



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 338 555**

51 Int. Cl.:
C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04725555 .9**

96 Fecha de presentación : **02.04.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1611232**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.01.2006**

54 Título: **Microorganismo con genes *pckA/tdcBC* inactivados y método de producción de L-treonina usando el mismo.**

30 Prioridad: **04.04.2003 KR 10-2003-0021458**

73 Titular/es: **CJ Cheiljedang Corporation**
500 Namdaemunro 5-ga
Jung-gu, Seoul 100-749, KR

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.05.2010

72 Inventor/es: **Park, Young Hoon;**
Lee, Byoung Choon;
Kim, Dae C.;
Lee, Jin Ho y
Cho, Jae Yong

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.05.2010

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 338 555 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 con genes *pckA*/*tdcBC* inactivados y método de producción de L-treonina usando el mismo.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo que produce L-treonina y a un método de producción de L-treonina usando el microorganismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a un microorganismo que contiene tanto el operón *tdcBC* como el gen *pckA* inactivados en el cromosoma y que está notablemente mejorado en la productividad de L-treonina debido a la inactivación de los dos genes, y a un método de producción de L-treonina usando un microorganismo de este tipo.

15 Descripción de la técnica relacionada

Se sabe que la L-treonina es un aminoácido esencial, que se ha usado ampliamente como aditivo para forraje y piensos para animales y como estimulador del crecimiento animal, así como componente de disoluciones acuosas médicas y otra materia prima para especialidades farmacéuticas. La L-treonina sólo la producen actualmente cinco empresas de países desarrollados, incluyendo la Ajinomoto Company en Japón, y es de dos a tres veces más cara que la lisina que se sabe que es sumamente valiosa debido a su elevado precio de 5.000-6.000 dólares por tonelada en el mercado internacional. Por tanto, la L-treonina tiene un gran potencial de crecimiento en el mercado mundial.

La L-treonina se produce actualmente sólo mediante técnicas de fermentación microbiana, usando principalmente mutantes derivados de tipos naturales de microorganismos, incluyendo *Escherichia coli*, el género *Corynebacterium*, el género *Brevibacterium*, el género *Serratia* y el género *Providencia*. Los ejemplos de estos mutantes incluyen aquellos que tienen resistencia a análogos de aminoácido o fármacos, y sus auxótrofos para el ácido diamino-pimélico, metionina, lisina e isoleucina (publicación de patente japonesa n.º Heisei 2-219582; publicación de patente coreana n.º 2000-0013853, Appl. Microbiol. Biotechnol., 29:550-553, 1988). Sin embargo, tales cepas mutantes son desventajosas en cuanto a que presentan una baja productividad de L-treonina y que sólo se hacen crecer en medios complementados con los caros ácido diamino-pimélico o isoleucina debido a sus propiedades auxotróficas para el ácido diamino-pimélico o la isoleucina. Es decir, en el caso de usar un mutante que requiere ácido diamino-pimélico para su crecimiento, esta producción fermentativa de L-treonina requiere costes elevados. Asimismo, en el caso de usar un auxótrofo de isoleucina, el medio de fermentación para este auxótrofo debe complementarse con la cara isoleucina, dando como resultado un aumento de los costes de producción de la L-treonina.

Estos problemas pueden superarse usando un mutante parcial para isoleucina tal como se da a conocer en la publicación de patente coreana n.º 92-8365, que no necesita isoleucina en un medio y produce altos niveles de L-treonina con respecto a las cepas conocidas. Sin embargo, este método de mutación clásico requiere mucho tiempo y es ineficaz en la selección de cepas bacterianas novedosas que puedan producir altos niveles de L-treonina, y tiene la mayor desventaja de estar limitado en la mejora de la productividad de L-treonina.

A este respecto, en lugar de emplear los auxótrofos, se han desarrollado otros métodos para la producción masiva de L-treonina, que emplean microorganismos productores de L-treonina recombinantes que tienen un aumento de la actividad de enzimas que participan en la biosíntesis de L-treonina mediante técnicas de ingeniería metabólica. Es decir, se aíslan genes correspondientes a enzimas que están implicadas en el metabolismo de la L-treonina usando técnicas de recombinación genética, se clonan en vehículos genéticos apropiados y se introducen en mutantes microbianos para mejorar la productividad de L-treonina de los mutantes.

Los presentes inventores desarrollaron previamente un método de desarrollo de una cepa productora de L-treonina usando tales técnicas de ingeniería metabólica, tal como se da a conocer en la solicitud de patente coreana n.º 2001-6976. En detalle, pueden conseguirse altos rendimientos de L-treonina empleando un microorganismo recombinante, que tiene en el cromosoma una o más copias de un gen que codifica para fosfoenol piruvato carboxilasa (a continuación en el presente documento, denominado simplemente "*ppc*") que cataliza la formación de oxaloacetato (OAA) como precursor para la biosíntesis de L-treonina a partir de fosfoenol piruvato (PEP) y un operón que incluye genes que codifican para las tres enzimas que participan en la biosíntesis de L-treonina a partir de aspartato, aspartocinasa 1-homoserina deshidrogenasa (*thrA*), homoserina cinasa (*thrB*) y treonina sintasa (*thrC*).

La L-treonina se sintetiza a partir de aspartato mediante una ruta de múltiples etapas, en la que se forma el aspartato a partir de OAA convertido por PPC a partir PEP. La biosíntesis de L-treonina se inhibe cuando está presente glucosa en niveles relativamente altos en los medios en comparación con la tasa de crecimiento bacteriano y la tasa global del ciclo del TCA. En esta situación, se suprime la expresión del gen *ppc*, mientras que aumenta la expresión de un gen que codifica para PEP carboxicinas (a continuación en el presente documento, denominado simplemente "*pckA*") que cataliza la conversión de OAA en PEP. Los niveles elevados de *pckA* dan como resultado la formación de PEP a partir de OAA como precursor para la biosíntesis de aminoácidos, en la que se sintetizan otros subproductos a partir del PEP (Goldie H. Medina V., Mol. Gen. Genet., 220(2):191-196, 1990; Dang *et al.*, *E. coli* and Salmonella, 1:191-102, 1996). Por tanto, el gen *pckA* debe inactivarse esencialmente con el fin de producir L-treonina en altos niveles aumentando el flujo de rutas metabólicas responsables de la síntesis de L-treonina.

Por otro lado, se conocen varias rutas para la degradación de L-treonina, que incluyen las tres rutas siguientes. Una implica una ruta que la inicia la treonina deshidrogenasa produciendo α -amino- β -cetobutirato. El α -amino- β -cetobutirato o bien se convierte en acetil-CoA y glicina o bien se degrada espontáneamente para dar aminoacetona que se convierte en piruvato. La segunda ruta implica a la treonina deshidratasa que produce α -cetobutirato que se cataboliza adicionalmente para dar propionil-CoA y finalmente el intermedio del ciclo del TCA, succinil-CoA. La tercera ruta utiliza treonina aldolasa (Neidhardt F.C. *et al.* *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2ª ed. ASM press. Washington DC, págs. 369-370). Entre ellas, la treonina deshidratasa es un operón que se expresa con hipoxia y altos niveles de treonina. Los presentes inventores desarrollaron un microorganismo con productividad mejorada de L-treonina inactivando específicamente este gen del operón (*tdcBC*) mediante una técnica de recombinación genética (publicación de patente coreana n.º 2003-075902).

Por otro lado, la publicación de patente internacional n.º WO 02/29080 A2 da a conocer un método de producción de L-treonina usando un microorganismo con el gen *pckA* defectuoso, que se prepara introduciéndolo en una cepa de tipo natural del microorganismo, un vector recombinante que porta un gen *pckA* parcialmente deletado. Sin embargo, este microorganismo es problemático con respecto al rendimiento de producción de L-treonina porque las rutas para la degradación y el flujo de entrada intracelular de la L-treonina sintetizada están todavía activadas en el microorganismo.

La intensa y meticulosa investigación que condujo a la presente invención, llevada a cabo por los presentes inventores sobre métodos de preparación de un microorganismo que puede producir altos niveles de L-treonina incluso cuando se hace crecer en un medio que contiene altas concentraciones de glucosa y que no degrada la L-treonina producida, con el objetivo de resolver los problemas que se encontraban en la técnica anterior, dio como resultado el hallazgo de que, cuando se inactiva su gen *pckA* cromosómico mediante una técnica de recombinación genética, el microorganismo con el operón *tdcBC* desactivado desarrollado por los presentes inventores ha mejorado la productividad de L-treonina en comparación con los microorganismos productores de L-treonina convencionales.

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un microorganismo que puede producir eficazmente altos niveles de L-treonina.

Sumario de invención

Con el fin de lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona una cepa novedosa de *E. coli*, que contiene tanto el operón *tdcBC* como el gen *pckA* inactivados en el cromosoma.

En la cepa de *E. coli* con genes *pckA/tdcBC* inactivados, el gen *pckA* se inactiva introduciendo un fragmento del gen *pckA* foráneo que contiene un gen de resistencia a antibióticos y un sitio de unión a recombinasa específica de sitio en cada uno de sus dos extremos en una cepa de *E. coli* que contiene un operón asociado con la degradación de L-treonina, *tdcBC*, que está inactivado, y luego permitiendo la recombinación homóloga entre el fragmento del gen *pckA* foráneo y un gen *pckA* en el cromosoma para inactivar el gen *pckA* cromosómico.

Además, la presente invención proporciona un método de producción de L-treonina usando la cepa de *E. coli* con genes *pckA/tdcBC* inactivados.

Breve descripción de los dibujos

Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 es una vista esquemática que muestra un procedimiento de clonación de un gen *pckA*;

la figura 2 es una vista esquemática que muestra un procedimiento de preparación de un microorganismo recombinante en el que se introduce un fragmento de un gen *pckA* que contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) y sitios *loxP*, $\Delta pckA::loxPcat$; y

la figura 3 es una fotografía que muestra un resultado de una transferencia de tipo Southern, en la que se identifica un gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) que va a insertarse en un gen *pckA* en el cromosoma de una cepa de *E. coli* productora de L-treonina (carril 1: cepa recombinante seleccionada en presencia de cloranfenicol según la presente invención; carril 2: cepa original TRN212; y carril 3: marcador de tamaño).

Descripción detallada de la invención

Una cepa de *E. coli*, que contiene un operón asociado con la degradación de L-treonina específicamente inactivado mediante recombinación genética y que tiene productividad mejorada de L-treonina debido a la inactivación del operón, puede usarse como cepa original en la presente invención. Una cepa original preferida es una cepa de *E. coli* TRN212 (número de registro: KCCM-10353; publicación de patente coreana n.º 2003-075902), que la desarrollaron los presentes inventores.

La presente invención se caracteriza por preparar una cepa de *E. coli* novedosa que produce altos niveles y altos rendimientos de L-treonina inactivando el gen *pckA* implicado en la inhibición de la síntesis de L-treonina en una cepa de *E. coli* original que contiene un operón asociado con la degradación de L-treonina (*tdcBC*) inactivado. La inactivación de ambos genes *tdcBC* y *pckA* da como resultado que se evite la degradación y el flujo de entrada intracelular de L-treonina, mediados por productos de traducción del operón *tdcBC*, y la inhibición de la síntesis de L-treonina, mediante por un producto de traducción del gen *pckA*, lo que conduce a la producción en altos niveles de L-treonina.

Por tanto, la presente invención proporciona una cepa de *E. coli* con genes *pckA/tdcBC* inactivados, que se prepara introduciendo un fragmento del gen *pckA* foráneo que incluye un gen de resistencia a antibióticos que tiene un sitio de unión a recombinasa específica de sitio en cada uno de sus dos extremos en una cepa de *E. coli* que contiene un operón asociado con la degradación de L-treonina, *tdcBC*, que está inactivado, y luego permitiendo la recombinación homóloga entre el fragmento del gen *pckA* foráneo y un gen *pckA* en el cromosoma para inactivar el gen *pckA* cromosómico.

Además, el gen *pckA* en el cromosoma de la cepa de *E. coli* original se inactiva mediante la eliminación del gen de resistencia a antibióticos incorporado en el gen *pckA* cromosómico mediante la actividad de la recombinasa específica de sitio expresada en la cepa bacteriana, y la presencia de una copia de un sitio de unión de la recombinasa específica de sitio en el gen *pckA* cromosómico.

La inactivación del gen *pckA* en el cromosoma bacteriano se logra mediante la recombinación homóloga con un fragmento del gen *pckA* foráneo. El fragmento del gen *pckA* foráneo se inactiva mediante la inserción de un gen de resistencia a antibióticos en el mismo. Este fragmento del gen *pckA* inactivado foráneo se introduce en una cepa de *E. coli* original y entonces se permite que se produzca una doble recombinación cruzada entre un gen *pckA* en el cromosoma bacteriano y el fragmento del gen *pckA* inactivado foráneo para inactivar el gen *pckA* en el cromosoma bacteriano. La presencia del gen de resistencia a antibióticos en el gen *pckA* inactivado foráneo facilita la selección de células con el gen *pckA* inactivado.

Los ejemplos no limitantes del gen de resistencia a antibióticos usado en la inactivación del gen *pckA* incluyen el gen de resistencia a cloranfenicol, gen de resistencia a kanamicina, gen de resistencia a gentamicina y gen de resistencia a ampicilina.

Por otro lado, tras seleccionarse una cepa de *E. coli* con el gen *pckA* inactivado, se permite que se exprese una recombinasa específica de sitio para eliminar el gen de resistencia a antibióticos incorporado en el cromosoma bacteriano. Es decir, el gen de resistencia a antibióticos se incorpora en el gen *pckA* en el cromosoma bacteriano junto con sitios de unión a recombinasa específica de sitio y se elimina mediante la actividad de la recombinasa específica de sitio expresada en la cepa bacteriana. Los ejemplos no limitativos de la recombinasa específica de sitio incluyen sitios de unión de FLP, Cre y XerC/D. La eliminación del gen de resistencia a antibióticos permite que se use de nuevo el mismo gen de resistencia a antibióticos como marcador selectivo cuando va a desactivarse otro gen de la cepa bacteriana idéntica.

En la presente invención, con el fin de inactivar el gen *pckA* cromosómico, se usa un fragmento de un gen *pckA* que contiene un gen de resistencia a cloranfenicol, estando unido cada uno de sus extremos a un sitio loxP. El sitio loxP lo reconoce una recombinasa específica de sitio, Cre. Mediante la actividad de la recombinasa Cre expresada en la cepa de *E. coli*, el gen de resistencia a antibióticos ubicado entre los dos sitios loxP se elimina del cromosoma bacteriano.

La expresión de la recombinasa Cre en la cepa de *E. coli* puede lograrse mediante un método conocido en la técnica. En la presente invención, se introduce un plásmido que porta un gen *cre*, pJW 168, en la cepa de *E. coli* para expresar la enzima Cre en la misma.

En una realización de la presente invención, se amplificó un gen *pckA* parcial mediante PCR usando como molde ADN genómico aislado de una cepa de *E. coli* productora de L-treonina que incluía un operón *tdcBC* inactivado. El gen *pckA* parcial amplificado se clonó en un vector pT7Blue (Novagen Co.), produciendo así un vector recombinante que contenía un gen *pckA* parcial, pT7Blue/*pckA*. Además, se obtuvo un fragmento de ADN que contenía un gen de resistencia a cloranfenicol y sitios loxP, loxpcat2, a partir de un plásmido ploxpcat2 (Beatriz Palmeros *et al.*, Gene, 247:255-264, 2000), y se ligó en PT7Blue/*pckA* digerido con NruI, generando así un plásmido recombinante que contenía un fragmento de un gen *pckA* que incluía un gen de resistencia a cloranfenicol y sitios loxP, pT7Δ*pckA*::loxpcat. Por tanto, la presente invención proporciona el plásmido recombinante tal como se preparó anteriormente, pT7Δ*pckA*::loxpcat.

En otra realización de la presente invención, el fragmento del gen *pckA* que contenía un gen de resistencia a cloranfenicol, estando unido cada extremo del mismo a un sitio loxP, se introdujo en una cepa de *E. coli* TRN212 que contenía un operón *tdcBC* que se inactivó mediante recombinación homóloga usando un gen de resistencia a kanamicina que tenía un sitio loxP en cada uno de sus dos extremos. Entonces, se permitió que se produjera la recombinación homóloga entre un gen *pckA* en el cromosoma bacteriano y un fragmento del gen *pckA* foráneo que contenía el gen de resistencia a cloranfenicol y los sitios loxP, produciendo así una cepa de *E. coli* recombinante que contenía tanto un gen *tdcBC* como un gen *pckA* inactivados en el cromosoma. La cepa de *E. coli* recombinante se designó "FTR2717" y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el 20 de marzo de 2003 con el número de registro de KCCM-10475.

ES 2 338 555 T3

La cepa de *E. coli* FTR2717 recombinante muestra las siguientes características:

(1) presenta resistencia a análogos de treonina, análogos de lisina, análogos de isoleucina y análogos de metionina en comparación con un tipo natural de la misma;

(2) su cromosoma contiene un gen *ppc* endógeno y un operón de treonina endógeno que contiene los genes *thrA*, *thrB* y *thrC* así como una o más copias de un gen *ppc* exógeno y los genes *thrA*, *thrB* y *thrC* exógenos;

(3) incluye un gen del operón implicado en la degradación de L-treonina, *tdcBC*, que está inactivado; e

(4) incluye un gen *pckA* implicado en la inhibición de la síntesis de L-treonina, que está inactivado, de modo que produce altos niveles de L-treonina con una alta concentración de glucosa en un medio.

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero que no deben interpretarse como el límite de, la presente invención.

Ejemplo 1

Clonación del gen *pckA*

Se preparó un vector recombinante que portaba un gen *pckA* (véase la figura 1). En primer lugar, se aisló el ADN genómico bacteriano de una cepa de *E. coli* productora de L-treonina que incluía un operón *tdcBC* inactivado, TRN212 (número de registro: KCCM-10353), usando un sistema QIAGEN Genomic-tip (QIAGEN Co.). Usando el ADN genómico aislado como molde, se llevó a cabo la PCR para amplificar una región parcial de aproximadamente 1,5 kb de un gen *pckA*. En la PCR, se usó un conjunto de cebadores, que consiste en un cebador directo y un cebador inverso representados por las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Las condiciones de la PCR incluyeron 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 min. 30 s.

Se sometieron a electroforesis los productos de PCR en un gel de agarosa al 0,8% y se cortó una banda de 1,5 kb del gel. A partir de la banda cortada, se purificó un fragmento de ADN de 1,5 kb usando un kit DNA Gel Purification (QIAGEN Co.) y se clonó en un vector pT7Blue digerido con EcoRV (Novagen Co.) mediante ligamiento de extremos romos a 16°C, produciendo así un vector recombinante que contenía un gen *pckA* parcial, pT7Blue/*pckA*. Entonces, se transformó una cepa de *E. coli* NM522 con el pT7Blue/*pckA* y se extendió sobre un medio sólido (LB: 1% de NaCl, 1% de triptona, 0,5% de extracto de levaduras) que contenía ampicilina (100 mg/l), seguido por incubación a 37°C durante la noche. Se inocularon las colonias que se hicieron crecer sobre el medio sólido en 3 ml de un medio líquido que contenía ampicilina, seguido por incubación a 37°C durante la noche. Se aisló el ADN de plásmido de las bacterias en cultivo usando un kit QIAGEN mini prep (QIAGEN Co.) y se analizó para determinar su tamaño. Además, se analizó la orientación del gen *pckA* mediante mapeo de restricción con NruI y StuI. Después de eso, se digirió el ADN de plásmido con NruI y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. A partir del gel, se cortó una banda de aproximadamente 4,3 kb y se purificó un fragmento de 4,3 kb a partir de la banda.

Ejemplo 2

Construcción de un vector recombinante que porta un gen *pckA* inactivado y preparación de la cepa de *E. coli* con el gen *pckA* inactivado

2-1) Construcción de un vector recombinante que porta un gen *pckA* inactivado

Se obtuvo un fragmento de ADN de 1,2 kb, loxpcat2, que contenía un gen de resistencia a cloranfenicol que tenía un sitio loxP en cada uno de sus dos extremos, mediante digestión con HincII de un plásmido ploxpcat2 (plásmido que porta un gen de resistencia a cloranfenicol que tiene sitios loxP en sus dos extremos; Beatriz Palmeros *et al.*, Gene, 247:255-264, 2000, Profesor G. Gosset, Universidad de México). Se ligó el fragmento de ADN de 1,2 kb en el pT7Blue/*pckA* digerido con NruI preparado en el ejemplo 1 mediante ligamiento de extremos romos, produciendo así un vector recombinante de aproximadamente 5,7 kb que contenía un gen *pckA* inactivado, pT7Δ*pckA*::loxpcat (véase la figura 2).

2-2) Preparación de la cepa de *E. coli* con el gen *pckA* inactivado

Se introdujo el vector recombinante pT7Δ*pckA*::loxpcat, preparado en el ejemplo 2-1), en una cepa de *E. coli* NM522. Se extendió la cepa NM522 transformada sobre un medio sólido (LB: 1% de NaCl, 1% de triptona, 0,5% de extracto de levaduras) que contenía ampicilina y cloranfenicol, seguido por incubación a 37°C durante la noche. Se inocularon las colonias que se hicieron crecer sobre el medio sólido en 3 ml de un medio líquido que contenía ampicilina, seguido por incubación a 37°C durante la noche. Se aisló el ADN de plásmido de las bacterias en cultivo usando un kit QIAGEN mini prep y se analizó para determinar su tamaño y la orientación del gen *pckA* insertado. Después de eso, se digirió doblemente el ADN de plásmido con PstI y KpnI, y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. A partir del gel, se cortó una banda de 2,7 kb y se purificó un fragmento de 2,7 kb a partir de la banda.

ES 2 338 555 T3

Se introdujo el fragmento del gen *pckA* que contenía un gen de resistencia a cloranfenicol que tenía sitios loxP en sus dos extremos, $\Delta pckA::loxpcat$, en una cepa de *E. coli* productora de L-treonina, TRN212 (número de registro: KCCM-10353), mediante electroporación. Después de eso, se extendió la cepa TRN212 transformada sobre un medio sólido que contenía cloranfenicol para seleccionar sólo las células resistentes a cloranfenicol, dando como resultado una selección de células en las que se substituyó un gen *pckA* en el cromosoma por el fragmento del gen *pckA* foráneo ($\Delta pckA::loxpcat$). Se evaluaron los clones seleccionados para determinar si el gen *pckA* cromosómico está específicamente desactivado, mediante análisis de transferencia de tipo Southern según el mismo método que en el ejemplo experimental 1, a continuación.

Se transformaron los clones seleccionados, que se identificó que tenían un gen *pckA* específicamente desactivado en el cromosoma mediante análisis de transferencia de tipo Southern, con un plásmido pJW168 (donación del Prof. Guillermo Gosset de la Universidad de México) que contiene un gen *cre* que codifica para una recombinasa específica de sitio que reconoce sitios loxP. Se cultivaron las células transformadas en un medio de cultivo que contenía L-arabinosa 10 mM durante la noche para eliminar el gen de resistencia a cloranfenicol incorporado en el cromosoma bacteriano. Entonces, se diluyó el líquido de cultivo 10^7 veces y se extendió sobre un medio sólido de LB complementado con ampicilina (100 mg/l), seguido por incubación a 30°C durante la noche. Se inoculó cada una de las 100 colonias que se hicieron crecer sobre el medio sólido en 3 ml de cada medio líquido de LB que contenían o no ampicilina, seguido por incubación a 37°C durante la noche. Se determinaron las colonias que se destruían en el medio que contenía cloranfenicol pero que sobrevivieron en el medio que no contenía cloranfenicol. En esta selección, sólo se seleccionaron los clones que tenían una delección del gen de resistencia a cloranfenicol.

Ejemplo experimental 1

Evaluación de la desactivación del gen pckA en el cromosoma mediante transferencia de tipo Southern

Se cultivaron la cepa TRN212 como cepa original y uno de los clones resistentes a cloroanfenicol seleccionados en el ejemplo 2-2) durante la noche en 3 ml de un medio líquido que contenía cloranfenicol (15 mg/l). Entonces, se aisló el ADN genómico de las células en cultivo usando un kit genómico 20 de QIAGEN y se digirió con EcoRV durante la noche. Se separaron los fragmentos de ADN resultantes en un gel de agarosa al 0,7% dependiendo de su tamaño. Tras la electroforesis, se transfirieron los fragmentos de ADN separados sobre una membrana de nailon (membrana Biotodyne B, Young Sci.) durante la noche mediante transferencia capilar (Molecular Cloning, vol. 1., págs. 6.31-6.38). Se secó la membrana y luego se expuso a una luz UV (120 mJ/cm², SpectroLinker™) para inmovilizar los fragmentos de ADN sobre la membrana (Molecular Cloning, vol. 1., pág. 6.45). Se incubó la membrana resultante en una disolución de prehibridación I (Roche n.º 1093657) a 55°C durante 2 h y se hibridó con una sonda de ADN desnaturalizado durante la noche en un horno de hibridación (BAMBINO 230300) a 55°C.

Se preparó la sonda de ADN tal como sigue. En primer lugar, se aisló un plásmido ploxpcat2 usando un kit de QIAGEN y se digirió con HincII para producir un fragmento de ADN (de aproximadamente 1,2 kb) que contiene un gen de resistencia a cloranfenicol que tiene un sitio loxP en cada uno de sus dos extremos. Se llevó a ebullición el fragmento de 1,2 kb en agua durante 5 min. y se enfrió rápidamente en hielo, produciendo así un ADN monocatenario. Entonces se marcó el ADN monocatenario con DIG-UDP usando un kit de detección y marcaje de DIG (Roche n.º 1093657) mediante incubación a 37°C durante la noche.

Tras la hibridación, se lavó la membrana con las disoluciones de lavado I y II (Roche n.º 1093657) para eliminar las moléculas de ADN unidas de manera no específica. Se enmascaró la membrana lavada usando una disolución de prehibridación II (Roche n.º 1093657) a temperatura ambiente durante 30 min. y entonces se hizo reaccionar con un anticuerpo anti-DIG que se une específicamente a DIG-UTP a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavó la membrana con una disolución de lavado III (Roche n.º 1093657) para eliminar los anticuerpos anti-DIG unidos de manera no específica y se revelaron usando un kit de detección y marcaje (Roche n.º 1093657) a temperatura ambiente hasta que aparecieron bandas. Se facilitan los resultados en la figura 3.

Tal como se muestra en la figura 3, en el caso de la cepa original TRN212, no se detectó ninguna banda (carril 2) porque la cepa TRN212 no contenía un gen de resistencia a cloranfenicol. Por el contrario, el clon resistente a cloranfenicol seleccionado según la presente invención mostró una banda de aproximadamente 3,6 kb (carril 1). Estos resultados indican que los clones seleccionados contienen un gen de resistencia a cloranfenicol en su cromosoma.

Ejemplo 3

Comparación de los clones seleccionados por sus rendimientos de producción de L-treonina tras el cultivo en matraces Erlenmeyer

Entre los clones de *E. coli* recombinantes finalmente seleccionados del ejemplo 2-2) en los que se eliminó el gen de resistencia a cloranfenicol introducido, se evaluaron treinta clones para determinar su productividad de L-treonina. Se cultivó cada uno de ellos en un matraz Erlenmeyer que contenía un medio de cultivo preparado según la composición enumerada en la tabla 1, a continuación. Entonces, se evaluó cada líquido de cultivo para determinar los rendimientos de producción de L-treonina. Brevemente, tras hacerse crecer cada uno de los treinta clones sobre un medio sólido

ES 2 338 555 T3

de LB a 32°C, se inoculó un asa de una única colonia para cada clon en 25 ml del medio de cultivo y se cultivó a 32°C durante 48 h a 250 rpm. Tras haberse centrifugado cada uno de los líquidos de cultivo, se diluyó 250 veces el sobrenadante con agua destilada. Se midió la concentración de L-treonina en el sobrenadante diluido mediante HPLC. Se facilitan los resultados en la tabla 2, a continuación.

TABLA 1

Nutrientes	Cantidad por 1 l
Glucosa	70 g
Sulfato de amonio	28 g
KH_2PO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	5 mg
Carbonato de calcio	30 g
L-metionina	0,15 g
Extracto de levaduras	2 g
pH (7,0)	

TABLA 2

El número de clones	2	5	14	9
Rendimiento de producción de L-treonina (g/l)	20-23	23-24,5	24,5-26	>26

La cepa original TRN212 mostró un rendimiento de producción de L-treonina de 23 g/l. Entre los treinta clones sometidos a prueba, se encontró que veintiocho tenían una mejor productividad de L-treonina que la cepa TRN212, tal como se muestra en la tabla 2. En particular, nueve clones mostraron un rendimiento de producción de L-treonina superior a 26 g/l, lo que fue aproximadamente un 13,04% superior que el rendimiento de la cepa TRN212. Entre los treinta clones, se seleccionó un clon con el mayor rendimiento de L-treonina (más de 26 g/l) y se designó "FTR2717 (número de registro: KCCM-10475)".

Aplicabilidad industrial

Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, la presente invención proporciona un microorganismo con el gen *pckA* inactivado, que se prepara introduciendo un gen de resistencia a antibióticos en el ADN cromosómico de una cepa de *E. coli* original que produce altos niveles de L-treonina, es decir, una cepa de *E. coli* que contiene un operón *tdcBC* implicado en la degradación de L-treonina, que está inactivado, mediante una técnica de recombinación de ADN. Puesto que su operón *tdcBC* está inactivado, el microorganismo según la presente invención tiene el efecto de evitar la degradación y el flujo de entrada intracelular de L-treonina. Además, debido a la inactivación del gen *pckA* implicado en la inhibición de la síntesis de L-treonina, el microorganismo de la presente invención tiene rutas más activadas para la biosíntesis de L-treonina. Por tanto, el microorganismo de la presente invención es útil para la producción masiva de L-treonina debido a que puede producir L-treonina en altos niveles y altos rendimientos incluso en presencia de altas concentraciones de glucosa.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Escherichia coli* productora de L-treonina que comprende el operón *tdcBC* y el gen *pckA* que están
ambos inactivados.

2. Cepa de *Escherichia coli* según la reivindicación 1, en la que el gen *pckA* se inactiva introduciendo un gen
pckA inactivado en una cepa de *Escherichia coli* original que contiene un operón asociado a la degradación de L-
treonina, *tdcBC*, que está inactivado, en la que dicho gen *pckA* inactivado se prepara insertando un gen de resistencia
a antibióticos que tiene un sitio de unión a recombinasa específica de sitio en cada uno de los dos extremos del mismo
en un gen *pckA* y luego permitiendo la recombinación homóloga entre dicho gen *pckA* inactivado y el gen *pckA* en el
cromosoma para inactivar el gen *pckA* cromosómico.

3. Cepa de *Escherichia coli* según la reivindicación 2, en la que el gen *pckA* se inactiva mediante la eliminación del
gen de resistencia a antibióticos incorporado en el mismo mediante la actividad de la recombinasa específica de sitio
expresada en la cepa de *Escherichia coli* y la presencia de una copia del sitio de unión de la recombinasa específica de
sitio en el gen *pckA* cromosómico.

4. Cepa de *Escherichia coli* según la reivindicación 2, en la que la recombinasa específica de sitio es FLP, Cre o
XerC/D.

5. Cepa de *Escherichia coli* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la cepa es *Escherichia*
coli FTR2717 (KCCM-10475).

6. Método de producción de L-treonina usando la cepa de *Escherichia coli* según una cualquiera de las reivindica-
ciones 1 a 5.

7. Plásmido recombinante pT7ΔpckA::loxpcat, preparándose el plásmido recombinante mediante la clonación de
un gen *pckA* parcial de 1,5 kb en un vector pT7Blue para producir un pT7Blue/pckA, obteniéndose un fragmento de
ADN que contiene un gen de resistencia a cloranfenicol y sitios loxP, loxpcat2, y el ligamiento del fragmento de ADN
de loxpcat2 en el plásmido pT7Blue/pckA digerido con NruI.

FIG. 1

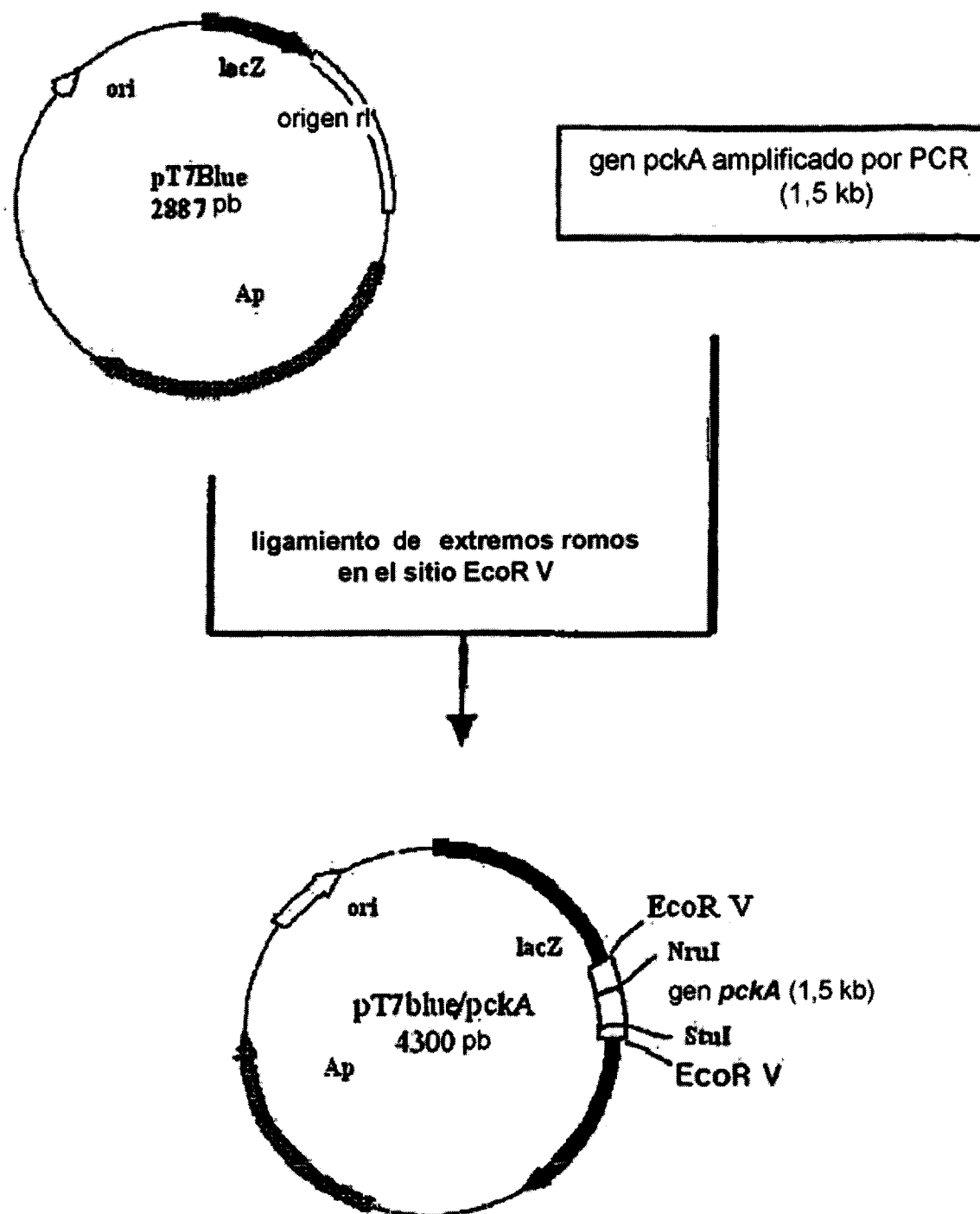


FIG. 2

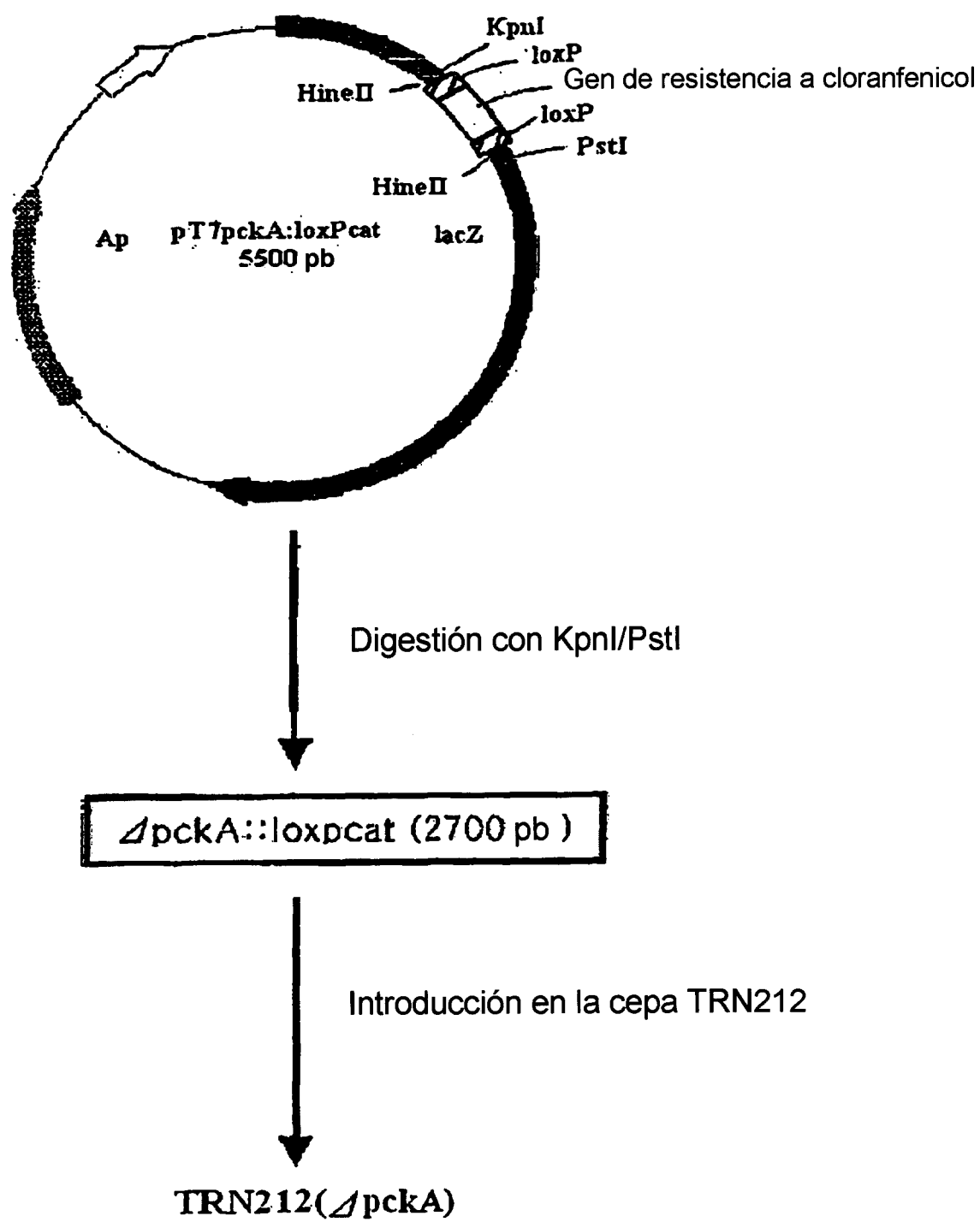
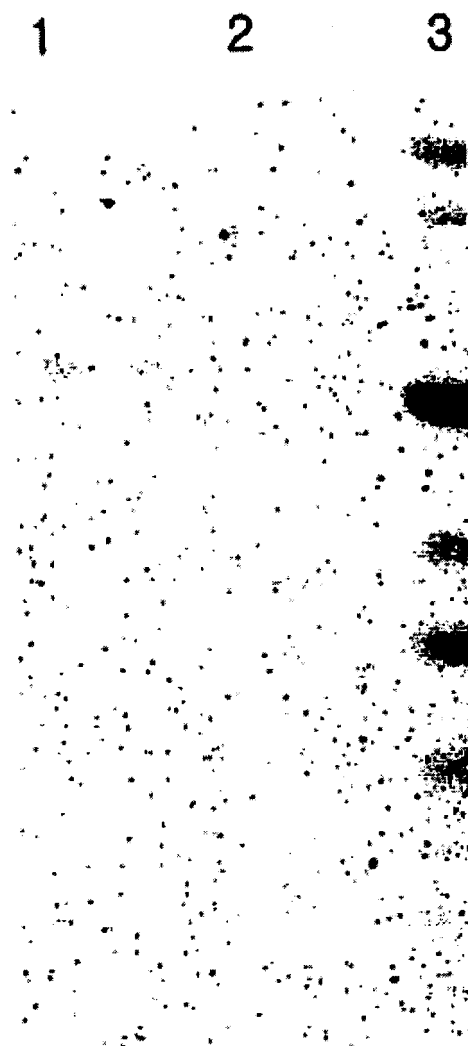


FIG. 3



ES 2 338 555 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CJ Corp.	
5	<120> MICROORGANISMO CON GENES <i>pckA/tdcBC</i> INACTIVADOS y MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE L-TREONINA USANDO EL MISMO	
	<150> Documento KR10-2003-0021458	
10	<151> 04-04-2003	
	<160> 2	
15	<170> KopatentIn 1.71	
	<210> 1	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Cebador directo para PCR	
	<400> 1	
30	gttaacacccc ccaaaaagac	20
	<210> 2	
	<211> 21	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador inverso para PCR	
	<400> 2	
45	gataaagagt tcgcagttcg t	21
50		
55		
60		
65		