



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 305 015**

⑯ Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **01114588 .5**

⑯ Fecha de presentación : **18.06.2001**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1170358**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2002**

⑯ Título: ***Escherichia coli* productora de L-arginina y procedimiento para producir L-arginina.**

⑯ Prioridad: **06.07.2000 RU 2000117677**

⑯ Titular/es: **Ajinomoto Co., Inc.**
15-1, Kyobashi, 1-chome
Chuo-ku, Tokyo, JP

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

⑯ Inventor/es: **Gusyatiner, Mikhail Markovich;**
Leonova, Tatyana Viktorovna;
Ptitsyn, Leonid Romanovich y
Yampolskaya, Tatyana Abramovna

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

⑯ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 305 015 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Escherichia coli productora de L-arginina y procedimiento para producir L-arginina.

5 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

La presente invención se refiere a *Escherichia coli* productora de L-arginina y a un procedimiento para producir L-arginina por fermentación utilizando *Escherichia coli*. La L-arginina es un aminoácido industrialmente útil como ingrediente en agentes promotores de la función hepática, transfusiones de aminoácidos, preparaciones completas de aminoácidos y similares.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Se conoce el hecho de que algunos mutantes de la *Escherichia coli* resistentes a análogos de arginina y pirimidinas producen arginina (Pierard A. y Glansdorf N., *Mol. Gen. Genet.*, 118, 235, 1972 y Glansdorf N., *Biosynthesis of arginine and polyamines. En E. coli and Salm. thyphimurium*, 1996). Adicionalmente, se conocen procedimientos para producir arginina utilizando mutantes de *E. coli* resistentes a otras sustancias químicas, o una cepa recombinante de *E. coli* en la que se introduce un gen que codifica una enzima de la ruta biosintética de la arginina.

20 En la ruta biosintética de la arginina de la *E. coli* K12, un mol de Acetil-CoA es consumido y un mol de ácido acético es liberado, produciéndose una molécula de arginina (figura 1). Como resultado de la producción secundaria de acetato, una parte significativa de la fuente de carbono se pierde; además, la acumulación de acetato empeora el crecimiento del cultivo de los productores de arginina.

25 Asimismo, se conoce el hecho de que la *E. coli* no puede utilizar eficazmente el acetato como fuente de carbono.

30 **Sumario de la invención**

35 Desde el punto de vista anterior, los presentes inventores pensaron que la producción de arginina sería más elevada si las cepas productoras de arginina tenían capacidad para reutilizar el ácido acético. En consecuencia, un objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer una cepa de *E. coli* productora de arginina que utiliza ácido acético y un procedimiento para producir arginina utilizando dicha cepa.

40 A continuación, los inventores construyeron mutantes de *E. coli* productora de arginina que pueden utilizar ácido acético y consiguieron mejorar la productividad de arginina del productor de arginina de *E. coli*. De este modo, se ha alcanzado la presente invención.

45 Es decir, la presente invención da a conocer una *Escherichia coli* que tiene capacidad para producir arginina y capacidad para utilizar acetato.

50 Además, la presente invención da a conocer un procedimiento para producir arginina que comprende las etapas de cultivar una cepa de *E. coli* que tiene capacidad para utilizar acetato y capacidad para producir arginina en un medio de cultivo, a efectos de producir y acumular arginina en dicho medio y recolectar arginina en dicho medio.

En la presente invención, el aminoácido presenta la configuración L.

55 A continuación, se describe en detalle la presente invención.

La *E. coli* según la presente invención tiene capacidad para utilizar acetato y capacidad para producir arginina. La cepa de *E. coli* que tiene capacidad para utilizar acetato y capacidad para producir arginina puede ser obtenida introduciendo la capacidad para utilizar acetato a una cepa de *E. coli* que tiene capacidad para producir arginina, o introduciendo la capacidad para producir arginina a una cepa de *E. coli* que tiene la capacidad para utilizar acetato.

60 En la presente invención, la expresión "capacidad para producir arginina" se refiere a la capacidad de la cepa de *E. coli* utilizada en la presente invención para producir y acumular arginina en un medio cuando dicha cepa de *E. coli* se cultiva en dicho medio. El término "capacidad para utilizar acetato" se refiere a la capacidad para metabolizar ácido acético o acetato más eficazmente que la cepa original, por ejemplo, la capacidad de la cepa de *E. coli* utilizada en la presente invención para crecer más rápidamente que la cepa original cuando dicha cepa de *E. coli* se cultiva en un medio que contiene ácido acético o acetato como única fuente de carbono. Más concretamente, puede decirse que la cepa de *E. coli* tiene capacidad para utilizar acetato si dicha cepa crece más rápidamente que la cepa original cuando las cepas se cultivan en un medio que contiene ácido acético o acetato como única fuente de carbono, por ejemplo, el medio líquido mínimo A (descrito a continuación), que contiene 5 g/l de acetato de amonio en condiciones apropiadas. Más concretamente, puede decirse que la cepa de *E. coli* tiene capacidad para utilizar acetato si la cepa forma una colonia dentro de un periodo de 2 días a 37°C, cuando la cepa se cultiva en un medio de agar que contiene ácido acético o acetato como única fuente de carbono, por ejemplo, el medio mínimo A (descrito continuación), que contiene 5 g/l de acetato de amonio y en condiciones apropiadas. El término "condiciones apropiadas" se refiere a

ES 2 305 015 T3

temperatura, pH, suministro de aire o presencia opcional de nutrientes esenciales o similares para la cepa de *E. coli* que se debe cultivar.

5 A título de ejemplo de procedimiento para obtener *E. coli* según la presente invención, a continuación se describe un procedimiento para inducir un mutante que tiene capacidad para utilizar acetato a partir de una cepa de *E. coli* que tiene capacidad para producir arginina.

10 La *E. coli* que tiene capacidad para producir arginina no está específicamente limitada, siempre y cuando se le pueda inducir la capacidad para utilizar acetato. Dichas cepas de *E. coli* incluyen cepas productoras de arginina cultivadas a partir de *E. coli* K-12, B, C, o sus derivados.

15 Como ejemplos de la *E. coli* productora de arginina, pueden mencionarse los siguientes: un mutante que presenta resistencia a α -metilmetionina, p-fluorofenilalanina, D-arginina, hidroxamato de arginina, s-(2-aminoetil)-cisteína, α -metilserina, β -2-tienilalanina o sulfaguanidina (publicación japonesa abierta a inspección pública nº 56-106598), una cepa productora de arginina en la que se introduce el gen *argA* que codifica la N-acetilglutamato sintetasa (publicación japonesa abierta a inspección pública nº 57-5693), y similares. Además, la cepa de *E. coli* 237 que se describe en los ejemplos expuestos posteriormente es la cepa productora de arginina preferente. La cepa 237 se ha depositado en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) bajo el número de acceso VKPM B-7925 desde el 10 de abril de 2000, y se ha transferido del depósito original al depósito internacional basado en el Tratado de 20 Budapest, el 18 de mayo de 2001.

25 Se puede obtener una cepa mutante que tiene capacidad para utilizar acetato a partir de una cepa productora de arginina tal como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, mutagenizando la cepa productora de arginina y seleccionando las cepas que se pueden cultivar en un medio mínimo que contiene ácido acético o acetato como única fuente de carbono. La mutagénesis se puede llevar a cabo, por ejemplo, por irradiación UV o con un agente utilizado habitualmente para mutagénesis artificial, tal como 1-metil-3-nitrosoguanidina (NTG) y ácido nitroso. La mutagénesis y la selección de una cepa mutante con capacidad para utilizar el acetato se pueden repetir dos o más veces.

30 La arginina se puede producir eficazmente cultivando la cepa de *E. coli* descrita anteriormente, que tiene capacidad para utilizar acetato y para producir arginina, en un medio de cultivo, a efectos de producir y acumular arginina en dicho medio, y de recolectar la arginina en dicho medio.

35 La acetilación del glutamato a N-acetilglutamato y la desacetilación de la N-acetilornitina a ornitina en la biosíntesis de arginina de bacterias corineformes están catalizadas por la misma enzima, la ornitina acetiltransferasa. Por otro lado, la acetilación y desacetilación en la biosíntesis de arginina de *E. coli* están catalizadas por diferentes enzimas, la N-acetilglutamato sintasa y la N-acetilornitinasa, respectivamente. En consecuencia, en caso de que se utilice el ácido acético producido como subproducto, su efecto sobre la producción de arginina ha permanecido desconocido.

40 En el procedimiento para producir arginina según la presente invención, el cultivo de *E. coli*, y la recolección y purificación de la arginina a partir del medio líquido pueden ser llevados a cabo de un modo similar al procedimiento de fermentación convencional, en el que la arginina se produce utilizando *E. coli*.

45 Como fuente de carbono, es posible utilizar azúcares, tales como glucosa, lactosa, galactosa, fructosa o hidrolizados de almidón; alcoholes, tales como glicerol o sorbitol; o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico o ácido succínico.

50 Como fuente de nitrógeno, es posible utilizar sales de amonio inorgánicas, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio o fosfato de amonio; nitrógeno orgánico, tal como hidrolizado de soja; amoníaco gaseoso; o amoníaco acuoso.

55 Resulta deseable permitir que las sustancias requeridas, tales como vitamina B₁ y L-isoleucina o extracto de lechuga, estén contenidas en cantidades apropiadas como nutrientes orgánicos de traza. Además de los anteriores, se añaden en pequeñas cantidades, si es necesario, fosfato de potasio, sulfato de magnesio, ion hierro, ion manganeso y similares.

60 Preferentemente, el cultivo se lleva a cabo en condiciones aeróbicas durante 16-72 horas. La temperatura de cultivo se controla entre 25°C y 45°C, y el pH se controla a 5-8 durante el cultivo. Para el ajuste del pH se pueden utilizar sustancias inorgánicas u orgánicas, ácidas o alcalinas, así como amoníaco gaseoso o similares.

65 Generalmente, la recolección de arginina a partir del licor fermentado se lleva a cabo combinando un procedimiento por resina de intercambio iónico y otros procedimientos conocidos.

Mejor modo de poner en práctica la invención

65 A continuación, la presente invención se describe más específicamente haciendo referencia a los ejemplos siguientes.

ES 2 305 015 T3

Ejemplo 1

Inducción de mutantes que utilizan acetato

5 A partir de la cepa mutante de *E. coli* 237, productora de arginina, se indujeron mutantes que crecían bien en medio agar M9, que contenía acetato de amonio (5 mg/ml) como única fuente de carbono y nitrógeno. La cepa 237 es un mutante resistente a un análogo de la pirimidina, el 6-azauracilo, que se indujo a partir de *E. coli* K12 ilvA::Tn5 utilizando 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (NTG). La cepa 237 crece pobremente en agar M9 que contiene acetato de amonio como única fuente de carbono y nitrógeno. La cepa 237 se ha depositado en la Colección Nacional Rusa de
10 Microorganismos Industriales (VKPM) bajo el número de acceso VKPM B-7925 desde el 10 de abril de 2000, y se ha transferido del depósito original al depósito internacional basado en el Tratado de Budapest, el 18 de mayo de 2001.

15 Se cultivaron durante una noche células de la cepa 237 en caldo L con agitación (tubo de ensayo, 37°C) y se recolectaron mediante centrifugación. A continuación, las células se resuspendieron en solución salina (0,8%) que contenía 0,1 mg/ml de NTG. Tras 30 min de exposición a NTG a 37°C, las células se depositaron por centrifugación, se lavaron dos veces con solución salina y se dispusieron en placas en el medio de agar mínimo A, que contenía 5 g de acetato de amonio, 6 g de Na₂HPO₄, 3 g de KH₂PO₄, 0,5 g de NaCl, 0,1 mg de tiamina, 0,1 g de L-isoleucina y 15 g de agar por 1 litro de agua (pH 7,0).

20 25 Las placas se incubaron durante 5 días a 37°C. En 2 días aparecieron colonias sobre las placas, que se recolectaron y se purificaron por extensión en las mismas placas de agar. La cepa original 237 formó colonias únicamente tras un cultivo de 5 días. La frecuencia de mutante con utilización de acetato fue de 6×10^{-5} . Se analizó en setenta cepas purificadas la productividad de arginina. Aproximadamente 1/4 de los mutantes derivados fueron más productivos que la cepa original 237. El mejor productor de arginina entre ellos fue la cepa 382. La cepa 382 se ha depositado en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM) bajo el número de acceso VKPM B-7926 desde el 10 de abril de 2000, y se ha transferido del depósito original al depósito internacional basado en el Tratado de Budapest, el 18 de mayo de 2001.

Ejemplo 2

Crecimiento de los nuevos mutantes en acetato

30 35 Se colocaron en tubos de ensayo porciones de dos ml del medio líquido mínimo A (no se añadió agar), que contenía acetato de amonio (5 g/l) o glucosa (5 g/l) como únicas fuentes de carbono, se inocularon con un loop de la nueva cepa 382, otro ejemplo de mutante productor de arginina, la cepa 383 y su cepa original 237, y se incubaron durante 16 horas a 32°C con agitación. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica del cultivo a 540 nm. La densidad óptica del medio al inicio del cultivo fue de aproximadamente 0,05. Los resultados se muestran en la tabla 1.

TABLA 1

| Cepa | Crecimiento (OD ₅₄₀) en medio líquido mínimo durante 16 horas con: | |
|----------------|--|---------------------------|
| | Glucosa (0,5 %) | Acetato de amonio (0,5 %) |
| 237 (original) | 1,8 | 0,4 |
| 382 | 1,5 | 1,0 |
| 383 | 1,6 | 0,7 |

Ejemplo 3

Producción de arginina mediante los nuevos mutantes productores de L-arginina en fermentación en tubo de ensayo

40 45 50 55 Las nuevas cepas 382, 383 y su cepa original 237 se cultivaron en el medio de fermentación. El medio de fermentación contenía 60 g de glucosa, 25 g de sulfato de amonio, 2 g de KH₂PO₄, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 0,1 mg de tiamina, 5 g de extracto de levadura (Difco) y 25 g de carbonato de calcio por 1 litro de agua corriente (pH 7,2). La glucosa y la caliza se esterilizaron por separado. Se colocaron porciones de dos ml del medio en tubos de ensayo, se inocularon con un loop de los microorganismos analizados y el cultivo se llevó a cabo a 32°C durante 3 días con agitación. La cantidad acumulada de arginina en el medio de cultivo se muestra en la tabla 2.

ES 2 305 015 T3

TABLA 2

| Cepa | Arginina (g/l) |
|-----------------------------------|----------------|
| 237 (original) | 5,1 |
| 382 (mutante que utiliza acetato) | 12,0 |
| 383 (mutante que utiliza acetato) | 7,7 |

Ejemplo 4

15 *Producción de arginina mediante el nuevo mutante productor de L-arginina en fermentador de tanque agitado*

La nueva cepa 382 y su cepa original 237 se cultivaron con agitación a 32°C durante 8 horas en caldo L. A continuación, se inocularon 60 ml del cultivo de semillas en 1 litro de fermentador de tanque agitado que contenía 0,5 20 1 del medio de fermentación, siguiendo por el cultivo con agitación a 700 rpm a 32°C y una velocidad de aireación de 0,5 litros/min. El medio de fermentación contenía 100 g de glucosa, 9 g de sulfato de amonio, 1 g de KH_2PO_4 , 0,4 g 25 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de nitrógeno total de hidrolizado de soja, 0,3 g de L-isoleucina y 0,4 mg de tiamina en 1 litro de agua corriente (pH 7,0). Durante el cultivo, se añadió solución de amonio (4,7 M) a efectos de ajustar el pH a 7,0 y de suministrar una fuente de nitrógeno. El cultivo se llevó a cabo durante 42 horas. La cantidad acumulada de arginina en el medio de cultivo y el rendimiento de glucosa se muestran 25 en la tabla 3.

TABLA 3

| Cepa | Arginina (g/l) | Rendimiento de glucosa (%) |
|-----------------------------------|----------------|----------------------------|
| 237 (original) | 4,5 | 5,2 |
| 382 (mutante que utiliza acetato) | 19,3 | 23,9 |

El mutante que utiliza acetato mostró una mayor productividad de arginina que la cepa original.

40

45

50

55

60

65

ES 2 305 015 T3

REIVINDICACIONES

5 1. *Escherichia coli* que tiene la capacidad de producir arginina y la capacidad de utilizar acetato o ácido acético como única fuente de carbono.

10 2. *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que la bacteria forma una colonia en 2 días a 37°C cuando la bacteria se cultiva en un medio de agar que contiene ácido acético o acetato como única fuente de carbono.

15 3. *Escherichia coli* según la reivindicación 1 ó 2, en la que la bacteria es un derivado de *Escherichia coli* K12.

4. Microorganismo con número de acceso VKPM B-7925.

15 5. Microorganismo con número de acceso VKPM B-7926.

15 6. Procedimiento para producir un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de conferir la capacidad para utilizar acetato o ácido acético como única fuente de carbono a una cepa de *E. coli* que tiene la capacidad de producir arginina, o de conferir la capacidad para producir arginina a una cepa de *E. coli* que tiene la capacidad de utilizar acetato o ácido acético como única fuente de carbono.

20 7. Procedimiento para producir arginina, que comprende las etapas de cultivar *E. coli* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un medio de cultivo, para producir y acumular arginina en el medio.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

