

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 752 181**

51 Int. Cl.:

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2016 PCT/KR2016/004894**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16182322**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2016 E 16792968 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3336191**

54 Título: **Microorganismo Escherichia sp que tiene productividad de l-triptofano y procedimiento para preparar l-triptofano mediante el uso del mismo**

30 Prioridad:

14.05.2015 KR 20150067659

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

03.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PARK, HYE MIN;
LEE, BAEK SEOK;
LEE, SEOK MYUNG;
KIM, KYUNGRIM;
LEE, KWANG HO;
CHEONG, KI YONG;
LEE, KEUN CHEOL y
HONG, HYEONGPYO**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 752 181 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 *Escherichia* sp que tiene productividad de l-triptofano y procedimiento para preparar l-triptofano mediante el uso del mismo

[Campo técnico]

- 5 La presente divulgación se refiere a un microorganismo del género *Escherichia* productor de L-triptofano, en que la actividad de la fosfatasa se modifica para ser inactivada, y a un procedimiento para producir L-triptofano usando el microorganismo.

[Técnica antecedente]

- 10 El L-triptofano, que es un aminoácido esencial, se ha utilizado ampliamente como materia prima para productos farmacéuticos, tales como aditivos para alimentos para animales, soluciones de infusión, etc., y también se ha utilizado ampliamente como ingrediente de alimentos saludables, etc. El L-triptofano se puede producir mediante un procedimiento de síntesis química, un procedimiento de reacción enzimática, un procedimiento de fermentación, etc., pero el procedimiento de fermentación directa que utiliza un microorganismo se usa principalmente en la actualidad.

- 15 Un microorganismo tiene una vía de biosíntesis aromática, en la que el piruvato de fosfoenol (PEP), que es un intermediario en la glucólisis, y eritrosa-4-fosfato (E4P), que es un producto de la vía de fosfato de pentosa, inicia la polimerización por 3-desoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato (DAHP) sintasa (EC 2,5,1,54). En la vía anterior, PEP y E4P están conjugados con fosfato, y son sustancias que contienen alta energía. Además, en la vía de biosíntesis aromática posterior, la PEP está involucrada en la reacción cuando se lleva a cabo la reacción 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato (EPSP) sintasa (EC 2.5.1.19), y PRPP se utiliza en la reacción de antranilato fosforribosiltransferasa. En consecuencia, se sabe que se requiere una gran cantidad de sustancias de alta energía para la biosíntesis de triptófano. De acuerdo con estudios previos, se demostró mediante análisis cuantitativo intracelular que se requiere el mayor nivel de energía para la biosíntesis de triptofano entre 20 aminoácidos (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2002) V99, pp3695-3700). Por lo tanto, se puede considerar que PEP y E4P desempeñan un papel importante en las cepas que producen triptofano a alta concentración en términos de suministro continuo de
25 precursores y uso eficiente de energía.

- En consecuencia, para suministrar E4P de manera estable, se ha utilizado más el procedimiento para aumentar la biosíntesis mediante la mejora de la expresión de los genes *tktA* (ID del gen NCBI: 12931960), que codifican la transcetolasa (EC 2.2.1.1), (Current Opinion in Biotechnology, (2009) V20, pp651-658). Además, numerosos estudios para reducir el uso de ATP, que es una sustancia de alta energía, están en marcha para mantener el nivel de energía intracelular (FEMS Microbiol Lett, (2009) V297, pp217-224). Gu et al (Microbial Cell Factories (2012) vol. 11, no. 30, pp 1-9) divulga la generación de una cepa de *E. coli* con una producción mejorada de triptofano. Shen et al (Journal of Biomedicine and Biotechnology (2012) vol,2012, p. 605219, doi: 10.1155/2012/605219) enseña la producción mejorada de triptofano en *E. coli* por medio de la sobreexpresión de las dos enzimas biosintéticas *TktA* y *PpsA*. Sin embargo, todavía es necesario desarrollar un procedimiento para producir L-triptofano con alta eficiencia.

[Divulgación][Problema técnico]

- Los presentes inventores han realizado intensos esfuerzos de investigación para desarrollar un procedimiento para producir eficientemente L triptofano. Como resultado, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento para conservar la energía que se desperdicia innecesariamente mientras se mantiene la concentración de E4P en las células al evitar la descomposición de E4P sintetizado en cepas productoras de triptofano, y confirmaron que se mejoró la productividad del L-triptofano, de este modo se completa la presente invención.

[Solución técnica]

- Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un microorganismo del género *Escherichia* productor de L-triptofano.

- 45 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento para producir L-triptofano usando el microorganismo productor de L-triptofano.

[Efectos ventajosos]

- La presente divulgación proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano, en el que la actividad de fosfatasa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se modifica para inactivarse, de este modo muestra un efecto de que L-triptofano se puede producir de manera eficiente y económica con un alto rendimiento utilizando el microorganismo anterior. El L-triptofano producido a partir de los mismos se puede aplicar no solo a alimentos para animales o aditivos para alimentos para animales, sino también a diversos productos, como alimentos para humanos o aditivos alimentarios, fármacos, etc.

[Mejor modo]

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano.

5 Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento para producir L-triptofano usando el microorganismo productor de L-triptofano.

[Solución al problema]

10 Para lograr el objeto anterior, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano, en el que la actividad de fosfatasa que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se modifica para inactivarse. Por ejemplo, el microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano puede ser un microorganismo en el que la productividad de L-triptofano aumenta, en comparación con un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano en el que la actividad endógena de fosfatasa no se modifica a estar inactivado

15 Como se usa en el presente documento, el término "L-triptofano" se refiere a un L-aminoácido aromático, que es un α -aminoácido y un aminoácido esencial no sintetizado in vivo que tiene una fórmula química de $C_{11}H_{12}N_2O_2$. Para aumentar la productividad de L-triptofano en un microorganismo, un procedimiento de suministro continuo de un precursor, es decir, eritrosa-4-fosfato (E4P), en cepas productoras de triptofano; aumentar la expresión de los genes *tktA* para utilizar eficientemente la energía; aumentar la biosíntesis al bloquear las vías de ramificación en la vía de biosíntesis o usando menos ATP, etc., se ha usado convencionalmente.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "fosfatasa" se puede referir a una proteína que cataliza una reacción para eliminar un grupo fosfato de un sustrato. La fosfatasa de la presente invención, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, es una proteína codificada por el gen, *yidA*. Además, dicha fosfatasa se designa como fosfoazúcar fosfatasa (ID gen NCBI: 12933583) en la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y también se designa como fosfatasa de azúcar en la base de datos EcoCyc (<http://www.ecocyc.org>). La proteína cataliza la descomposición de sustratos de fosfoazúcar en azúcares y ácidos fosfóricos. Sin embargo, no se ha aclarado la relevancia entre la enzima descrita de este modo y la mejora de la producción de triptofano.

25 La enzima descrita anteriormente puede incluir, sin limitación, además de la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1, cualquier secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 70% o más, específicamente 80% o más, más específicamente 90% o más, incluso más específicamente 95% o más, aún más específicamente 98% o más, y aún todavía más específicamente 99% o más, con la secuencia de aminoácidos anterior, siempre que una enzima exhiba un efecto sustancialmente igual o correspondiente a la enzima anterior. Además, es obvio que una variante enzimática que tiene una secuencia de aminoácidos con una supresión, modificación, sustitución o adición parcial también pertenece al alcance de la presente divulgación, siempre que una secuencia de aminoácidos tenga la homología descrita anteriormente y exhiba el efecto correspondiente a cada enzima.

30 Los genes que codifican la fosfatasa que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se pueden incluir sin limitación, siempre que tengan una secuencia capaz de codificar la enzima anterior y se puedan representar como genes *yidA*. Específicamente, los genes que codifican la enzima también pueden incluir, sin limitación, además de la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2, cualquier secuencia de genes que codifica la enzima, que tiene una homología de 80% o más, específicamente de 90% o más, más específicamente 95% o más, incluso más específicamente 98% o más, y aún más específicamente 99% o más, a la secuencia de nucleótidos anterior, siempre que la secuencia del gen codifique una enzima que exhiba un efecto sustancialmente igual o correspondiente a la enzima anterior. Además, es obvio que cualquier secuencia de nucleótidos que tiene la homología descrita anteriormente puede pertenecer al alcance de la presente divulgación, aunque la secuencia de nucleótidos puede tener una supresión, modificación, sustitución o adición parcial en la misma.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "homología" se refiere a un porcentaje de identidad entre dos restos polinucleotídicos o polipeptídicos. La correspondencia de secuencia de un resto a otro se puede determinar mediante una técnica conocida en la materia. Por ejemplo, la homología se puede determinar mediante la alineación directa de la información de la secuencia (por ejemplo, parámetros tales como puntuación, identidad y similitud) en dos moléculas de polinucleótidos o dos moléculas de polipéptidos usando un programa de computadora (por ejemplo, BLAST 2.0) que está fácilmente disponible y es capaz de alinear la información de secuencia. Además, la homología entre polinucleótidos se puede determinar mediante la hibridación de los polinucleótidos bajo la condición de formar una cadena doble estable en las regiones homólogas y posteriormente digerir la cadena hibridada por una nucleasa específica de cadena simple para determinar el tamaño de los fragmentos digeridos.

40 Como se usa en la presente memoria, el término "actividad endógena" se refiere a un estado activo de una enzima en un microorganismo en un estado natural o antes de la modificación.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "modificado para ser inactivado" se refiere a un caso cuando el gen que codifica una enzima no se expresa en absoluto y/o un caso cuando el gen se expresa pero no muestra actividad

o una disminución en actividad en comparación con la de la cepa nativa o la cepa antes de la modificación.

La inactivación de la actividad de una enzima en comparación con su actividad endógena se refiere a un caso en el que no hay actividad o una disminución de la actividad de una enzima en un microorganismo en comparación con la que originalmente poseía en su estado natural o antes de la modificación. La disminución de la actividad se refiere a un concepto que incluye un caso en el que la actividad de una enzima en sí es menor que la de una enzima originalmente poseída en un microorganismo debido a la modificación del gen que codifica la enzima, un caso en el que el nivel de actividad enzimática total en las células es más baja que la de la cepa nativa o la de la cepa antes de la modificación debido a la inhibición de la expresión o la inhibición de la traducción del gen que codifica la misma, o un caso combinado de la misma.

El procedimiento para modificar tal actividad enzimática para la inactivación se puede lograr mediante varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de los procedimientos pueden incluir un procedimiento para sustituir el gen que codifica la enzima en el cromosoma con un gen mutado de modo que se pueda reducir actividad de la enzima, que incluye el caso en que se elimina la actividad de la enzima; un procedimiento para eliminar parte o la totalidad del gen que codifica la enzima; un procedimiento para sustituir la secuencia de control de expresión del gen que codifica la enzima con una secuencia que tiene actividad débil o nula; un procedimiento para introducir una modificación en la secuencia de control de expresión del gen en el cromosoma que codifica la enzima; un procedimiento para suprimir parte o la totalidad del gen en el cromosoma que codifica la enzima; un procedimiento para introducir un oligonucleótido antisentido (por ejemplo, ARN antisentido), que inhibe la traducción del ARNm a una enzima mediante una unión complementaria al transcripto del gen en el cromosoma; un procedimiento para hacer imposible la unión de un ribosoma al formar una estructura secundaria mediante la adición artificial de una secuencia Shine-Dalgarno (SD) y su secuencia complementaria en el extremo frontal de la secuencia SD del gen que codifica la enzima; un procedimiento de manipulación genética de transcripción inversa (RTE), que añade un promotor que se transcribe de manera inversa en el extremo terminal 3' del marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia correspondiente, etc., y también puede incluir una combinación de los mismos, pero no son particularmente limitado a los mismos.

Específicamente, el procedimiento para suprimir parte o la totalidad de un gen que codifica la enzima se puede realizar mediante la sustitución de un polinucleótido que codifica una proteína diana endógena dentro del cromosoma con un polinucleótido o un gen marcador que tiene una supresión parcial en la secuencia de ácido nucleico, usando un vector para inserción cromosómica en las bacterias. En un ejemplo de realización del procedimiento para suprimir parte o la totalidad de un gen, se puede usar un procedimiento para suprimir el gen mediante recombinación homóloga.

Como se usa en la presente memoria, el término "parte", aunque puede variar de acuerdo con los tipos de polinucleótidos, se puede referir específicamente a 1 nucleótido a 300 nucleótidos, más específicamente 1 nucleótido a 100 nucleótidos, y aún más específicamente 1 nucleótido a 50 nucleótidos, pero no está particularmente limitado a los mismos.

Como se usa en la presente memoria, el término "recombinación homóloga" se refiere a la recombinación genética que se produce a través de un cruzamiento en los locus de la cadena genética que tiene homología mutua.

Específicamente, el procedimiento de modificación de la secuencia de control de la expresión se puede llevar a cabo mediante la inducción de la modificación de la secuencia de control de la expresión mediante supresión, inserción, sustitución no conservadora o conservadora, o una combinación de los mismos en la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de control de expresión; o mediante la sustitución con un promotor más débil, etc. La secuencia de control de expresión puede incluir un promotor, una secuencia de operador, una secuencia que codifica una región de unión a ribosoma y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción.

Además, el procedimiento de modificación de la secuencia génica en el cromosoma se puede llevar a cabo mediante la inducción de una modificación en la secuencia mediante supresión, inserción, sustitución no conservadora o conservadora, o una combinación de las misma en la secuencia génica para debilitar aún más la actividad enzimática; o mediante la sustitución con una secuencia de gen que se mejoró para tener una actividad más débil o una secuencia de gen que se mejoró para no tener actividad.

De acuerdo con un ejemplo de realización de la presente divulgación, con el fin de inactivar la actividad endógena de fosfatasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, se encontró que la productividad de L-triptofano en varias *Escherichia coli* que producen L-triptofano, en que el gen, *yidA*, que codifica la fosfatasa se suprime, se incrementó en comparación con las cepas originales en las que no se suprime *yidA*. Por lo tanto, se confirmó que un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano, en el que la actividad endógena de la fosfatasa se modifica para inactivarse, pudo producir eficientemente L-triptofano.

En la presente invención, el microorganismo que produce L-triptofano se refiere a un microorganismo capaz de producir L-triptofano a partir de una fuente de carbono en los medios anteriores. Además, el microorganismo que produce L-triptofano puede ser un microorganismo recombinante. Específicamente, los tipos de microorganismos no están particularmente limitados siempre que un microorganismo pueda producir L-triptofano. Sin embargo, el

microorganismo puede ser un microorganismo que pertenece a los géneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Serratia*, *Providencia*, *Corynebacterium* y *Brevibacterium*, y específicamente un microorganismo que pertenece al género *Escherichia*.

5 Más específicamente, el microorganismo del género *Escherichia* puede ser específicamente *Escherichia coli*. Sin embargo, cualquier microorganismo perteneciente al género *Escherichia* que pueda aumentar la productividad de L-triptofano al inactivar la actividad fosfatasa se puede incluir sin limitación.

10 Específicamente, la cepa original del microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano por inactivación de la actividad fosfatasa puede no estar particularmente limitada siempre que el microorganismo tenga productividad de triptofano. Por ejemplo, el microorganismo que produce triptofano puede ser un microorganismo en el cual, para mejorar la vía de biosíntesis de triptofano, se debilitaron o inactivaron las actividades del gen en la vía competitiva, el regulador en la vía direccional del operón triptofano y el gen para introducir y descomponer triptofano fueron debilitado o inactivado, y/o se sobreexpresó la actividad del operón triptofano. El procedimiento para debilitar o inactivar la actividad es el mismo que se explicó anteriormente, y los procedimientos conocidos en la técnica se pueden incluir sin limitación. Además, los procedimientos para sobreexpresar la actividad del operón triptofano conocidos en la técnica se incluyen sin limitación. Por ejemplo, los procedimientos pueden incluir un procedimiento para insertar adicionalmente un polinucleótido, que incluye parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos del gen operón o una región de control de expresión introducida desde el exterior, en el cromosoma; un procedimiento para aumentar el número de copias mediante la introducción en un sistema de vector; un procedimiento para mejorar la actividad del operón mediante la sustitución de la secuencia de control de expresión que controla la expresión génica con otra secuencia de control de expresión, una modificación que tiene una mutación inducida en parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la región de control de expresión, y una introducción de una modificación del gen mismo, etc., pero no están limitados al mismo. Específicamente, el microorganismo puede ser *Escherichia coli*, en el que parte o la totalidad del gen *pheA*, el gen *trpR*, el gen *mtr* y/o el gen *tnaAB* están suprimidos y/o triptofano está sobreexpresado.

25 En la presente divulgación, además del gen *pheA*, gen *trpR*, gen *mtr*, gen *tnaAB* y operón triptofano, y las secuencias de proteínas codificadas por ellos, las secuencias de ADN y proteínas utilizadas en la presente divulgación se pueden obtener a partir de una base de datos conocida, por ejemplo, GenBank de NCBI, pero no se limitan a los mismos. Además, los detalles específicos con respecto al gen *pheA*, gen *trpR*, gen *mtr*, gen *tnaAB*, etc. se pueden encontrar en las divulgaciones de la Patente Coreana Núm. 10-0792095 y la Publicación de Patente Coreana Núm. 10-2013-0082121, y la totalidad de las memoria descriptivas de las mismas se pueden incluir como referencias de la presente divulgación.

30 A partir de ejemplos de realizaciones de la presente divulgación, se confirmó que, como resultado de la inactivación de la actividad de fosfatasa en varias cepas originales, cualquier microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano, independientemente de su cepa original había tenido significativamente mejora la productividad de L-triptofano cuando se inactiva la actividad de fosfatasa.

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir L-triptofano, que comprende el cultivo del microorganismo del género *Escherichia* de la presente divulgación que produce L-triptofano, en el que la actividad de fosfatasa que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se modifica para inactivarse, en un medio; y recuperar L-triptofano del medio cultivado o del microorganismo cultivado.

40 El medio y otras condiciones de cultivo usadas para cultivar el microorganismo de la presente divulgación no están particularmente limitados, pero se puede usar cualquier medio usado para el cultivo convencional del microorganismo del género *Escherichia*. Específicamente, el microorganismo de la presente divulgación se puede cultivar en un medio convencional que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, fuentes de fósforo, compuestos inorgánicos, aminoácidos y/o vitaminas apropiadas, etc., en condiciones aeróbicas mientras se ajusta la temperatura, el pH, etc.

45 Ejemplos de las fuentes de carbono que se utilizarán en la presente divulgación pueden incluir carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, sorbitol, etc.; alcoholes tales como alcoholes de azúcar, glicerol, piruvato, lactato, citrato, etc.; y aminoácidos tales como ácido orgánico, ácido glutámico, metionina, lisina, etc. Además, nutrientes orgánicos naturales tales como hidrolizado de almidón, melaza, melaza negra, salvado de arroz, almidón de yuca, melaza de caña de azúcar, licor macerado de maíz, etc., y específicamente, carbohidratos tales como glucosa y melaza pretratada estéril (es decir, melaza convertida en un azúcar reductor), etc. Además, se pueden usar sin limitación varias otras fuentes de carbono en una cantidad adecuada. Estas fuentes de carbono se pueden usar solas o en combinación de dos o más, pero sin limitación.

50 Ejemplos de las fuentes de nitrógeno que se usarán en la presente divulgación pueden incluir compuestos inorgánicos tales como amoníaco, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, nitrato de amonio, etc; aminoácidos tales como ácido glutámico, metionina, glutamina, etc.; y fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta, licor macerado de maíz, hidrolizado de caseína, pescado o productos de descomposición de los mismos, torta de soja desgrasada o productos de descomposición de los mismos, etc. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar

solo o en una combinación de dos o más, pero sin limitación.

5 Ejemplos de las fuentes de fósforo que se utilizarán en la presente solicitud pueden incluir fosfato de potasio monobásico, fosfato de dipotasio dibásico, sales que contienen sodio correspondientes, etc., pero no se limitan a los mismos. Los ejemplos de compuestos inorgánicos pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de hierro, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, carbonato de calcio, etc., y adicionalmente, se pueden incluir aminoácidos, vitaminas y/o precursores adecuados para un medio de cultivo. Estos medios o precursores se pueden añadir a un cultivo mediante un cultivo por lote o un cultivo continuo.

10 En la presente divulgación, el pH de un cultivo se puede ajustar durante el cultivo mediante la adición de un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico al cultivo de una manera apropiada. Además, durante el cultivo, se puede usar un agente antiespumante tal como un poliglicol éster de ácido graso para inhibir la formación de espuma. Además, se puede inyectar oxígeno o un gas que contiene oxígeno en el cultivo para mantener un estado aeróbico del cultivo; o se puede inyectar gas nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono sin la inyección de un gas para mantener un estado anaeróbico o microaeróbico del cultivo.

15 La temperatura de cultivo generalmente puede estar en un intervalo de 27 °C a 40 °C, y específicamente, de 30 °C a 37 °C, pero sin limitación. El cultivo puede continuar hasta que obtiene la cantidad deseada de materiales útiles, y específicamente durante 10 horas a 100 horas, pero el tiempo de cultivo no está limitado a ello.

El L-triptofano se puede recuperar mediante un procedimiento adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, cultivo por lote, cultivo continuo o cultivo alimentado por lote, etc., de acuerdo con el procedimiento de cultivo de la presente divulgación.

20 La recuperación también puede incluir una etapa de purificación. La etapa de purificación puede purificar L-triptofano recuperado usando un procedimiento adecuado conocido en la técnica.

[Modo de invención]

25 A continuación, la presente divulgación se describirá en detalle con los ejemplos de realizaciones acompañantes. Sin embargo, los ejemplos de realizaciones descrita en la presente son solo para fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la presente divulgación.

Ejemplo 1: Preparación de cepa de tipo salvaje deficiente en *yidA*

En el ejemplo, se intentó la preparación de una cepa en la que la actividad de fosfatasa se inactiva a partir de una cepa que produce L-triptofano.

30 Para mejorar la productividad de triptofano en la cepa *W3110*, una cepa de *Escherichia coli* de tipo salvaje, es decir, un microorganismo representativo del género *Escherichia*, el gen *yidA* que codifica la fosfatasa se suprimió mediante recombinación homóloga de la cepa *W3110 trpΔ2* (Publicación de patente coreana Núm. 10-2013-0082121), en la que se mejoró la productividad triptofano y en el que se suprimieron el gen *tnaAB* en la forma de un operón del gen *pheA* (ID del gen NCBI: 12934467) que codifica corismato mutasa/prefenato deshidratasa (CM-PDT), el gen *tnaA* (ID del gen NCBI: 12933600) que codifica triptofanasa, y el gen *tnaB* (ID del gen NCBI: 12933602) que codifica un importador de triptofano.

35 Específicamente, para la supresión del gen, *yidA*, que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, se empleó el procedimiento de inactivación en una etapa usando lambda Red recombinasa desarrollada por Datsenko KA et al (Proc Natl Acad Sci USA, (2000) 97: 6640-6645). Como marcador para confirmar la inserción del gen, se ligó un promotor *rmf* a pUC19 (New England Biolabs (USA)), y se utilizó el gen de cloranfenicol de *pUCprmfmlxP* que se obtuvo mediante la ligación del casete mutante, *loxP Cm^R-loxP*, que se obtuvo de *pACYC184* (Nuevo England Biolab), se utilizó (Publicación de Patente Coreana N° 10-2009-0075549)

40 Primero, la reacción en cadena de la polimerasa primaria (en adelante denominada PCR) se realizó usando *pUCprmfmlxP* como un molde y combinaciones de cebadores de las SEQ ID NO: 3 y 4 que tienen una parte del gen *yidA* y una secuencia de nucleótidos parcial del gen resistente a cloranfenicol del gen *pUCprmfmlxP* en condiciones de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, apareamiento a 55 °C durante 30 segundos y elongación a 72 °C durante 1 minuto, de este modo se obtiene *ΔyidA1st* (aproximadamente 1,2 kb), un producto de PCR. Posteriormente, *ΔyidA1st* (1,2 kb), el producto PCT, obtenido por PCR, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa 0,8%, se eluyó y posteriormente se usó como molde para PCR secundaria. La PCR secundaria se realizó usando el producto de PCR primario eluido como molde y las combinaciones de cebadores de

55 *W3110 trpΔ2* de *E. coli*, que se transformó con un vector *pKD46* de acuerdo con el procedimiento de inactivación de

una etapa desarrollado por Datsenko KA et al. (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) 97: 6640-6645), se preparó como una cepa competente, y la transformación se realizó mediante la introducción del fragmento de gen, *ΔyidA* (1,3 kb) obtenido por PCR primaria y secundaria. Las cepas se cultivaron en el medio LB que contiene cloranfenicol, y posteriormente se seleccionaron los transformantes primarios que tienen resistencia al cloranfenicol.

- 5 Después de la eliminación de *pKD46* de las cepas recombinantes primarias así obtenidas que tienen resistencia al cloranfenicol, se introdujo un vector *pJW168* (Gene, (2000) 247, 255-264) para eliminar el gen marcador de cloranfenicol de las cepas (Gene, (2000) 247, 255-264). La PCR se realizó usando cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 8 para obtener un producto de PCR (aproximadamente 0,5 kb), lo que indica que las cepas finalmente obtenidas tenían supresión del gen *yidA*. Las cepas que tienen supresión de dicho gen se designaron como *W3110 trpΔ2 yidA*.
- 10 Las secuencias de los cebadores usados en el Ejemplo se enumeran en la Tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
<i>yidA-Cm-F2</i>	aatctacctggggaactcATGgctattaaactcattgctatcgatattggaAggTgACACTAT AgAACgCg	3
<i>yidA-Cm-R2</i>	cgccccacagaTTAattcagcacatacttctcaatagcaaacgccacgccaTAgTggATCTgA TgggTACC	4
<i>yidA-F1</i>	ggtgtgtactgattttgagcggaaatcgcgtagcatgggtcaggaaccaatctacctggggaactcAT	5
<i>yidA-F1</i>	gcagtaaaccaataatcagtaagcgggcaaacgcggttatgctgtttgcccgccccacagaTTAattcagc	6
<i>yidA conF1</i>	ATTGATGCGCTCTCACCGCA	7
<i>yidA conR1</i>	GCCTCTGGGTGAATAGTATT	8

Ejemplo 2: Preparación de la cepa productora de triptofano en la que está inactivada la fosfatasa

- 15 En el Ejemplo, se usó *KCCM11166P* (Patente coreana Núm. 10-1261147), que es otra cepa de *Escherichia coli* que produce triptofano, como la cepa original, y el gen *yidA* que codifica la fosfatasa se suprimió mediante recombinación homóloga de la misma manera que se describió en el Ejemplo 1.

Se confirmó que las cepas finalmente obtenidas tenían una supresión del gen *yidA* debido al producto de PCR (aproximadamente 0,5 kb) que se obtuvo por PCR usando los cebadores de las SEQ ID NOS: 7 y 8, y posteriormente las cepas se denominaron como *CA04-2805*.

- 20 **Ejemplo 3: Evaluación de la productividad de triptofano en cepas tipo salvaje deficientes en *yidA***

- 25 A fin de comparar la productividad del triptofano de *W3110 trpΔ2 yidA*, preparada en el Ejemplo 1, y *W3110 trpΔ2*, que es la cepa original, *pCL-Dtrp_att-trpEDCBA* y *pBAC-Dtrp_att-trpDCBA* se introdujeron en cada cepa mediante el procedimiento de transformación. Los vectores introducidos eran vectores en que la expresión del operón de triptofano estaba aumentada de modo que el triptofano se puede producir en exceso debido a que se liberó el mecanismo de control en la región de control del operón de triptofano operón (Publicación de la patente coreana Núm. 10-2013-0082121). Las cepas con el vector introducido se cultivaron en medio de prueba de triptofano de acuerdo con la composición listada en la siguiente Tabla 2, y se comparó su productividad de L-triptofano.

[Tabla 2]

Composición del medio de prueba de triptofano	
Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	12 g

NaCl	1 g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	5 g
MgSO ₄ ·H ₂ O	1 g

Composición del medio de prueba de triptofano	
Composición	Concentración (por litro)
MnSO ₄ ·H ₂ O	15 mg
CUSO ₄ ·H ₂ O	3 mg
ZnSO ₄ ·H ₂ O	30 mg
Citrato de sodio	1 g
Extracto de levadura	1 g
Fenilalanina	0,15 g
pH	6,8

5 Un asa de platino de cada una de las cepas cultivadas durante la noche en el medio sólido LB en un incubador a 37 °C se inoculó en el medio de prueba (25 ml) de la Tabla 2. Posteriormente, los resultantes se cultivaron en un incubador a 37 °C y 200 rpm durante 48 horas para comparar la concentración de triptofano (Tabla 3).

[Tabla 3]

Cepa	Concentración de triptofano (g/L)
<i>W3110 trpΔ2/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA, pBAC-Dtrp_att-trpDCBA</i>	0,5
<i>W3110 trpd 2 yidA/pCL-Dtrp_att-trpEDCBA, pBAC-Dtrp_att-trpDCBA</i>	0,7

10 Los resultados anteriores mostraron que la productividad de triptofano en la cepa, en que la actividad de la fosfatasa codificada por el gen *yidA* estaba inactivada, se incrementó en 40% en comparación con la actividad de la fosfatasa que no estaba inactivada. Por lo tanto, se confirmó que la productividad de triptofano no se pudo mejorar por la inactivación de la fosfatasa codificada por *yidA*. A partir de tales resultados, se puede interpretar que se inhibió la degradación de E4P, un importante precursor para la biosíntesis del triptofano, y de este modo se mantuvo la concentración de E4P en las células. Como resultado, se conserva la energía que se desperdicia innecesariamente y se usa en la biosíntesis de triptofano.

15 **Ejemplo 4: Evaluación de la productividad de triptofano en cepas deficientes en *yidA***

A fin de medir el título de triptofano de la cepa deficiente en *yidA* (*CA04-2805*) preparada en el Ejemplo 2 y la cepa original (*KCCM11166P*), las cepas se cultivaron en el medio de titulación de triptofano preparado de acuerdo con las composiciones listadas en la Tabla 4, y posteriormente se confirmó la mejora de la eficiencia de la producción de L-triptofano.

20

[Tabla 4]

Composición del medio de prueba de triptofano	
Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	60 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g

NaCl	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 g
Citrato de sodio	5 g
Extracto de levadura	2 g

(continuación)

Composición del medio de prueba de triptofano	
Composición	Concentración (por litro)
Carbonato de calcio	40 g
Fenilalanina	0,15 g
Tirosina	0,1 g
pH	6,8

5 Un asa de platino de cada una de *KCCM11166P E. coli* y *CA04-2805 E. coli* cultivadas durante la noche en el medio LB sólido en un incubador a 37 °C se inoculó en el medio de titulación (25 ml) de la Tabla 4. Posteriormente, los resultantes se cultivaron en un incubador a 37 °C y 200 rpm durante 48 horas para comparar la tasa de consumo de glucosa y la concentración de triptofano.

10 Como resultado, como se describe en la siguiente Tabla 5, se confirmó que la concentración de triptofano de *CA04-2805*, la cepa en la que la actividad de fosfatasa codificada por el gen *yidA* estaba inactivada, se incrementó en aproximadamente 10% en comparación con la de *KCCM11166P*, la cepa original que era un control.

[Tabla 5]

Cepa	Concentración de triptofano (g/L)
<i>KCCM11166P</i>	7,48
<i>CA04-2805</i>	8,23

15 Los presentes inventores han confirmado que la cepa a base de *KCCM11166P*, que es una cepa deficiente en *yidA* en la que la actividad de fosfatasa estaba inactivada, tiene una mayor capacidad de producir triptofano, y la cepa se denomina como "*CA04-2805*" o "*CA04-2805 (KCCM11166P_ΔyidA)*" y depositada en KCCM el 5 diciembre de 2014, donde se asignó el número de depósito KCCM11636P.

Los resultados anteriores sugieren que en el microorganismo de la presente divulgación del género *Escherichia* productor de triptofano, la cepa que inactiva la actividad de fosfatasa puede mejorar la capacidad productora de L-triptofano en comparación con la modificada que se inactiva.

20 Si bien la presente divulgación se ha descrito con referencia a las realizaciones ilustrativas particulares, los expertos en la técnica a la que pertenece la presente divulgación entenderán que la presente invención se puede realizar en otras formas específicas. En consecuencia, las realizaciones descritas anteriormente se consideran ilustrativas en todos los aspectos y no restrictivas. Además, el alcance de la presente divulgación se define mediante las reivindicaciones adjuntas en vez de en la descripción detallada, y se debe entender que todas las modificaciones o variaciones derivadas de los significados y el alcance de la presente divulgación y sus equivalentes se incluyen en el
25 alcance de las reivindicaciones anexas.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> MICROORGANISMO *ESCHERICHIA* SP QUE TIENE PRODUCTIVIDAD DE L-TRIPTOFANO Y PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR L-TRIPTOFANO MEDIANTE EL USO DEI MISMO

5 <130> OPA16040-PCT

<150> KR 10-2015-0067659

<151> 2015-05-14

10 <160> 8

<170> KopatentIn 2,0

<210> 1

15 <211> 270

<212> PRT

<213> *Escherichia*

<400> 1

20

ES 2 752 181 T3

Met Ala Ile Lys Leu Ile Ala Ile Asp Met Asp Gly Thr Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Asp His Thr Ile Ser Pro Ala Val Lys Asn Ala Ile Ala Ala Ala
 20 25 30
 Arg Ala Arg Gly Val Asn Val Val Leu Thr Thr Gly Arg Pro Tyr Ala
 35 40 45
 Gly Val His Asn Tyr Leu Lys Glu Leu His Met Glu Gln Pro Gly Asp
 50 55 60
 Tyr Cys Ile Thr Tyr Asn Gly Ala Leu Val Gln Lys Ala Ala Asp Gly
 65 70 75 80
 Ser Thr Val Ala Gln Thr Ala Leu Ser Tyr Asp Asp Tyr Arg Phe Leu
 85 90 95
 Glu Lys Leu Ser Arg Glu Val Gly Ser His Phe His Ala Leu Asp Arg
 100 105 110
 Thr Thr Leu Tyr Thr Ala Asn Arg Asp Ile Ser Tyr Tyr Thr Val His
 115 120 125
 Glu Ser Phe Val Ala Thr Ile Pro Leu Val Phe Cys Glu Ala Glu Lys
 130 135 140
 Met Asp Pro Asn Thr Gln Phe Leu Lys Val Met Met Ile Asp Glu Pro
 145 150 155 160
 Ala Ile Leu Asp Gln Ala Ile Ala Arg Ile Pro Gln Glu Val Lys Glu
 165 170 175
 Lys Tyr Thr Val Leu Lys Ser Ala Pro Tyr Phe Leu Glu Ile Leu Asp
 180 185 190
 Lys Arg Val Asn Lys Gly Thr Gly Val Lys Ser Leu Ala Asp Val Leu
 195 200 205
 Gly Ile Lys Pro Glu Glu Ile Met Ala Ile Gly Asp Gln Glu Asn Asp
 210 215 220
 Ile Ala Met Ile Glu Tyr Ala Gly Val Gly Val Ala Met Asp Asn Ala
 225 230 235 240
 Ile Pro Ser Val Lys Glu Val Ala Asn Phe Val Thr Lys Ser Asn Leu
 245 250 255
 Glu Asp Gly Val Ala Phe Ala Ile Glu Lys Tyr Val Leu Asn
 260 265 270

<210> 2
 <211> 813
 <212> ADN
 <213> *Escherichia*

5

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(813)
 <223> *yidA*

10

ES 2 752 181 T3

<400> 2

```

atggctatta aactcattgc tatcgatatg gatggcacc cttctgctgcc cgatcacacc      60
atctcaccgc cggtaaaaa tgcgattgcc gcagctcgcg cccgtggcgt gaatgtcgtg      120
ctaacgacgg gtcgcccgtg tgcaggtgtg cacaactacc tgaagagct gcatatggaa      180
cagccggggc actactgcat tacttataac ggcgcgctgg tacagaaggc cgctgatggt      240
agcaccgtgg cgcaactgc tctcagctat gacgactatc gtttctgga aaaactctct      300
cgcgaagtgc gttctcattt ccacgccctg gaccgcacca cgctgtacac cgccaaccgt      360
gatatcagct actacacggg gcatgaatcc ttogttgcca ccattccgct ggtggttctgc      420
gaagcggaga aaatggacc ccaatcccag ttctgaaag tgatgatgat tgatgaacc      480
gccatcctcg accaggctat cgcgcgtatt ccgcaggaag tgaagagaa atataccgtg      540
ctgaaaagtg cgcctactt cctcgaaatc ctcgataaac gcgttaaca aggtacgggg      600
gtgaaatcac tggccgacgt gttaggtatt aaaccggaag aaatcatggc gattggcgt      660
cagaaaaacg atatcgcaat gattgaatat gcaggcgtcg gtgtggcgtg ggataacgct      720
atccttcag tgaagaagt ggcgaacttt gtcaccaaat ctaacctga agatggcgtg      780
gcgtttgcta ttgagaagta tgtgctgaat taa                                     813

```

<210> 3

<211> 70

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador YIDA-CM-F2 Primer

10 <400> 3

```

aatctacctg gggaaactcat ggctattaaa ctcatgcta tcgatatgga aggtgacact      60

```

```

atagaacgcg                                     70

```

<210> 4

15 <211> 70

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> yidA-Cm-R2 Primer

<400> 4

ES 2 752 181 T3

	cgccacaga ttaattcagc acatacttct caatagcaaa cgccacgcca tagtggatct	60
	gatgggtacc	70
5	<210> 5 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador yidA-F1 <400> 5	
	ggtggtgtac tgatTTTTga gcggaatcgc gttagcatgg gtcaggaacc aatctacctg	60
	gggaactcat	70
15	<210> 6 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador yidA-R1 <400> 6	
	gcagtaaacc aataatcagt aagcgggcaa acgcgtttat gctgTTTgcc cgccacaga	60
25	ttaattcagc	70
30	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador yidA conF1 <400> 7 attgatgcgc tctaccgca 20	
40	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador yidA conR1 <400> 8 gcctctgggt gaatagtatt 20	

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptofano, en el que la actividad de fosfatasa que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se modifica para inactivarse.
- 5 2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación de 1, en el que el microorganismo del género *Escherichia* es *Escherichia coli*.
3. Un procedimiento de producción de L-triptofano, que comprende:
 - (i) cultivar el microorganismo del género *Escherichia* de la reivindicación 1 o 2 en un medio; y
 - (ii) recuperar el L-triptofano del medio cultivado o el microorganismo cultivado.