NO: 4) proporcionados como cebadores para la detección en el vector listo para clonación copycontrol pCC1BAC *EcoRI* y el producto de la PCR se secuenció. Los resultados de la secuenciación indicaron que rpoH^{2-G6} (SEQ ID NO: 15), y la variante de *rpoH*, tenían una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

Ejemplo 4: Comparación de la Productividad de L-treonina de cepas recombinantes

El vector pCC1BAC-rpoH^{2-G6} obtenido del Ejemplo 3 se transformó en *E. coli* KCCM 10541 para de este modo preparar *E. coli* KCCM 10541/ pCC1BAC-rpoH^{2-G6}.

Cada una de la cepa precursora de *E. coli* KCCM 10541, la cepa de *E. coli* KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH y la cepa de *E. coli* KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH^{2-G6}, se cultivó en un matraz de *Erlenmeyer* utilizando el medio de titulación de treonina mostrado en la Tabla 1 anterior, y se analizaron sus productividades de L-treonina. Los resultados de los análisis se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

| Cepa | L-treonina (g/l) | |
|--|------------------|-------|
| | 33 °C | 37 °C |
| KCCM 10541 (cepa precursora) | 30,6 | 25,0 |
| KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH | 30,5 | 26,1 |
| KCCM 10541/ pCC1BAC-rpoH ^{2-G6} | 31,1 | 31,8 |

Como se muestra en la Tabla 2 anterior, la cepa precursora de *E. coli* KCCM10541 y la cepa de control KCCM10541/pCC1BAC-rpoH produjeron 30,6 g/l y 30,5 g/l de L-treonina, respectivamente, cuando se cultivaron durante 48 horas, pero la cepa de *E. coli* KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH^{2-G6} produjo 31,1 g/l de L-treonina, y por tanto mostró un aumento en la productividad de L-treonina de aproximadamente 1 %P en comparación con la cepa precursora.

A 37 °C, la cepa precursora (KCCM 10541) y la cepa de control (KCCM10541/pCC1BAC-rpoH) mostraron una disminución en la producción, mientras que la cepa KCCM 10541/pCC1BAC-rpoH^{2-G6} mostró disminución no dependiente de la temperatura en la concentración de productividad de L-treonina y produjo 31,8 g/l de L-treonina, lo que sugiere que muestra un aumento en la productividad de treonina de aproximadamente 8 %P en comparación con el grupo de control cuando se cultiva a altas temperaturas.

Ejemplo 5: Comparación de Efectos de la variante rpoH seleccionada (rpoH^{2-G6}) utilizando otras cepas productoras de treonina

(1) Análisis de los Efectos de la variante rpoH (rpoH^{2-G6}) en la cepa ABA5G/pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB

Efectos del vector pCC1BAC-rpoH^{2-G6} confirmado en el Ejemplo 4, el vector se introdujo en la cepa productora de treonina ABA5G/pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB (Patente Coreana N.º 10-1145943) para construir de este modo ABA5G/pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB, pCC1BAC-rpoH^{2-G6}. Después se realizó la evaluación del título utilizando el medio de titulación preparado como se muestra a continuación en la Tabla 3. Los resultados de la evaluación se muestran en la Tabla a continuación.

La cepa precursora ABA5G/pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB utilizada en este Ejemplo es una cepa de *E. coli* que tiene productividad de L-treonina, obtenida transformando la cepa productora de treonina ABA5G (que es una cepa construida induciendo una mutación con NTG (nitrosoguanidina) en la cepa precursora de *E. coli* W3110 y que tiene un fenotipo auxótrofo de metionina, un fenotipo auxótrofo de isoleucina permeable, resistencia al ácido α-amino-β-hidroxi valérico, resistencia a S-(2-aminoetil)-L-cisteína, y resistencia al ácido 1-azetidín-2- carboxílico, con un vector que comprende un grupo génico pAcscBAR'-M y un grupo génico pC-PtrcscrAB.

Tabla 3

| Composición | Concentración (por litro) |
|---|---------------------------|
| Sacarosa | 70 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 27,5 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 |

Tabla

| Cepa | L-treonina (g/l) | |
|--|------------------|-------|
| | 33 °C | 37 °C |
| ABA5G/pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB | 22,8 | 19,0 |
| ABA5G/pAcscBAR'-M, pC-Ptrc-scrAB, pCC1BAC-rpoH ^{2-G6} | 22,8 | 22,0 |

Como puede observarse en la Tabla 4 anterior, cuando el vector pCC1BAC-rpoH^{2-G6} se introdujo en cepas productoras de treonina distintas de la *E. coli* KCCM10541, la treonina producida a 33 °C se mantuvo a un nivel similar al mostrado en la Tabla 2 anterior, y la treonina producida a 37 °C se mantuvo a un nivel similar al de la treonina producida observada a 33 °C.

(2) Efectos del análisis de la variante rpoH (rpoH^{2-G6}) en la cepa de E. coli KCCM11167P

El vector pCC1BAC-rpoH^{2-G6} se introdujo en otra cepa de *E. coli* KCCM11167P productora de treonina (Solicitud de Patente Coreana N.º 2011-0005136 publicada como EP-A-2665809) para construir de este modo *E. coli* KCCM11167P/pCC1BAC-rpoH^{2-G6}, y la productividad de treonina de la cepa construida se evaluó utilizando el medio de titulación preparado como se muestra en la Tabla 1 anterior. Los resultados de la evaluación se muestran a continuación en la Tabla 5.

La cepa precursora de *E. coli* KCCM11167P utilizada en este Ejemplo es una cepa obtenida inactivando *tdcB* en una cepa KCCM10541 (Patente Coreana N.º 10-0576342) y potenciando *nadK* en dos copias para potenciar la actividad NAD quinasa.

Tabla 5

| Cepa | L-treonina (g/l) | |
|---|------------------|-------|
| | 33 °C | 37 °C |
| KCCM11167P | 30,1 | 26,2 |
| KCCM11167P/pCC1BAC-rpoH ^{2-G6} | 30,2 | 29,8 |

Como puede observarse en los resultados de evaluación de titulación indicados en la Tabla 5 anterior, cuando se introdujo pCC1BAC-rpoH^{2-G6} en la cepa que tenía productividad de treonina, el rendimiento de la treonina a 33 °C se mantuvo y el rendimiento de la treonina a 37 °C se mantuvo a un nivel similar al rendimiento de treonina a 33 °C, igual que cuando se introdujo pCC1BAC-rpoH^{2-G6} en la cepa diferente productora de treonina como se describe en el Ejemplo 5-(1).

Ejemplo 6: Inserción adicional de la variante rpoH seleccionada (rpoH^{2-G6}) en cromosomas

(1) Preparación del fragmento del casete de integración rpoH^{2-G6}

Para insertar adicionalmente en un cromosoma, la variante rpoH^{2-G6} seleccionada en el Ejemplo 3, se construyó un casete de integración lineal. El casete de integración lineal se construyó de la siguiente manera.

Se realizó PCR utilizando como molde el ADNg de *E. coli* W3110 y los cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 6. La PCR se realizó durante 27 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 30 s. El fragmento de ADN resultante se denominó "región 1 homóloga".

Utilizando como molde pMloxCmt y los cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 8, se realizó una PCR para amplificar un casete loxP mutante-Cm^r-loxP durante 27 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 1 min. En este caso, pMloxCmt utilizado molde, es un vector construido por un experto en la materia basándose en un informe de un método mejorado de delección génica que utiliza loxP mutante, denominado lox71 y lox66 de Suzuki et al. (Suzuki N. et al., Appl. Environ. Microbiol. 71: 8472, 2005).

La región 1 homóloga obtenida y el fragmento del casete loxP mutante-Cm^r-loxP se sometieron a PCR de extensión solapada utilizando los cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 8, obteniendo de este modo "región 1 homóloga-loxP mutante-Cm^r-loxP". En este caso, la PCR se realizó sin cebadores durante 5 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 90 s, y después se realizó en presencia de cebadores durante 23 ciclos.

Utilizando como molde pCC1BAC-rpoH^{2-G6} y los cebadores de las SEQ ID NO: 9 y 10, se realizó PCR durante 27 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 1 min.

Utilizando como molde el ADNg de *E. coli* W3110 y los cebadores de las SEQ ID NO: 11 y 12, se realizó PCR durante 27 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 30 s. El fragmento de ADN resultante se denominó "región 2 homóloga".

La variante rpoH^{2-G6} y la región 2 homóloga se sometieron a PCR de extensión solapada utilizando los cebadores de las SEQ ID NO: 9 y 12, obteniendo de este modo "rpoH^{2-G6}. región 2 homóloga". En este caso, la PCR se realizó sin cebadores durante 5 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 90 s y después se realizó en presencia de cebadores durante 23 ciclos.

Utilizando la "región 1 homóloga-loxP mutante -Cm^r-loxP" obtenida, la "rpoH^{2-G6} - región 2 homóloga" como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 12, se realizó PCR de extensión solapada, construyendo de este modo un casete de integración rpoH^{2-G6}. En este caso, la PCR se realizó sin cebadores durante 5 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y elongación a 72 °C durante 3 min y después se realizó en presencia de cebadores durante 23 ciclos. Como resultado, se construyó un casete de integración rpoH^{2-G6} representado por SEQ ID NO: 13.

(2) Inserción adicional de la variante rpoH^{2-G6} en cromosomas de la cepa recombinante

Para insertar la variante rpoH^{2-G6} seleccionada en un cromosoma, el casete de integración rpoH^{2-G6} construido en el Ejemplo 6-(1) se purificó y la variante rpoH^{2-G6} se insertó adicionalmente en una región cromosómica después de la rpoH ya existente de *E. coli* KCCM10541 de la misma manera que un método conocido de inactivación de una sola etapa (Warner et al., PNAS, 6; 97(12): 6640, 2000). A continuación, se eliminó el gen marcador de resistencia a antibióticos, construyendo de este modo una cepa que tenía la variante rpoH^{2-G6} adicionalmente insertada en su

interior, y la construcción se secuenció para garantizar que no se introdujera un error de PCR. La cepa construida que tenía $rpoH^{2-G6}$ adicionalmente insertada en su interior se denominó "FTR2700" y la *E. coli* FTR2700 transformada se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (en lo sucesivo como KCCM) el 5 de febrero de 2013 con el número de registro KCCM11368P.

(3) Análisis de productividad de L-Treonina

El microorganismo recombinante construido en el Ejemplo 6-(2) se cultivó en un matraz de *Erlenmeyer* utilizando el medio de titulación de treonina mostrado en la Tabla 1 anterior, y se analizó la productividad de L-treonina del microorganismo.

Un asa de siembra de platino de cada una de las cepas de *E. coli* KCCM 10541 y KCCM11368P, cultivadas durante una noche en medio sólido con LB en una incubadora a 33 °C y 37 °C, se inoculó en 25 ml del medio de titulación mostrado en la Tabla 1 anterior, y después cada una de las cepas de *E. coli* se cultivó durante 48 horas en una incubadora con agitación a 33 °C, 37 °C y a 200 rpm.

Como puede observarse a continuación en la Tabla 6, cuando la cepa precursora KCCM105411 de *E. coli* se cultivó durante 48 horas, produjo 30,3 g/l de L-treonina y la cepa KCCM 11368P de *E. coli* construida en el Ejemplo 6-(2) de la presente solicitud produjo 30,0 g/l de L-treonina, y por tanto mostró una productividad de L-treonina similar a la de la cepa precursora. La cepa precursora (KCCM 10541) mostró disminución en el rendimiento de L-treonina a 37 °C, mientras que la cepa KCCM 11368P no mostró disminución dependiente de la temperatura en la concentración de L-treonina y mostró un aumento en la concentración de L-treonina.

Por tanto, puede observarse que, al igual que la cepa transformada con el vector, la cepa construida en el Ejemplo 6-(2), cuando se cultiva a 37 °C, muestra una productividad de treonina similar o superior a la obtenida cuando se cultiva a 33 °C.

Tabla 6

| Cepa | L-treonina (g/l) | |
|------------------------------|------------------|-------|
| | 33 °C | 37 °C |
| KCCM 10541 (cepa precursora) | 30,3 | 26,0 |
| KCCM 11368P | 30,9 | 32,0 |

Número de registro

Autoridad depositaria: Korean Culture Center of Microorganisms;
 Número de registro: KCCM11368P;
 Fecha de depósito: 5 de febrero de 2013.

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Microorganismos para la producción de L-treonina y proceso para la producción de L-treonina utilizando los mismos

<130> PP14-0106

<160> 17

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 1
 cagtatccgg aattcgcttg cattgaactt gtgga 35

<210> 2
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 693 522 T3

<220>
 <223> cebador

 <400> 2
 5 gtcataccgg aattccttaa tagcggaaat tacgc 35

 <210> 3
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 3
 15 cagtatccgg aattcgcttg cattgaactt gtgga 35

 <210> 4
 <211> 35
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 25
 <400> 4
 gtcataccgg aattccttaa tagcggaaat tacgc 35

 <210> 5
 <211> 27
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador
 35
 <400> 5
 atctagaaag cgcagcgcaa actgttc 27

 <210> 6
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 6
 50 ttctataat gtatgtata cgaacggtaa ccccgactc tcatccaggg 50

 <210> 7
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> cebador

 <400> 7
 60 gcagagaacc ctggatgaga gtccggggtt accgttcgta tagcatacat 50

 <210> 8
 <211> 50

ES 2 693 522 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> cebador

 <400> 8
 gtgatttat ccacaagtc aatgcaagcg gtacctaccg ttogtataat 50

 10 <210> 9
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> cebador

 <400> 9
 tagcatacat tatacgaacg gtaggtaccg cttgcattga acttgtggat 50

 20 <210> 10
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 10
 30 catccagggt tctctgcta atagcggaaa ttacgctca atggcagcac gc 52

 <210> 11
 <211> 50
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 <400> 11
 40 aaaaattgcg tctgcccatt gaagcgtaat ttccgctatt aagcagagaa 50

 <210> 12
 <211> 28
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador

 50 <400> 12
 aaagctttgt ttccggtcac aggcacog 28

 <210> 13
 55 <211> 3136
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> casete de integración rpoH2-G6

ES 2 693 522 T3

<400> 13

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| aagcgcagcg | caaactgttc | ttcaacctgc | gtaaaaccaa | gcagcgtctg | ggctggttta | 60 |
| accaggatga | agtcgaaatg | gtggcccgtg | aactgggCGT | aaccagcaaa | gacgtacgtg | 120 |
| agatggaatc | acgtatggcg | gcacaggaca | tgaccttga | cctgtcttcc | gacgacgatt | 180 |
| cogacagcca | gcogatggct | coggtgctct | atctgcagga | taaatacctc | aactttgcog | 240 |
| acggcattga | agatgataac | tgggaagagc | aggcggcaaa | ccgtctgacc | gacgogatgc | 300 |
| agggtctgga | cgaacgcagc | caggacatca | tccgtgcgcg | ctggctggac | gaagacaaca | 360 |

ES 2 693 522 T3

| | |
|--|------|
| agtccacgtt gcaggaactg gctgaccggt acggogtttc cgctgagcgt gtaocccagc | 420 |
| tggaaaagaa cgcgatgaaa aaattgcgtg ctgccattga agcgtaatth ccgctattaa | 480 |
| gcagagaacc ctggatgaga gtccggggtt aggtgacact atagaacgog gccgccagct | 540 |
| gaagctttac cgttcgtata gcatacatta tacgaagtta tctgcocctga accgacgacc | 600 |
| gggtcgaatt tgctttcga tttctgccat tcatccgctt attatcactt attcaggcgt | 660 |
| agcaccaggc gtttaagggc accaataact gccttaaaaa aattacgccc cgccctgcca | 720 |
| ctcatcgag tactgttgta attcattaag cattctgcog acatggaagc catcacagac | 780 |
| ggcatgatga acctgaatcg ccagcggcat cagcaccttg tcgccttgog tataatattt | 840 |
| gcccatggtg aaaacggggg cgaagaagtt gtccatattg gccacgttta aatcaaaact | 900 |
| ggtgaaactc acccagggat tggctgagac gaaaaacata ttctcaataa acccttagg | 960 |
| gaaataggcc aggttttcac cgtaacacgc cacatcttgc gaatatatgt gtagaaactg | 1020 |
| ccggaaatcg tcgtggtatt cactccagag cgatgaaaac gtttcagttt gctcatggaa | 1080 |
| aacggtgtaa caagggtgaa cactatccca tatcaccagc tcaccgtctt tcattgccat | 1140 |
| acggaattcc ggatgagcat tcatcaggcg ggcaagaatg tgaataaagg ccggataaaa | 1200 |
| cttgtgctta ttttcttta cggctcttaa aaaggccgta atatccagct gaacggtctg | 1260 |
| gttataggta cattgagcaa ctgactgaaa tgcctcaaaa tgttctttac gatgccattg | 1320 |
| ggatatatca acggtggtat atccagtgat tttttctcc attttagctt ccttagctcc | 1380 |
| tgaaaatctc gataactcaa aaaatacggc cggtagtgat cttatttcat tatggtgaaa | 1440 |
| gttggaacct cttacgtgcc gatcaacgtc tcatcttgc caaaagttgg ccagggcct | 1500 |
| cccggtatca acagggacac caggatttat ttattctgog aagtgatctt ccgtcacagg | 1560 |
| tatttattcg gcgcaaagtg cgtcgggtga tgcataactt cgtatagcat acattatacg | 1620 |
| aacggtacct atcagatcca ctagcttga ttgaaactgt ggataaaatc acggtccgat | 1680 |
| aaaacaatga atgataacct cgttgctctt aagctctggc acagttggtg ctaccactga | 1740 |
| agcggcagaa gatatcgatt gagaggattt gaatgactga caaaatgcaa agtttagctt | 1800 |
| tagccccagt tggcaacctg gattcctaca tccgggcagc taacgcgtgg ccgatgttg | 1860 |
| cggctgacga ggagcgggog ctggetgaaa agctgcatta ccatggcgtat ctggaagcag | 1920 |
| ctaaaacgct gatccagtct cacctgcggt ttgttgttca tattgctcgt aattatgogg | 1980 |
| getatggcct gccacaggcg gatttgatc aggaaggtaa catcggcctg atgaaagcag | 2040 |
| tgcgccgttt caaccggaa gcgggtgtgc gcctggtctc cttegccgtt cactggatca | 2100 |
| aagcagagat ccacgaatac gttctgcgta actggcgtat cgtcaaagtt gcgaccacca | 2160 |
| aagcgcagcg caaactgttc ttcaacctgc gtaaaaccaa gcagcgtctg ggctggttta | 2220 |
| accaggatga agtcgaaatg gtggcccgtg aactggcgt aaccagcaaa gaagtacgtg | 2280 |

ES 2 693 522 T3

| | |
|---|------|
| agatggaatc acgtatggcg gcacaggaca tgaccttga cctgtcttcc gacgacgatt | 2340 |
| ccgacagcca gccgatggct ccggtgctct atotgcagga taaatcatct aactttgccg | 2400 |
| acggcattga agatgatatc tgggaagagc agggcgcaaa ccgtctgacc gacgcgatgc | 2460 |
| agggtctgga cgaacgcagc caggacatca tccgtgcgcy ctggctggac gaagacaaca | 2520 |
| agtccacggt gcaggaactg gctgaccggt acggcgttc cgctgagcgt gtcgcgcagc | 2580 |
| tggaaaagaa ccgatgaaa aaattgcgtg ctgccattga agcgtaatc ccgctattaa | 2640 |
| gcagagaacc ctggatgaga gtccgggggt tttgtttttt gggcctctgt aataatcaat | 2700 |
| ttcccctccg gcaaaaagcc aatccccacg cagattgtta ataaactgtc aaaatagcta | 2760 |
| ttccaatc ataaaaatcg ggtatgtttt agcagagtat gctgctaaag cacgggtagt | 2820 |
| catgcataaa acgaaataaa gtgctgaaaa acaacatcac aacacacgta ataaccagaa | 2880 |
| gaatggggat tctcaggatg aacataaagg gtaaagcgtt actggcagga tgtatcgogc | 2940 |
| tggcattcag caatatggct ctggcagaag atattaaagt ccgggtcgtg ggcgcaatgt | 3000 |
| ccggctccgt tgcgcagtac ggtgaccagg agtttaccgg ccgagagcag gcggttgcgg | 3060 |
| atatcaacgc taaaggcggc attaaaggca acaaactgca aatcgtaaaa tatgacgatg | 3120 |
| cctgtgaccc gaaaca | 3136 |

<210> 14
 <211> 984
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 14

5

ES 2 693 522 T3

```

gcttgcattg aacttgtgga taaaatcacg gtctgataaa acagtgaatg ataacctcgt      60
tgctcttaag ctctggcaca gttgttgcta cactgaagc gccagaagat atcgattgag      120
aggatttgaa tgactgacaa aatgcaaagt ttagcttttag cccagttgg caacctggat      180
tcctacatoc gggcagctaa cgcgtggccg atgttgtcgg ctgacgagga gggggcgtg      240
gctgaaaagc tgcattacca tggcgatctg gaagcagcta aaacgctgat cctgtctcac      300
ctgocggttg ttgtcatat tgctcgtaat tatgocggct atggcctgcc acaggcggat      360
ttgattcagg aaggtaacat cggcctgatg aaagcagtgc gccgtttcaa cccggaagtg      420
ggtgtgcgcc tggctcctt cgcggttcac tggatcaaag cagagatcca cgaatacgtt      480
ctgocgtaact ggcgtatcgt caaagttgcg accaccaag cgcagcgcga actgttcttc      540
aacctgcgta aaaccaagca gcgtctgggc tggtttaacc aggatgaagt cgaaatggtg      600
gcccgtaac tggcgtaac cagcaaagac gtacgtgaga tggaatcacg tatggcggca      660
caggacatga cctttgacct gtcttcgac gacgattccg acagccagcc gatggctccg      720
gtgctctatc tgcaggataa atcatctaac tttgccgacg gcattgaaga tgataactgg      780
gaagagcagg cggcaaaccg tctgaccgac gcgatgcagg gtctggacga acgcagccag      840
gacatcatcc gtgcgcgctg gctggacgaa gacaacaagt ccacgttgca ggaactggct      900
gaccgttacg gcgtttccgc tgagcgtgta cgccagctgg aaaagaacgc gatgaaaaaa      960
ttgcgtgctg ccattgaagc gtaa                                             984

```

<210> 15
<211> 984
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

5

<400> 15

ES 2 693 522 T3

```

gcttgcatg aactgtgga taaaatcacg gtccgataaa acaatgaatg ataacctcgt      60
tgctcttaag ctctggcaca gttgttgcta cactgaagc gccagaagat atcgattgag      120
aggatttgaa tgactgacaa aatgcaaagt ttagctttag cccagttgg caacctggat      180
tcctacatcc gggcagctaa cgcgtggcgg atgttgctgg ctgacgagga gcgggcgctg      240
gctgaaaagc tgcattacca tggcgatctg gaagcagcta aaacgctgat ccagtctcac      300
ctgoggtttg ttgtcatat tgctcgtaat tatgogggct atggcctgcc acaggcggat      360
ttgattcagg aaghtaacat cggcctgatg aaagcagtgc gccgtttcaa ccoggaagcg      420
gggtgcgccc tggctcctt cgccttcac tggatcaaag cagagatcca cgaatacgtt      480
ctgcgtaact ggcgtatcgt caaagttgcg accaccaaag cgcagcgcga actgttcttc      540
aacctgcgta aaaccaagca gcgtctgggc tggtttaacc aggatgaagt cgaaatggtg      600
gcccgtaac tgggogtaac cagcaaagaa gtactgaga tggaatcacg tatggcggca      660
caggacatga cctttgacct gtcttcggac gacgattccg acagccagcc gatggctccg      720
gtgctctatc tgcaggataa atcatctaac tttgcccagc gcattgaaga tgatatctgg      780
gaagagcagg cggcaaaccg tctgaccgac gcgatgcagg gtctggacga acgcagccag      840
gacatcatcc gtgcgcgctg gctggacgaa gacaacaagt ccacgttgca ggaactggct      900
gaccgttacg gcgtttccgc tgagcgtgtc cgcagctgg aaaagaacgc gatgaaaaaa      960
ttgcgtgctg ccattgaagc gtaa                                             984

```

<210> 16
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 16

```

Met Thr Asp Lys Met Gln Ser Leu Ala Leu Ala Pro Val Gly Asn Leu
 1           5           10          15
Asp Ser Tyr Ile Arg Ala Ala Asn Ala Trp Pro Met Leu Ser Ala Asp
          20          25          30

```

10

ES 2 693 522 T3

Glu Glu Arg Ala Leu Ala Glu Lys Leu His Tyr His Gly Asp Leu Glu
 35 40 45
 Ala Ala Lys Thr Leu Ile Leu Ser His Leu Arg Phe Val Val His Ile
 50 55 60
 Ala Arg Asn Tyr Ala Gly Tyr Gly Leu Pro Gln Ala Asp Leu Ile Gln
 65 70 75 80
 Glu Gly Asn Ile Gly Leu Met Lys Ala Val Arg Arg Phe Asn Pro Glu
 85 90 95
 Val Gly Val Arg Leu Val Ser Phe Ala Val His Trp Ile Lys Ala Glu
 100 105 110
 Ile His Glu Tyr Val Leu Arg Asn Trp Arg Ile Val Lys Val Ala Thr
 115 120 125
 Thr Lys Ala Gln Arg Lys Leu Phe Phe Asn Leu Arg Lys Thr Lys Gln
 130 135 140
 Arg Leu Gly Trp Phe Asn Gln Asp Glu Val Glu Met Val Ala Arg Glu
 145 150 155 160
 Leu Gly Val Thr Ser Lys Asp Val Arg Glu Met Glu Ser Arg Met Ala
 165 170 175
 Ala Gln Asp Met Thr Phe Asp Leu Ser Ser Asp Asp Asp Ser Asp Ser
 180 185 190
 Gln Pro Met Ala Pro Val Leu Tyr Leu Gln Asp Lys Ser Ser Asn Phe
 195 200 205
 Ala Asp Gly Ile Glu Asp Asp Asn Trp Glu Glu Gln Ala Ala Asn Arg
 210 215 220
 Leu Thr Asp Ala Met Gln Gly Leu Asp Glu Arg Ser Gln Asp Ile Ile
 225 230 235 240
 Arg Ala Arg Trp Leu Asp Glu Asp Asn Lys Ser Thr Leu Gln Glu Leu
 245 250 255
 Ala Asp Arg Tyr Gly Val Ser Ala Glu Arg Val Arg Gln Leu Glu Lys
 260 265 270
 Asn Ala Met Lys Lys Leu Arg Ala Ala Ile Glu Ala
 275 280

<210> 17
 <211> 284
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 17

ES 2 693 522 T3

Met Thr Asp Lys Met Gln Ser Leu Ala Leu Ala Pro Val Gly Asn Leu
 1 5 10 15

Asp Ser Tyr Ile Arg Ala Ala Asn Ala Trp Pro Met Leu Ser Ala Asp
 20 25 30

Glu Glu Arg Ala Leu Ala Glu Lys Leu His Tyr His Gly Asp Leu Glu
 35 40 45

Ala Ala Lys Thr Leu Ile Gln Ser His Leu Arg Phe Val Val His Ile
 50 55 60

Ala Arg Asn Tyr Ala Gly Tyr Gly Leu Pro Gln Ala Asp Leu Ile Gln
 65 70 75 80

Glu Gly Asn Ile Gly Leu Met Lys Ala Val Arg Arg Phe Asn Pro Glu
 85 90 95

Ala Gly Val Arg Leu Val Ser Phe Ala Val His Trp Ile Lys Ala Glu
 100 105 110

Ile His Glu Tyr Val Leu Arg Asn Trp Arg Ile Val Lys Val Ala Thr
 115 120 125

Thr Lys Ala Gln Arg Lys Leu Phe Phe Asn Leu Arg Lys Thr Lys Gln
 130 135 140

Arg Leu Gly Trp Phe Asn Gln Asp Glu Val Glu Met Val Ala Arg Glu
 145 150 155 160

Leu Gly Val Thr Ser Lys Glu Val Arg Glu Met Glu Ser Arg Met Ala
 165 170 175

Ala Gln Asp Met Thr Phe Asp Leu Ser Ser Asp Asp Asp Ser Asp Ser
 180 185 190

Gln Pro Met Ala Pro Val Leu Tyr Leu Gln Asp Lys Ser Ser Asn Phe
 195 200 205

Ala Asp Gly Ile Glu Asp Asp Ile Trp Glu Glu Gln Ala Ala Asn Arg
 210 215 220

Leu Thr Asp Ala Met Gln Gly Leu Asp Glu Arg Ser Gln Asp Ile Ile
 225 230 235 240

Arg Ala Arg Trp Leu Asp Glu Asp Asn Lys Ser Thr Leu Gln Glu Leu
 245 250 255

Ala Asp Arg Tyr Gly Val Ser Ala Glu Arg Val Arg Gln Leu Glu Lys
 260 265 270

Asn Ala Met Lys Lys Leu Arg Ala Ala Ile Glu Ala
 275 280

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 17.
2. Una secuencia de nucleótidos que codifica la variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 de la reivindicación 1.
- 10 3. La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 2, estando la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 15.
4. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la reivindicación 2 o reivindicación 3.
- 15 5. Un microorganismo recombinante del género *Escherichia* que tiene productividad de L-treonina, que expresa la variante de la reivindicación 1.
- 20 6. El microorganismo recombinante del género *Escherichia* que tiene productividad de L-treonina de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el microorganismo recombinante se transforma bien mediante un vector recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de ARN polimerasa de factor sigma 32 que tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 17, o mediante inserción adicional en un cromosoma de la secuencia de nucleótidos.
- 25 7. El microorganismo recombinante del género *Escherichia* que tiene productividad de L-treonina de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la secuencia de nucleótidos se representa por SEQ ID NO: 15.
8. El microorganismo recombinante del género *Escherichia* que tiene productividad de L-treonina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el microorganismo del género *Escherichia* es *Escherichia coli*.
- 30 9. Un método para la producción de L-treonina, que comprende las etapas de:
- cultivar un microorganismo recombinante del género *Escherichia* que tenga productividad de L-treonina de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8; y
recuperar del cultivo la L-treonina.