

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 768**

51 Int. Cl.:

C12N 9/00	(2006.01)
C07K 14/34	(2006.01)
C12N 15/77	(2006.01)
C12P 13/14	(2006.01)
C12N 15/52	(2006.01)
C12R 1/15	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2021 PCT/KR2021/003633**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2021 WO21201489**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2021 E 21780977 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 4130255**

54 Título: **Vector recombinante para transformación que mejora la productividad de glutamina y cepa que emplea el mismo**

30 Prioridad:

30.03.2020 KR 20200038628

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

31.03.2025

73 Titular/es:

**DAESANG CORPORATION (100.00%)
26, Cheonho-daero, Dongdaemun-gu
Seoul 02586, KR**

72 Inventor/es:

**HONG, IN PYO;
KIM, BONG KI;
CHOI, MIN JIN;
PARK, SEOK HYUN y
HAN, JAE CHUN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 009 768 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

Vector recombinante para transformación que mejora la productividad de glutamina y cepa que emplea el mismo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un vector recombinante para transformación que incrementa la productividad de glutamina y una cepa en la que se ha introducido el mismo.

Técnica anterior

10 La actividad de la glutamina sintetasa (GS) es regulada por la glutamina sintetasa adenililtransferasa (ATasa, glnE). La ATasa regula la actividad de GS catalizando la adenilación y la desadenilación de GS, y se ve afectada por la concentración de nitrógeno en el medio. La actividad de ATasa es regulada por PII (gen P-II de la proteína reguladora de nitrógeno, glnB). La FIG. 1 muestra un mecanismo en el que la actividad de GS es inhibida por la activación de PII y ATasa cuando la concentración de nitrógeno es alta. Así, cuando se suministra una fuente de nitrógeno para producir glutamina, surge el problema de que la actividad de GS sea retroinhibida por la fuente de nitrógeno suministrada, dando como resultado una reducción en la producción de glutamina.

15 Así, a fin de incrementar la eficacia de la producción de glutamina, se requiere suprimir la retroinhibición de GS provocada por ATasa. La Patente japonesa nº JP4898441 divulga una cepa en la que la producción de glutamina se incrementa inhibiendo las actividades de los genes glnB y glnE implicados en la inhibición de la actividad de GS, pero todavía existe margen de mejora.

[Documentos de la técnica anterior]

(Documento de patente 0001) Patente Japonesa nº JP 4898441 B2 (6 de enero de 2012)

20 **DIVULGACIÓN****Problema técnico**

Una realización proporciona una cepa productora de glutamina que comprende un vector que contiene una secuencia nucleotídica que codifica glutamina sintetasa (GS) que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Solución técnica

25 Un aspecto proporciona un vector para transformación que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una glutamina sintetasa (GS) que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

30 La glutamina sintetasa es una enzima que sintetiza glutamina a partir de glutamato y amoníaco. Puesto que el grado en el que la actividad de la glutamina sintetasa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 es inhibida por ATasa es inferior que en el que una glutamina sintetasa que consista en otra secuencia es inhibida por ATasa, la glutamina sintetasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 puede incrementar la productividad de glutamina.

Según una realización, la secuencia nucleotídica que codifica la glutamina sintetasa puede consistir en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 2.

35 Según una realización, la glutamina sintetasa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y el gen glnA que consiste en la secuencia nucleotídica de SEQ ID NO: 2 se pueden derivar de una cepa de *Corynebacterium glutamicum* depositada con el número de registro KFCC10694. Según una realización, como resultado de comparar la homología entre la secuencia de glnA derivada de KFCC10694 y la secuencia de glnA derivada de otra cepa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, se confirmó que la homología de secuencias nucleotídicas era solo 88,2% y la homología de secuencias de aminoácidos entre glutamina sintetetas expresadas a partir de los genes era solo 93,7%. Debido a esta diferencia de secuencias, el grado en el que la actividad de la glutamina sintetasa derivada de KFCC10694 es inhibida por ATasa puede diferir del grado en el que la actividad de la glutamina sintetasa que consiste en la otra secuencia es inhibida por ATasa.

45 Según una realización, el vector para transformación puede contener un promotor conectado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica la glutamina sintetasa. El término "conectado operativamente" significa que un gen que se va a expresar está conectado funcionalmente a una secuencia o secuencias reguladoras para el mismo de un modo que permita la expresión del gen. Cuando el nivel de expresión de GS es incrementado por el promotor, la retroinhibición de GS por ATasa se puede suprimir, incrementando de ese modo la productividad de glutamina. El promotor puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Por ejemplo, el promotor constitutivo puede ser P_{cspB}, P_{aprE}, P₁₈₀, P_{sod}, P_{dapA}, P_{porB}, P_{ilvC}, P_{L10}, P_{L26}, P_{H16}, P_{I51}, P_{H30} o P_{H36}, y el promotor inducible puede ser P_{lacUV5}, P_{tac}, P_{trc}, P_{popB}, P_{aceA/aceB}, P_{gntP/gntK}, P_{CJ10X2}, P_{tac-M}, P_{malE1} o P_{BAD}. Según una realización, el promotor puede ser un promotor de superóxido dismutasa (P_{sod}). El vector para transformación puede contener una secuencia reguladora de la expresión tal como un potenciador.

Según una realización, el vector para transformación puede contener una secuencia terminadora de la transcripción conectada operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica la glutamina sintetasa. Según una realización, la secuencia terminadora de la transcripción puede ser una secuencia rrnBT1T2.

5 El vector para transformación puede contener, como marcador de selección, un gen de resistencia a antibióticos (p. ej., neomicina, carbenicilina, kanamicina, espectinomina o higromicina, etc.) (p. ej., neomicina fosfotransferasa (nptII) o higromicina fosfotransferasa (hpt), etc.).

Ejemplos del vector incluyen, pero no se limitan a, un vector plasmídico, un vector cosmídico, un vector bacteriofágico, un vector viral, y similares.

Otro aspecto proporciona una cepa transformada con el vector para transformación.

10 Según una realización, la cepa transformada puede ser una cepa en la que el gen *glnA* natural se haya inactivado. El término "natural" se refiere a un gen poseído naturalmente por el microorganismo. El término "inactivación" se refiere a cualquier modificación genética que dé como resultado la alteración de la transcripción o la traducción del gen de interés o la actividad del producto génico, y puede incluir la inactivación de un promotor. Esta inactivación específica del gen se puede realizar mediante un método establecido en la técnica. Por ejemplo, la inactivación específica del
15 gen se puede realizar mediante eliminación génica, truncamiento génico mediante inserción de una secuencia heterogénea, mutación interruptora, mutación del marco, mutación de aminoácido, o similares.

Según una realización, la cepa transformada puede ser una cepa en la que el gen *glnE* natural se ha inactivado. Cuando la expresión del gen *glnE* natural se reduce o se pierde, la expresión de ATasa, que inhibe la actividad de la glutamina sintetasa, se reduce, y así se puede incrementar la productividad de glutamina.

20 Según una realización, la cepa transformada puede ser una cepa de *Corynebacterium* sp., por ejemplo, una cepa de *Corynebacterium glutamicum* depositada con el número de registro KFCC10694.

La transformación se puede realizar usando una técnica de introducción de vectores adecuada seleccionada dependiendo de la célula anfitriona, como se sabe en la técnica. Por ejemplo, la introducción del vector se puede realizar mediante electroporación, choque térmico, precipitación de fosfato cálcico (CaPO₄), precipitación de cloruro
25 cálcico (CaCl₂), microinyección, el método del polietilenglicol (PEG), el método de DEAE-dextrano, el método de liposomas catiónicos, el método de acetato de litio-DMSO, o combinaciones de los mismos.

Otro aspecto más proporciona un método para producir glutamina que comprende una etapa de cultivo de la cepa transformada.

30 El cultivo se puede realizar usando un medio y condiciones de cultivo adecuados conocidos en la técnica, y cualquier experto en la técnica puede ajustar y usar fácilmente el medio y las condiciones de cultivo. Específicamente, el medio puede ser un medio líquido, sin estar limitado a esto. Ejemplos del método de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo discontinuo, cultivo continuo, cultivo semicontinuo, o combinaciones de los mismos.

El medio debe cumplir los requisitos de una cepa específica de modo apropiado, y puede ser modificado apropiadamente por un experto en la técnica. Por ejemplo, para el medio de cultivo para la cepa de *Corynebacterium*
35 sp., se puede hacer referencia a un documento conocido (Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., EE. UU. de A., 1981). Además, el medio puede contener diversas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y componentes oligoelementales. Ejemplos de fuentes de carbono que se pueden usar incluyen: sacáridos y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; aceites y grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales
40 como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas sustancias se pueden usar individualmente o como una mezcla. Ejemplos de fuentes de nitrógeno que se pueden usar incluyen peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, líquido de maceración de maíz, harina de soja, urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico. Las fuentes de nitrógeno también pueden usarse
45 individualmente o como una mezcla. Ejemplos de fuentes de fósforo que se pueden usar incluyen dihidrogenofosfato potásico o hidrogenofosfato dipotásico o las correspondientes sales que contienen sodio. El medio de cultivo puede contener sales metálicas tales como sulfato magnésico o sulfato de hierro, que se requieren para el crecimiento. Además, el medio de cultivo puede contener sustancias de crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Por otra parte, se pueden usar precursores adecuados en el medio de cultivo. El medio o los componentes
50 individuales se pueden añadir al medio de cultivo de modo discontinuo o continuo mediante un método adecuado durante el cultivo.

El pH del medio de cultivo se puede ajustar añadiendo compuestos tales como hidróxido amónico, hidróxido potásico, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico al medio de cultivo de microorganismos de un modo apropiado durante el cultivo. Además, durante el cultivo, la espumación se puede suprimir usando un agente antiespumante tal como un éster poliglicólico de ácido graso. Adicionalmente, para mantener el medio de cultivo en una condición aeróbica, se puede inyectar oxígeno o un gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) en el medio de cultivo. La temperatura del medio de cultivo puede ser generalmente de 20°C a 45°C, por ejemplo, de 25°C a 40°C. El cultivo se puede continuar

hasta que se produzca una cantidad deseada de L-glutamina. Por ejemplo, el tiempo de cultivo puede ser de 10 horas a 160 horas.

5 El método para producir glutamina puede comprender una etapa de recuperación de L-glutamina del microorganismo cultivado o el medio. El método para recuperar L-glutamina no está particularmente limitado, y la L-glutamina se puede recuperar usando un método adecuado conocido en la técnica dependiendo del método de cultivo. Ejemplos del método para recuperar L-glutamina incluyen centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, HPLC, y similares.

Efectos ventajosos

10 Puesto que la glutamina sintetasa expresada por la cepa según una realización está menos retroinhibida por ATasa, puede incrementar significativamente la producción de glutamina.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un mecanismo en el que se regula la actividad de glutamina sintetasa.

La FIG. 2 muestra un vector pk19ms/ Δ glnA según una realización.

FIG. 3 muestra un vector pk19ms/ Δ glnE según una realización.

15 FIG. 4 muestra un vector pa'-glnA(ATCC13032) según una realización.

FIG. 5 muestra un vector pa'-glnA(KFCC10694) según una realización.

Modo para la invención

20 En lo sucesivo en el presente documento, se describirán una o más realizaciones con más detalle con referencia a ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son para ilustrar una o más realizaciones, y el alcance de la presente invención no se limita a estos ejemplos, sino que el alcance está definido por las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Construcción de vectores para la eliminación de los genes glnA y glnE en el cromosoma KFCC-10694

25 Como materiales para la construcción de vectores, se usaron Wizard genomic DNA purification kit (Promega, EE. UU. de A.), PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara, Japón), DNA ligation kit (Takara, Japón) y HindIII y BamHI (NEB, Inglaterra).

1-1. Construcción de vector para la eliminación de glnA

30 Usando el ADN cromosómico de una cepa KFCC-10694 (*Corynebacterium glutamicum* MWM-891020) como plantilla, se realizó PCR con el cebador 1 y el cebador 2 para obtener un producto de amplificación del brazo izquierdo de glnA de KFCC-10694. De forma similar, se realizó PCR con el cebador 3 y el cebador 4 para obtener un producto de amplificación del brazo derecho de glnA.

Los productos de amplificación del brazo izquierdo y derecho de glnA se sometieron a PCR cruzada con una combinación del cebador 1 y el cebador 4 para obtener un producto de amplificación en el que el brazo izquierdo y el brazo derecho estaban ligados entre sí. El producto de amplificación obtenido se insertó en el sitio BamHI de un vector pK19mobSacB. El vector construido para la eliminación de glnA se denominó pK19ms/ Δ glnA (véase la FIG. 2).

35 1-2. Construcción de vector para la eliminación de glnE

Del mismo modo que la construcción del vector para la eliminación de glnA, se realizó PCR con una combinación del cebador 5 y el cebador 6 para obtener un producto de amplificación del brazo izquierdo de glnE de KFCC-10694, y se realizó PCR con una combinación del cebador 7 y el cebador 8 para obtener un producto de amplificación del brazo derecho de glnE.

40 Los productos de amplificación del brazo izquierdo y el brazo derecho de glnE se amplificaron mediante PCR cruzada usando una combinación del cebador 5 y el cebador 8 para obtener un producto de amplificación en el que el brazo izquierdo y el brazo derecho estaban ligados entre sí. El producto de amplificación se insertó en el sitio HindIII de un vector pK19mobSacB. El vector construido para la eliminación de glnE se denominó pK19ms/ Δ glnE (véase la FIG. 3).

45 La Tabla 1 posterior muestra información sobre el glnA de KFCC-10694, el glnE de KFCC-10694 y las secuencias nucleotídicas de los cebadores 1 a 8.

[Tabla 1]

Cebador	SEQ ID NO	Secuencia (5'→3')
Cebador 1	5	<u>GGGATCC</u> CATACCCAAGATGGCATGG
Cebador 2	6	GCTGGAGGATTTAGATTTGGTGA <u>CTCCTCATTGACA</u>
Cebador 3	7	TGTCAATGAGGAGTCACCAAATCTAAATCCTCCAGC
Cebador 4	8	<u>GGGATCC</u> CTTAAAAAGCTTTTCGAC
Cebador 5	9	<u>GGAAGCTT</u> CTTGACCTGCATGATCTCG
Cebador 6	10	GCCAATCGAGAACGCATGCCACTACTTTACGGTCA
Cebador 7	11	ATGACCGTAAAGTAGTGGGCATGCGTTCTCGATTGGC
Cebador 8	12	<u>GGAAGCTT</u> TACACCAACCACAACACTGC

Ejemplo 2: Construcción de dos vectores que sobreexpresan glnA

5 Usando el ADN del gen glnA de ATCC13032 como plantilla, se realizó PCR con una combinación del cebador 9 y el cebador 10 para obtener un producto de amplificación de glnA(AT).

Separadamente, usando el ADN del gen glnA de KFCC10694 como plantilla, se realizó PCR con una combinación del cebador 11 y el cebador 12 para obtener un producto de amplificación de glnA(KF).

10 Como resultado de examinar la homología entre el glnA(AT) y el glnA(KF), se confirmó que la homología de secuencias nucleotídicas era solo 88,2% y la homología de secuencias de aminoácidos era solo 93,7%. Las secuencias de aminoácidos y las secuencias nucleotídicas de glnA (AT) y glnA(KF) se muestran en la Tabla 2 posteriormente.

[Tabla 2]

Lista	SEQ ID NO	Información de la secuencia
Aminoácido de GS de KFCC10694	1	<p>VAFNTPEEIVKFIKDENVFVDVRFVDVPGTEQHFSIPAALFD</p> <p>EEAIEEGLAFDGGSSIRGFTTIDESDMNLLPDLGTATIDPFRKAK</p>

ES 3 009 768 T3

Lista	SEQ ID NO	Información de la secuencia
		<p>TLNIKFFVHDPFTREAFSRDPRNVARKAEQYLASTGIADTCNF GAEEAFYLFDSVRYSTDINSSFYHVDITNEGWWNRGRETNLD GTPNLGAKNRVKGGYFPVAPYDQTVEIRDDMVNYLSNAGF QLERFHHEVGGGQQEINYRFNTMLHAADDIQTfKYIIKNTAH LHGKTATFMPKPLAGDNGSGMHAHQSLWKDGKPLFHDESG YAGLSDIARYYIGGILHHAGAVLAFTNPTLNSYHRLVPGFEA PINLVYSQRNRSAAVRIPITGSNPKAKRIEFRAPDPSGNPYFGF AAMMMAGLDGIKNRIEPHAPVDKDLIELPPEEAASIPQAPTS LEASLKALQEDSDFLTESDVFTEDLIESYIQYKYDNEITPVRLR PTPQEFEMYFDC</p>
Nucleótido de glnA de KFCC10694	2	<p>GTGGCGTTTAATACCCCGGAAGAAATAGTCAAGTTCATCA AAGACGAGAACGTCGA ATTCGTAGACGTTTCGCTTACCCGATGTACCAGGAAGTAA CAGCACTTCAGCATCC CAGCCGCCCTCTTCGATGAAGAGGCCATCGAAGAAGGCCT AGCATTTCGACGGATCC TCGATCCGCGGATTCACCACCATCGATGAGTCTGACATGA ACCTCCTACCAGACCT CGGAACTGCCACCATTGACCCGTTCCGCAAGGCCAAGACT CTGAACATCAAGTTCT TCGTTCATGATCCATTCACCCGCGAAGCTTCTCCCGCGAC CCACGCAATGTGGCA CGCAAGGCAGAGCAGTACCTCGCTCCACCGGCATTGCAG ATACCTGCAACTTCGG</p>

ES 3 009 768 T3

Lista	SEQ ID NO	Información de la secuencia
		<p>CGCAGAAGCCGAGTTCTACCTCTTTGATTTCAGTCCGCTACT CCACCGATATTA CCAGCTTCTACCACGTTGATACCAATGAAGGCTGGTGGAA CCGTGGCCGGGAAACC AACCTTGATGGCACCCCAAACCTTGGCGCCAAGAACCGTG TCAAGGGCGGATACTT CCCTGTTGCACCATATGACCAAACCGTGGAAATCCGCGAT GATATGGTCAACTACC TCTCAAACGCTGGTTTCCAACCTGAGCGTTTCCACCACGAC GTCGGCGGTGGACAG CAGGAGATCAACTACCGCTTCAACACCATGCTGCACGCGG CTGATGATATTCAGAC ATTCAAGTACATCATCAAGAACACCGCTCACCTCCACGGC AAGACCGCAACCTTTA TGCCTAAGCCACTGGCTGGCGACAACGGCTCTGGAATGCA CGCACACCAGTCCCTA TGGAAGGACGGCAAGCCACTCTTCCACGATGAGTCCGGTT ACGCAGGCCTATCTGA CATCGCCCCTACTACATTGGTGGCATCCTGCACCACGCA GGTGCAGTATTGGCGT TCACCAACCCAAACCCTGAACTCCTACCACCGTTTAGTTCCT GGCTTCGAGGCGCCA ATCAACTTGGTGTACTCCCAGCGCAACCGCTCTGCTGCTGT</p>

ES 3 009 768 T3

Lista	SEQ ID NO	Información de la secuencia
		<p>ACGTATCCCAATCAC</p> <p>CGGATCCAACCCAAAGGCAAAGCGCATCGAGTTCCGCGCT</p> <p>CCGGACCCATCAGGCA</p> <p>ACCCATACTTCGGCTTCGCTGCCATGATGATGGCTGGCCTT</p> <p>GACGGCATCAAGAAC</p> <p>CGCATCGAGCCACACGCACCAGTGGATAAGGATCTCTACG</p> <p>AGCTTCCACCAGAGGA</p> <p>AGCTGCCTCCATCCCACAGGCTCCAACCTCCCTTGAAGCTT</p> <p>CATTGAAGGCTCTTC</p> <p>AGGAAGATTCCGACTTCCTCACCGAGTCTGATGTCTTCACC</p> <p>GAAGATCTCATCGAG</p> <p>TCCTACATCCAGTACAAGTACGACAACGAGATCACCCAG</p> <p>TCCGTTTGCGCCCAAC</p> <p>TCCTCAAGAGTTCGAAATGTACTTCGACTGCTAA</p>
<p>Aminoácido de GS de ATCC 13032</p>	<p>3</p>	<p>VAFETPEEIVKFIKDENVFVDVRFDTLPGTEQHFSIPAASFDA</p> <p>DTIEEGLAFDGSIRGFTTIDESDMNLLPDLGTATLDPFRKAK</p> <p>TLNVKFFVHDPFTREAFSRDPRNVARKAEQYLASTGIADTCN</p> <p>FGAEAEFYLFDSVRYSTEMNSGFYEVDTEEGWWNRGKETNL</p> <p>DGTPNLGAKNRVKGGYFPVAPYDQTVDVRDDMVRNLAASG</p> <p>FALERFHHEVGGGQQEINYRFNTMLHAADDIQTFKYIINKNTA</p> <p>RLHGKAATFMPKPLAGDNGSGMHAHQSLWKDGKPLFHDES</p> <p>GYAGLSDIARYYIGGILHHAGAVLAFTNATLNSYHRLVPGFE</p> <p>APINLVYSQRNRSAAVRIPITGSNPKAKRIEFRAPDPSGNPYLG</p>

Lista	SEQ ID NO	Información de la secuencia
		<p>FAAMMMAGLDGIKNRIEPHAPVDKDLYELPPEEAASIPQAPT SLEASLKALQEDTDFLTESDVFTEDLIEAYIQYKYDNEISPV LRPTPQEFELYFDC</p>
<p>Nucleótido de glnA de ATCC 13032</p>	<p>4</p>	<p>GTGGCGTTTGAAACCCCGGAAGAAATTGTCAAGTTCATCA AGGATGAAAACGTCTGA GTTCGTTGACGTTTCGATTCACCGACCTTCCCGGCACCGAGC AGCACTTCAGCATCC CAGCTGCCAGCTTCGATGCAGATACAATCGAAGAAGGTCT CGCATTTCGACGGATCC TCGATCCGTGGCTTCACCACGATCGACGAATCTGACATGA ATCTCCTGCCAGACCT CGGAACGGCCACCCTTGATCCATTCGCAAGGCAAAGACC CTGAACGTTAAGTTCT TCGTTCACGATCCTTTACCCGCGAGGCATTCTCCCGCGAC CCACGCAACGTGGCA CGCAAGGCAGAGCAGTACCTGGCATCCACCGGCATTGCAG ACACCTGCAACTTCGG CGCCGAGGCTGAGTTCTACCTCTTCGACTCCGTTTCGCTACT CCACCGAGATGAACT CCGGCTTCTACGAAGTAGATACCGAAGAAGGCTGGTGGAA CCGTGGCAAGGAAACC AACCTCGACGGCACCCCAAACCTGGGCGCAAAGAACCGC GTCAAGGGTGGCTACTT</p>

Lista	SEQ ID NO	Información de la secuencia
		CCCAGTAGCACCATACGACCAAACCGTTGACGTGCGCGAT GACATGGTTCGCAACC TCGCAGCTTCCGGCTTCGCTCTTGAGCGTTTCCACCACGAA GTCGGTGGCGGACAG CAGGAAATCAACTACCGCTTCAACACCATGCTCCACGCGG CAGATGATATCCAGAC CTTCAAGTACATCATCAAGAACACCGCTCGCCTCCACGGC AAGGCTGCAACCTTCA TGCCTAAGCCACTGGCTGGCGACAACGGTTCGGCATGCA CGCTCACCAGTCCCTC TGGAAGGACGGCAAGCCACTCTCCACGATGAGTCCGGCT ACGCAGGCCTGTCCGA CATCGCCCGCTACTACATCGGCGGCATCCTGCACCACGCA GGCCTGTCTGGCGT TCACCAACGCAACCCTGAACTCCTACCACCGTCTGGTTCC AGGCTTCGAGGCTCCA ATCAACCTGGTGTACTCACAGCGCAACCGTTCGGCTGCTG TCCGTATCCCAATCAC CGGATCCAACCCGAAGGCAAAGCGCATCGAATTCCGCGCT CCAGACCCATCAGGCA ACCCATACTGGGCTTTGCAGCGATGATGATGGCCGGCCT CGACGGCATCAAGAAC CGCATCGAGCCACACGCTCCAGTGGACAAGGACCTCTACG

Lista	SEQ ID NO	Información de la secuencia
		<p>AACTACCACCAGAGGA</p> <p>AGCTGCATCCATTCCACAGGCACCAACCTCCCTGGAAGCA</p> <p>TCCCTGAAGGCACTGC</p> <p>AGGAAGACACCGACTTCCTCACCGAGTCTGACGTCTTCAC</p> <p>CGAGGATCTCATCGAG</p> <p>GCGTACATCCAGTACAAGTACGACAACGAGATCTCCCCAG</p> <p>TTCGCCTGCGCCCAAC</p> <p>CCCGCAGGAATTTCGAATTGTACTIONCGACTGCTAA</p>

5 En cuanto a los promotores de *sod*, un primer producto de amplificación del promotor de *sod* se obtuvo amplificando el ADN cromosómico de ATCC13032 como plantilla usando una combinación del cebador 13 (directo) y el cebador 14 (retrocebador), y se obtuvo un segundo producto de amplificación del promotor de *sod* amplificando el ADN cromosómico de ATCC13032 como plantilla usando una combinación del cebador 13 (directo) y el cebador 15 (retrocebador). La razón por la que los cebadores 14 y 15 se usaban separadamente como los cebadores inversos (retrocebadores) se debe a la diferencia en la secuencia de *glnA*, y las secuencias promotoras de *sod* son iguales (véase *gggtaaaaaatccttcg* en la Tabla 3 posterior).

10 Como secuencias terminadoras de la transcripción *rrnBT1T2*, se obtuvo un primer producto de amplificación de *rrnBT1T2* amplificando el ADN cromosómico de *E. coli* DH5a como plantilla usando una combinación del cebador 16 (directo) y el cebador 17 (retrocebador), y se obtuvo un segundo producto de amplificación de 2 *rrnBT1T2* amplificando el ADN cromosómico de *E. coli* DH5a usando una combinación del cebador 18 (retrocebador) y el cebador 17 (retrocebador). La razón por la que los cebadores 16 y 18 se usaban separadamente como los cebadores directos se debe a la diferencia en la secuencia de *glnA*, y las secuencias terminadoras de la transcripción son iguales (véase *agaattgctggcgga* en la Tabla 3 posterior).

15 El primer producto de amplificación del promotor de *sod*, *glnA(AT)*, y el primer producto de amplificación del terminador *rrnBT1T2* se insertaron en el sitio *Bam*HI en un vector *pa'*, que es un vector lanzadera de *E. coli-Corynebacterium*, realizando PCR cruzada usando una combinación del cebador 13 y el cebador 17, construyendo de ese modo un vector *pa'-glnA(AT)* (véase la FIG. 4).

20 De forma similar, el segundo producto de amplificación del promotor de *sod*, *glnA(KF)*, y el segundo producto de amplificación del terminador *rrnBT1T2* se insertaron en el sitio *Bam*HI en un vector *pa'*, que es un vector lanzadera de *E. coli-Corynebacterium*, realizando PCR cruzada usando una combinación del cebador 13 y el cebador 17, construyendo de ese modo un vector *pa'-glnA(KF)* (véase la FIG. 5).

25 Los materiales experimentales usados en el Ejemplo 2 eran PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara, Japón), DNA ligation kit (Takara, Japón) y *Bam*HI (NEB, Inglaterra).

Las secuencias nucleotídicas de los cebadores 9 a 18 se muestran en la Tabla 3 posterior.

[Tabla 3]

Cebador	SEQ ID NO	Secuencia (5'→3')
Cebador 9	13	CGAAAGGATTTTTTACCCGTGGCGTTTGAAACCCCG
Cebador 10	14	TGCCGCCAGGCAAATTCCTTAGCAGTCGAAGTACAA
Cebador 11	15	CGAAAGGATTTTTTACCCGTGGCGTTTAATACCCCGG

Cebador	SEQ ID NO	Secuencia (5'→3')
Cebador 12	16	CTGCCGCCAGGCAAATTCTTTAGCAGTCGAAGTACAT
Cebador 13	17	GGGATCCAGCTGCCAATTATTCCGGG
Cebador 14	18	CGGGGTTTCAAACGCCAC <u>GGGTAAAAAATCCTTTCG</u>
Cebador 15	19	CCGGGGTATTAACGCCAC <u>GGGTAAAAAATCCTTTCG</u>
Cebador 16	20	TTGTACTTCGACTGCTAA <u>AGAATTTGCCTGGCGGCA</u>
Cebador 17	21	GGGATCCTTCGTTTTATTGATGCC
Cebador 18	22	ATGTACTTCGACTGCTAA <u>AGAATTTGCCTGGCGGCAG</u>

Ejemplo 3: Construcción de la cepa KFCC10694 que contiene eliminación del gen glnA y/o el gen glnE

El vector pK19ms/ ΔglnA construido en el Ejemplo 1 se introdujo mediante electroporación en células competentes de la cepa KFCC10694, y las células se sembraron en medio 2YT KM AGAR, y a continuación se cultivaron en una incubadora a 30°C durante 4 días para obtener colonias. Entre las colonias en las se inducía la primera recombinación homogénea, las colonias transformadas se cultivaron en medio líquido 2YT durante 12 horas, y a continuación se sembraron sobre medio de agar 2YT sacarosa GM, y el marcador de antibiótico se retiró mediante la segunda recombinación homóloga. Se comprobó finalmente si el gen glnA se retiraba como se pretendía sometiendo la colonia seleccionada a PCR y secuenciación. La cepa con eliminación del gen glnA construida a través del procedimiento descrito anteriormente se denominó D 10694A.

Del mismo modo, el vector pK19ms/ ΔglnE construido en el Ejemplo 1 se introdujo en la cepa D10694A, construyendo de ese modo una cepa que contenía la eliminación de los genes tanto glnA como glnE. El medio usado en este experimento contenía glutamina en una concentración de 100 mg/l. La cepa que contenía la eliminación de los genes tanto glnA como glnE, construida a través del procedimiento descrito anteriormente, se denominó D10694AE.

Los materiales usados en el Ejemplo 3 eran agar 2YT (16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 1,5% de agar), agar 2YT KM (agar 2YT, 15 mg/l de kanamicina), agar 2YT sacarosa GM (agar 2YT, 100 g/l de sacarosa, 100 mg/l de glutamina), y electroporador (BIO-RAD, EE. UU. de A.).

Ejemplo 4: Construcción de la cepa en la que se ha introducido el vector pa'-glnA(AT) o el vector pa'-glnA(KF)

Cada uno del vector pa'-glnA(ATCC13032) y el vector pa'-glnA(KFCC10694) construidos en el Ejemplo 2 se introdujo mediante electroporación en cada una de las cepas D10694A y D10694AE construidas en el Ejemplo 3. Cada una de las cepas en las que se ha introducido cada uno de los vectores se sembró en medio de agar 2YT KM y se cultivó durante 3 días en una incubadora a 30°C para obtener colonias. Las cepas construidas a través del procedimiento descrito anteriormente se denominaron D10694A/pa-glnA(AT), D10694A/pa-glnA(KF), D10694AE/pa-glnA(AT) y D10694AE/pa-glnA(KF), respectivamente.

Los materiales experimentales usados en el Ejemplo 4 eran agar 2YT (16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 1,5% de agar), agar 2YT KM (agar 2YT, 15 mg/l de kanamicina), y electroporador (BIO-RAD, EE. UU. de A.).

Ejemplo 5: Análisis de las productividades de glutamina de las cepas construidas en el Ejemplo 4

Se aportaron 20 ml de medio de siembra a matraces Erlenmeyer de 500 ml y se trataron en autoclave según un método convencional, y a continuación cada una de las cepas se inoculó en el medio y se cultivó con agitación a 30°C durante 24 horas para obtener cultivos de siembra. Se aportaron 100 ml de medio de producción a matraces Erlenmeyer de 500 ml y se trataron en autoclave según un método convencional, y a continuación 100 ml de cada uno de los cultivos de siembra previamente preparados se inocularon en el medio y se cultivaron con agitación a 30°C durante 72 horas. Para comparar la productividad con las cepas D10694A y D10694AE, se añadieron al medio 100 mg/l de glutamina. Después de la finalización del cultivo, se realizó la determinación del contenido de L-glutamina en cada uno de los cultivos mediante un método de HPLC convencional.

Los resultados experimentales para la productividad de glutamina se muestran en la Tabla 4 posterior.

[Tabla 4]

Nombre de la cepa	OD(1/100)	Δ (L-GLN(%))
KFCC10694	3,256	3,56
D10694A (glnA eliminado)	3,135	n.d.
D10694AE (glnA y glnE eliminados)	3,185	n.d.
D10694A/Pa-glnA(AT)	3,138	1,97
D10694A/Pa-glnA(KF)	3,202	5,24
D10694AE/Pa-glnA(AT)	0,209	3,88
D10694AE/Pa-glnA(KF)	0,217	5,31

Los resultados experimentales de la Tabla 4 anterior mostraban que la cepa D10694A y la cepa D10694AE no producían L-glutamina debido a la eliminación de glnA (gen de expresión de GS).

5 En cuanto a las productividades de glutamina de D10694A/Pa-glnA (AT) y D10694A/Pa-glnA (KF) de la Tabla 4, la productividad de L-glutamina de D10694A/Pa-glnA(AT) disminuía en comparación con la de la cepa original KFCC10694, mientras que la productividad de L-glutamina de D10694A/Pa-glnA(KF) se incrementaba en comparación con la de la cepa original KFCC10694. Aunque se introducía el mismo promotor de sod en las dos cepas, la productividad de L-glutamina era significativamente superior cuando se introducía glnA(KF) que cuando se introducía glnA(AT). Esto sugiere que existe una diferencia en el grado de retroinhibición entre glnA(AT) y glnA(KF).

10 Como resultado de examinar las productividades de L-glutamina de D10694AE/Pa-glnA(AT) y D10694AE/Pa-glnA(KF) que no sufren retroinhibición debida a inactivación de ATasa, se podría observar que la productividad de L-glutamina de la cepa D10694AE/Pa-glnA(AT) era aproximadamente 1,91% superior que la de la cepa D10694A/Pa-glnA(AT), indicando que había una diferencia significativa en la productividad de L-glutamina dependiendo de la presencia o ausencia de actividad de ATasa. Sin embargo, se podría observar que la productividad de L-glutamina de la cepa D10694AE/Pa-glnA(KF) se incrementaba en 0,07% en comparación con la de la cepa D10694A/Pa-glnA(KF), pero el grado del incremento no era significativo, indicando que la diferencia en la productividad de L-glutamina dependiendo de la presencia o ausencia de actividad de ATasa no era significativa. Esto significa que glnA(KF) es menos retroinhibido por ATasa.

20 Más específicamente, la cepa D10694A/Pa-glnA(KF) mostraba un incremento en la productividad de aproximadamente 47% en comparación con la cepa original, y la cepa D10694AE/Pa-glnA(KF) mostraba un incremento en la productividad de aproximadamente 49% en comparación con la cepa original. Lo que es destacable aquí es que la diferencia de productividad entre D10694A/Pa-glnA(KF) y D10694AE/Pa-glnA(KF) en comparación con la cepa original era solo 2%, lo que es insignificante. Aunque D10694AE/Pa-glnA(KF) carecía adicionalmente del gen glnE implicado en la retroinhibición de GS, el incremento en la productividad de glutamina de D10694AE/Pa-glnA(KF) con respecto al de la cepa original era solo 2% en comparación con el incremento en la productividad de glutamina de D10694A/Pa-glnA(KF) con respecto al de la cepa original, indicando que la diferencia en la productividad de glutamina dependiendo de la presencia o ausencia de actividad de ATasa no era significativa. Esto sugiere que el incremento en la productividad mediante la introducción de glnA(KF) no se debía simplemente a la contribución del promotor de sod, sino que se debía a la contribución de la resistencia de glnA(KF) a la retroinhibición.

REIVINDICACIONES

1. Un vector para transformación que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una glutamina sintetasa que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El vector según la reivindicación 1, en el que la secuencia nucleotídica que codifica la glutamina sintetasa consiste en SEQ ID NO: 2.
3. El vector según la reivindicación 1, que contiene un promotor conectado operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica la glutamina sintetasa.
4. El vector según la reivindicación 1, que contiene una secuencia terminadora de la transcripción conectada operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica la glutamina sintetasa.
- 10 5. Una cepa transformada con el vector para transformación según la reivindicación 1.
6. La cepa según la reivindicación 5, en la que se ha inactivado la expresión de un gen *glnE* natural en la cepa.
7. La cepa según la reivindicación 5, que es *Corynebacterium glutamicum*.
8. Un método para producir glutamina que comprende una etapa de cultivo de la cepa según la reivindicación 5

Fig. 1

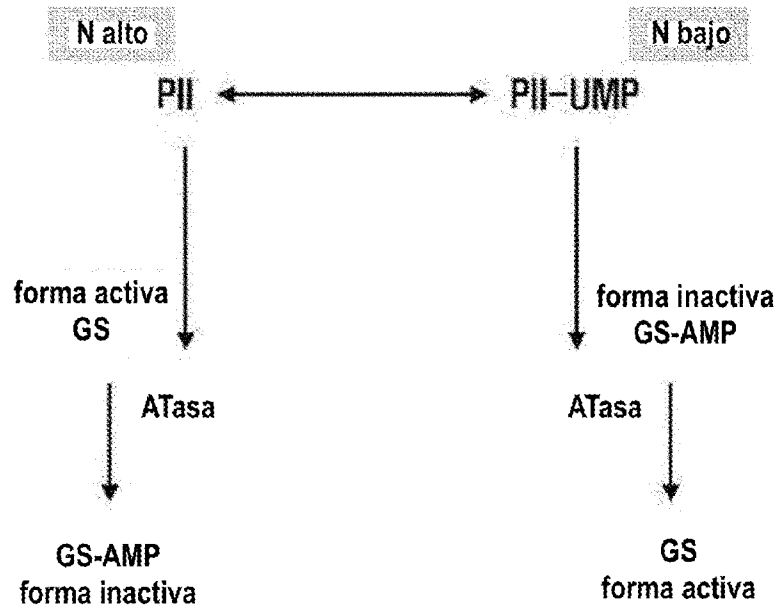


Fig. 2

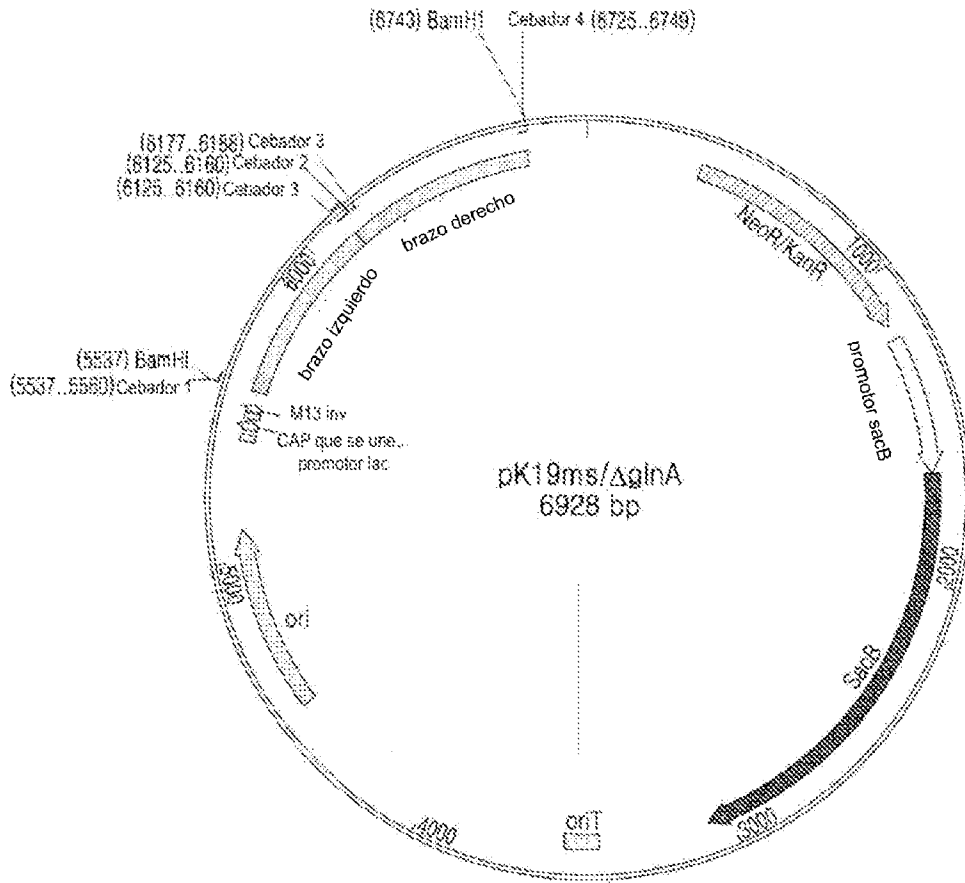


Fig. 3

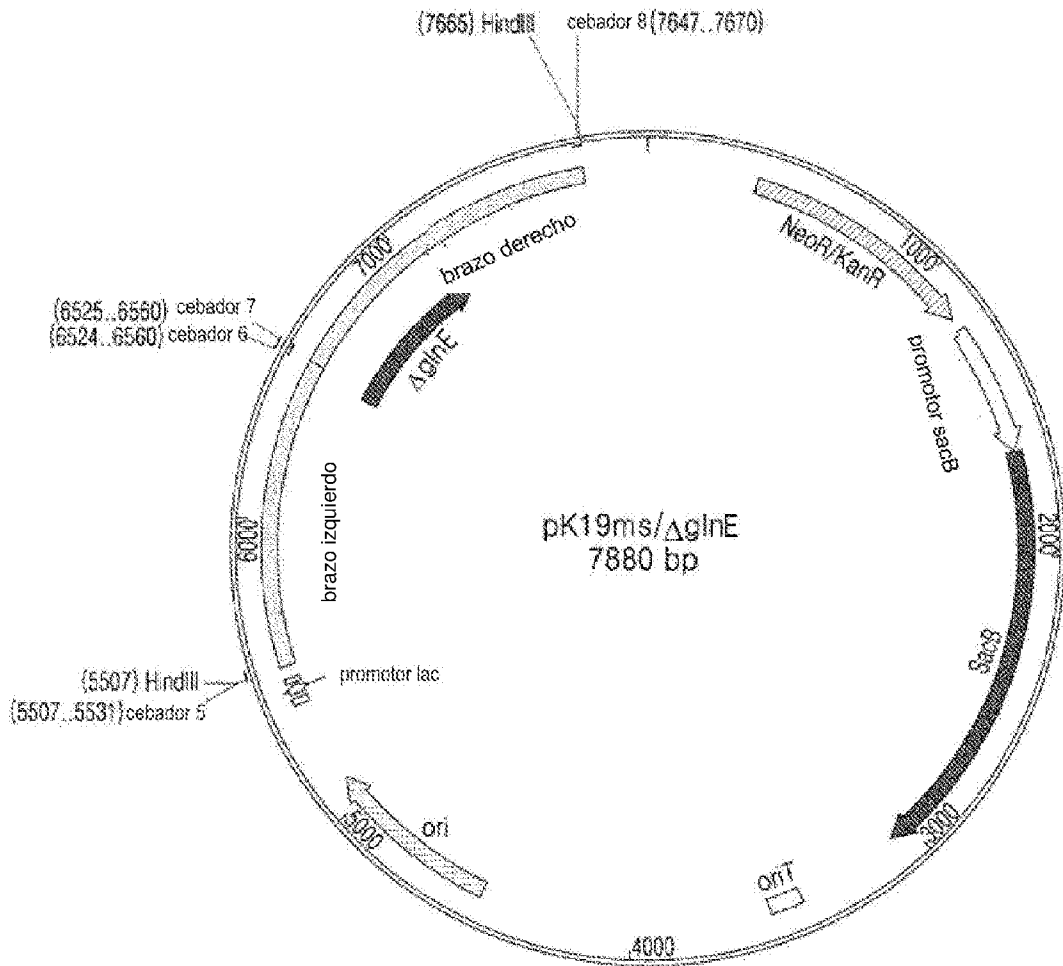


Fig. 4

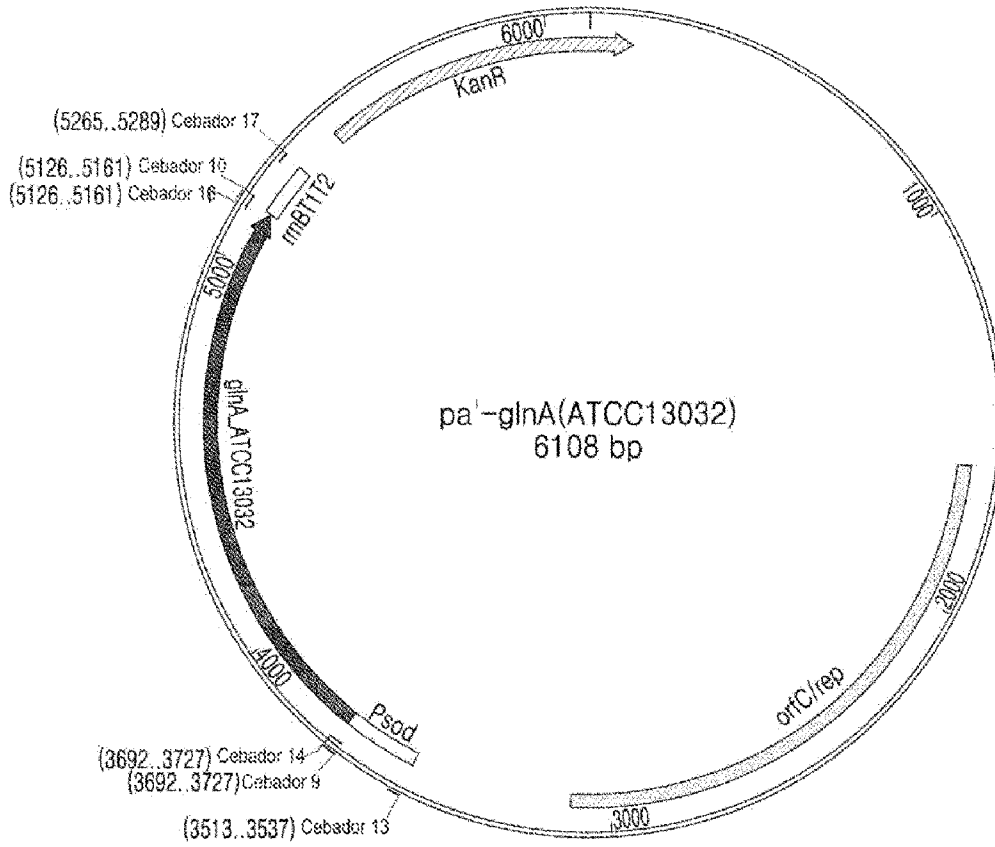


Fig. 5

