



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(51) Int Cl⁷

(11) 320044

C 12 P 13/08, C 12 N 15/52, 15/70, 1/21, 15/90

(13) B1

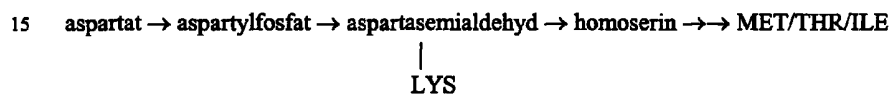
Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19990362	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1997.07.30 PCT/US97/13359
(22)	Inng.dag	1999.01.26	(85)	Videreføringsdag	1999.01.26
(24)	Løpedag	1997.07.30	(30)	Prioritet	1996.07.30, US, 22407
(41)	Alm.tilgj	1999.01.26			
(45)	Meddelt	2005.10.17			
(83)	Biol.mat. dep	Agricultural Research Service Culture Kollektion nr. NRRL B-21593			
(73)	Innehaver	Archer-Daniels-Midland Co, 4666 Faries Parkway, IL62526 DECATUR, US			
(72)	Oppfinner	Ming-Der Wang, San Diego, CA, US Thomas P Binder, 2323 West Packard Street, IL62522 DECATUR, US Jill S. Bradshaw, Decatur, IL, US Stacia L. Swisher, Decatur, IL, US Hungming James Liaw, Champaign, IL, US Paul D Hanke, 2622 Wadsworth Lane, IL61802 URBANA, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			
(54)	Benevnelse	Nye stammer av Echerichia coli, metoder for fremstilling og bruk av disse i fermenteringsprosesser for produksjon av L-treonin			
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1-593792 EP-A1-685555 TW-A-258753			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse vedrører nye stammer av Escherichia coli og fermenteringsfremgangsmåter som involverer disse mikroorganismene. Mer spesifikt vedrører foreliggende oppfinnelse genetisk modifiserte Eshcerichia coli-stammer og bruken derav for produksjon av aminosyrer, spesielt medlemmer av aspartatfamilien av aminosyrer, slik som treonin. Foreliggende oppfinnelse vedrører også metoder for preparering av E. colistammer for bruk i fermenteringsproduksjonen av aminosyrer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører nye stammer av *Escherichia coli* og fermenteringsprosesser som involverer disse mikroorganismene. Mer spesielt vedrører foreliggende oppfinnelse genetisk modifiserte *Escherichia coli*-stammer og bruken derav for produksjon av aminosyrer, spesielt medlemmer av aspartatfamilien av aminosyrer, slik som treonin. Foreliggende oppfinnelse vedrører også metoder for fremstilling av *E. coli*-stammer for bruk i fermenteringsproduksjon av aminosyrer.

I *Escherichia coli* avledes aminosyrene L-treonin, L-isoleucin, L-lysin og L-metionin alle, eller deler av, deres karbonatomer fra aspartat (aspartatsyre) via følgende, vanlige biosyntetiske reaksjonsvei (G.N. Cohen, "The common pathway to lysine, methionine and threonine", s. 147-171 i *Amino Acids: Biosynthesis og Genetic Regulation*, K.M. Herrmann og R.L. Somerville, red., Addison-Wesley Publishing Co., Inc., Reading, Mass, (1983)):



Den første reaksjonen i denne vanlige reaksjonsveien blir katalysert av én av tre spesifikke aspartatkinaser (AK I, II eller III), som hver blir kodet for av et separat gen og er forskjellige fra hverandre på den måten deres aktivitet og syntese er regulert.

Aspartatkinase I, for eksempel, blir kodet for av *thrA*, dets aktivitet blir inhibert ved treonin, og dens syntese blir repressert ved treonin og isoleucin i kombinasjon. AK II blir imidlertid kodet for av *metL*, og dens syntese repressert ved metionin (skjønt dens aktivitet ikke blir inhibert av metionin eller ved parkombinasjoner av metionin, lysin, treonin og isoleucin (F. Falcoz-Kelly *et al.*, *Eur. J. Biochem*, 8:146-152 (1969); J.C. Patte *et al.*, *Biochim, Biophys. Acta* 136:245-257 (1967))). AK III blir kodet for av *lysC*, og dets aktivitet og syntese blir inhibert og repressert, respektivt av lysin.

To av AK, I og II, er ikke distinkte proteiner, men heller et domene av et komplekst enzym som inkluderer homoserindehydrogenase I eller II, hvor hver katalyserer reduksjonen av aspartatsemialdehyd til homoserin (P. Truffa-Bachi *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 5:73-80 (1968)). Homoserindehydrogenase I blir derfor også kodet for av *thrA*, dens syntese blir repressert ved treonin pluss isoleucin, og dens aktivitet blir inhibert ved treonin. HD II blir samtidig kodet for av *metL* og dens syntese blir repressert av metionin.

Treoninbiosyntese inkluderer de følgende ytterligere reaksjoner:

Homoserin → homoserinfosfat → treonin. Fosforyleringen av homoserin blir katalysert ved homoserinkinase, et protein som består av to identiske 29 kDa subenheter som kodes for av *thrB*, og hvis aktivitet blir inhibert ved treonin (B. Burr *et al.*, *J. Biochem.* 62:519-526 (1976)). Slutt-trinnet, den komplekse endringen av homoserinfosfat til L-treonin, blir katalysert ved treoninsyntase, et 47 kDa protein som kodes for av *thrC* (C. Parsot *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 11:7331-7345 (1983)).

thrA-, *thrB*- og *thrC*-genene hører alle til *thr*-operonet, et enkelt operon plassert ved 0 minutter på det genetiske kartet av *E. coli* (J. Thèze og I. Saint-Girons, *J. Bacteriol.* 118:990-998 (1974); J. Thèze *et al.*, *J. Bacteriol.* 117:133-143 (1974)). Disse genene koder for aspartatkinase-I homoserindehydrogenase I, homoserinkinase og treoninsyntase. Biosyntese av disse enzymene utsettes for flerverdig repressjon ved treonin og isoleucin (M. Freundlich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10:277-282 (1963)).

En regulatorisk region er funnet oppstrøms for det første strukturelle genet i *thr*-operonet, og dens sekvens har blitt bestemt (J.F. Gardner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1706-1710 (1979)). *thr*-attenuatoren, nedstrøms for transkripsjonsinitieringssetet, inneholder en sekvens som koder for et lederpeptid; denne sekvensen inkluderer åtte treoninkodoner og fire isoleucinkodoner. *thr*-attenuatoren inneholder også de klassisk gjensidige utelukkende sekundærstrukturene som tillater eller forhindrer RNA-polymerasetranskripsjon av de strukturelle genene i *thr*-operonet, avhengig av nivåene av ladet treonyl- og isoleucyl-tRNA.

På grunn av problemene forbundet med å oppnå høye nivåer av aminosyreproduksjon via naturlig biosyntese (f.eks. repressjon av *thr*-operon av det ønskede produktet), er det blitt produsert bakterielle stammer med plasmider som inneholder et *thr*-operon med et *thrA*-gen som koder for et feedback-resistent enzym. Med slike plasmider har L-treonin blitt produsert i en industriell skala ved fermenteringsprosesser som tar i bruk et stort antall forskjellige mikroorganismer, slike som *Brevibacterium flavum*, *Serratia marcescens* og *Escherichia coli*.

E. coli-stammen BKIIM B-3996 (Debabov *et al.*, U.S. patent nr. 5.175.107), som inneholder plasmidet pVIC40, produserer for eksempel ca. 85 g/l på 36 timer. Verten er, på grunn av en defekt treoninsyntase, en treoninavhengig stamme. I BKIIM B-3996 er det det rekombinante plasmidet, pVIC40, som tilveiebringer de avgjørende enzymatiske aktivitetene, f.eks. en feedback-resistent AK I-HD I, homoserinkinase og treoninsyntase,

som behøves for treoninbiosyntese. Dette plasmidet komplementerer også vertens treoninauxotrofi.

E. coli-stamme 29-4 (E. Shimizu *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1095-1098 (1995))
 5 er et annet eksempel på en rekombinant *E. coli*-treoninprodusent. Stamme 29-4 ble konstruert ved å klonere *thr*-operonet fra en treoninoverproduserende mutant stamme, *E. coli* K-12 (BIM-4) (avledet fra *E. coli*-stammen ATCC 21277), inn i plasmid pBR322, som deretter ble introdusert inn i foreldrestammen (K. Wiwa *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* 47:2329-2334 (1983)). Stamme 29-4 produserer omtrent 65 g/l L-treonin på 72 timer.

10

Lignende konstruerte rekombinante stammer har blitt laget ved å bruke andre organismer. *S. marcescens*-stammen T2000 inneholder for eksempel et plasmid som har et *thr*-operon som koder for et feedback-resistent *thrA*-genprodukt og produserer omtrent 100 g/l treonin på 96 timer (M. Masuda *et al.*, *Applied Biochemistry and Biotechnology*
 15 37:255-262 (1992)). Alle disse stammene inneholder plasmider som har flere kopier av genene som koder for de treoninbiosyntetiske enzymene som tillater overekspresjon av disse enzymene. Denne overekspresjonen av plasmidbårne gener som koder for treoninbiosyntetiske enzymer, spesielt et *thrA*-gen som koder for et feedback-resistent AK I-HD I, gjør disse stammene i stand til å produsere store mengder av treonin. Andre eksempler på mikroorganismer med stammer som inneholder plasmider, er beskrevet for
 20 eksempel i U.S. patentene nr. 4.321.325; 4.347.318; 4.371.615; 4.601.983; 4.757.009; 4.945.058; 4.946.781; 4.980.285; 5.153.123 og 5.236.

Stammer som inneholder plasmider, har imidlertid problemer som begrenser deres bruk
 25 for kommersiell fermenteringsproduksjon av aminosyrer. Et betydelig problem med disse stammene er for eksempel å sikre at stammen som inneholder plasmider, opprettholder helheten gjennom fermenteringsprosessen, på grunn av mulig tap av plasmidet gjennom cellevekst og deling. For å unngå dette problemet, er det nødvendig å selektivt eliminere plasmidfrie celler gjennom dyrkingen, slik som ved å ta i bruk antibiotikaresistensgener på plasmidet. Denne løsningen nødvendiggjør imidlertid tilsetning
 30 av ett eller flere antibiotika til fermenteringsmediumet, noe som ikke er kommersielt praktiserbart for fermenteringer i stor skala.

Et annet betydelig problem med stammer som inneholder plasmider, er plasmidstabilitet.
 35 Høy ekspresjon av enzymer, hvis gener blir kodet på plasmidet, som er nødvendig for kommersielt praktiske fermenteringsprosesser, frembringer ofte plasmidinstabilitet (E. Shimizu *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1095-1098 (1995)). Plasmidstabilitet er

også avhengig av slike faktorer som dyrkingstemperatur og nivået av oppløst oksygen i kulturmediumet. Stamme 29-4 som inneholder plasmider, var for eksempel mer stabil ved lavere dyrkingstemperaturer (30°C vs. 37°C) og høyere nivåer av oppløst oksygen. (E. Shimizu *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 59:1095-1098 (1995)).

5

Mikroorganismer som ikke inneholder plasmider, har også blitt brukt som treoninprodusenter, selv om de er mindre effektive enn de som er beskrevet ovenfor. Stammer fra *E. coli*, slike som H-8460, som er fremskaffet ved en serie av konvensjonelle mutageneser og seleksjon for resistens mot flere metabolske analoger, lager omtrent 75 g/l av L-treonin på 70 timer (Kino *et al.*, U.S. patent nr. 5.474.918). Stamme H-8460 bærer ikke et rekombinant plasmid og har én kopi av treoninbiosyntesegenet på kromosomet. Den lavere produktiviteten fra denne stammen sammenlignet med de plasmidbærende stammene, slike som BKIIM B-3996, tror man skyldes lavere enzymatiske aktiviteter (spesielt de som er kodet for av *thr*-operonet), da disse stammene som ikke inneholder plasmider bærer bare en enkelt kopi av treoninbiosyntesegenet. Andre eksempler på passende mikroorganismer som ikke inneholder plasmider, er for eksempel beskrevet i U.S. patentene nr. 5.376.538; 5.342.766; 5.264.353; 5.217.883; 5.188.949; 5.164.307; 5.098.835; 5.087.566; 5.077.207; 5.019.503; 5.017.483; 4.996.147; 4.463.094; 4.452.890; 3.732.144; 3.711.375; 3.684.654; 3.684.653; 3.647.628; 3.622.453; 3.582.471; 3.580.810; 3.984.830 og 3.375.173.

20

I stammer av *E. coli* som både inneholder plasmider og som ikke inneholder plasmider, er *thr*-operonet kontrollert ved den spesifikke stammens respektive naturlige treoninpromoter. Som beskrevet ovenfor, er ekspresjonen av den naturlige promoter regulert ved en attenueringsmekanisme kontrollert av en region på DNA som koder for et lederpeptid og inneholder et antall av treonin- og isoleucinkodoner. Denne regionen er translert ved et ribosom som fornekter nivåene av treoninyl-tRNA og isoleucinyl-tRNA. Når disse nivåene er tilstrekkelige for at lederpeptidet skal bli translert, blir transkripsjonen for tidlig terminert, men når nivåene er utilstrekkelige for at lederpeptidet skal bli translert, blir ikke transkripsjonen terminert, og hele operonet blir transkribert, som, etter følgende translasjon, resulterer i øket produksjon av treoninbiosyntetiske enzymer. Skjønt, når treoninyl-tRNA- og/eller isoleucinyl-tRNA-nivåene er lave, er *thr*-operonet maksimalt transkribert, og de treoninbiosyntetiske enzymene blir maksimalt produsert.

35

I den *E. coli*-treoninproduserende stammen BKIIM B-3996, er treoninoperonet i plasmidet kontrollert ved dets naturlige promoter. Som et resultat er *thr*-operonet maksimalt

uttrykt når stammen sultes for treonin og/eller isoleucin. Siden sulting for treonin ikke er mulig i en treoninproduserende stamme, har disse stammene blitt gjort auxotrofe for isoleucin for å oppnå et høyere nivå av enzymaktivitet.

- 5 En annen måte å overkomme attenueringskontroll på, er å senke nivået (nivåene) av treonyl-tRNA og/eller isoleucinyt-tRNA i cellen. En *thrS*-mutant har for eksempel en treonyl-tRNA-syntase som utviser en 200 gangers økning i en synlig affinitet for treonin, som resulterer i overekspressjon av *thr*-operon, antagelig på grunn av det lave nivået av treonyl-tRNA (E.J. Johnson *et al.*, *J. Bacteriol.* 129:66-70 (1977)).

10

I fermenteringsprosesser som bruker disse stammene, må cellene imidlertid tilsettes isoleucin i vekststadiet på grunn av deres defekt i isoleucinbiosyntesen. Deretter, i produksjonsstadiet, er cellene frarøvet isoleucin for å indusere ekspressjon av treoninbiosyntese-enzym. En stor ulempe er derfor å bruke native treoninpromotere for å kontrollere eks-

15

Antibiotikumet borrelidin er også kjent for å redusere den enzymatiske aktiviteten hos treonyl tRNA-syntetase, og derved inhibere veksten av *E. coli* (G. Nass *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 34:84 (1989)). I lys av denne reduserte aktiviteten, har visse

20 borrelidinsensitive stammer av *E. coli* blitt tatt i bruk for å produsere høye nivåer av treonin (Japanese Published Patent Application nr. 6752/76; U.S. patent nr. 5.264.353). Tilsetting av borrelidin til kulturen ble funnet å øke utkommet av L-treonin. Borrelidinsensitive stammer av *Brevibacterium* og *Corynebacterium* har også blitt brukt til å produsere høye nivåer av treonin (Japanesse Patent nr. 53-101591).

25

- Borrelidinresistente mutanter av *E. coli* uttrykker samtidig endringer i treonyl tRNA-syntetaseaktiviteten. Mer spesifikt har borrelidinresistent *E. coli* blitt vist å utvise ett av de følgende trekkene: (i) Vesentlig økning i nivåer av vildtype-treonyl-tRNA-syntetase; (ii) strukturelt endret treonyl tRNA-syntetase; eller (iii) noen ukjente cellulære endringer
- 30 som antagelig skyldes en membranforandring (G. Nass og J. Thomale, *FEBS Lett.* 39:182-186 (1974)). Ingen av disse mutante stammene har imidlertid blitt brukt for fermenteringsproduksjon av L-treonin.

35

EP-AI-685555, EP-AI-593792 og TW-A-258753 beskriver fremgangsmåter for å fremstille en aminosyre. Disse omfatter innføring av en ikke-nativ promoter i tillegg til den native promoter, og omfatter ikke at den native promoter erstattes av en ikke-nativ promoter.

I lys av diskusjonen ovenfor, gjenstår det et behov innen fagfeltet for mikroorganisme-stammer som effektivt produserer aminosyrer slik som treonin, men uten problemene assosiert med tilstanden i dag.

- 5 Det er derfor en hensikt ifølge oppfinnelsen å tilveiebringe mikroorganismer som effektivt produserer L-treonin med høyt utbytte, men som ikke krever rekombinante plasmider som inneholder gener som koder for treoninbiosyntetiske enzymer, og det er å foretrekke at de ikke har noen aminosyrenæringsbehov.
- 10 En annen hensikt er at særtrekk og fordeler ifølge oppfinnelsen vil bli utført i detaljert beskrivelse av foretrukne utførelsesformer som følger, og delvis være tydelig fra beskrivelsen eller tilegnet ved praksis ifølge oppfinnelsen. Disse hensikter og fordeler ifølge oppfinnelsen vil bli realisert og nådd ved metoder spesielt utpekt i beskrivelsen og kravene derav.

15

Foreliggende oppfinnelse angår således en fremgangsmåte for å produsere L-treonin, kjennetegnet ved trinnene:

- (a) dyrking av en stamme av *E. coli* i et medium; og
- (b) gjenvinne L-treonin som er produsert av nevnte *E. coli*;
- 20 hvori nevnte stamme av *E. coli*:
 - (i) inneholder på kromosomet minst ett treonin (*thr*) operon, funksjonsdyktig koblet med minst én ikke-naturlig promoter som erstatter den native promoter via innføring i nevnte kromosom; og
 - (ii) som ikke har krav noen til rekombinante plasmider som inneholder én eller flere
- 25 gener som koder for én eller flere treonin-biosynteseenzymer for å produsere treonin.

- Foreliggende oppfinnelse angår videre en metode for å produsere en aminosyreproduserende stamme fra *E. coli* som ikke bærer rekombinante plasmider som
- 30 koder for én eller flere biosyntetiske enzymer for nevnte aminosyre, kjennetegnet ved at den inneholder trinnene:

- (a) Introduksjon av genetisk materiale fra en aminosyreproduserende mikroorganisme inn i kromosomet til en *E. coli*-stamme;
- (b) innsetting av en ikke-naturlig promoter inn i nevnte kromosom før kromosom
- 35 lokaliseringen av og i en funksjonsdyktig kobling med aminosyrebiosyntese-gener for kontroll av ekspresjon derav der nevnte ikke-naturlige promoter erstatter den native promoter; og

- (c) valgfritt å fjerne regulatoriske hindringer for og/eller næringsmessige krav for aminosyrebiosyntese fra nevnte kromosom.

Foreliggende oppfinnelse angår videre en stamme fra mikroorganismen *E. coli*,

5 kjennetegnet ved at den har følgende karakteristikk:

- (i) Dens kromosom inneholder minst ett treonin (*thr*) operon, funksjonsdyktig koblet med minst én ikke-naturlig promoter som erstatter den native promoter via innføyelse i nevnte kromosom; og
- (ii) den krever ingen rekombinante plasmider som inneholder ett eller flere gener
10 som koder for ett eller flere av treoninbiosyntese-enzymene for å produsere treonin; og
- (iii) den produserer L-treonin.

En utførelsesform ifølge oppfinnelse er rettet mot en prosess for å produsere aminosyrer
15 slike som L-treonin, som omfatter trinnene å dyrke en stamme av *E. coli* i et medium og gjenvinne aminosyren fra mediumet, hvori *E. coli*-stammen er resistent mot borrelidin.

Det er å bli forstått som at både foregående generelle beskrivelse og den følgende detaljerte beskrivelsen kun skal tjene som eksempler og forklaringer, og har til formål å
20 tilveiebringe videre forklaring på foreliggende oppfinnelse ifølge kravene.

Kort beskrivelse av tegningene

Figur 1 avbilder konstruksjonen av plasmid pAD103 fra Kohara's lambda 676 og plasmid pUC19.

25

Figur 2 avbilder konstruksjonen av plasmid pAD106 fra plasmid pAD103 og plasmid pUC4k.

Figur 3 avbilder konstruksjonen av plasmid pAD115 fra plasmid pAD103 og plasmid pkk223-3.
30

Figur 4 avbilder konstruksjonen av plasmid pAD123 fra plasmid pAD115 og plasmid pAD106.

35 Figur 5 avbilder integrasjonen av promoter-regionen fra plasmid pAD123 inn i *E. coli*-kromosomet.

I en første utførelsesform er foreliggende oppfinnelse rettet mot nye bakteriestammer som kan bli brukt i fermenteringsprosesser for produksjonen av aminosyrer. De nye bakteriestammene i foreliggende oppfinnelse, har de følgende kjennetegn:

- 5 (i) Cellene inneholder minst ett *thr*-operon, dvs. minst ett sett av gener som koder for treoninbiosyntese-enzymene på kromosomet under kontroll av en ikke-naturlig promoter, og
- (ii) cellene krever ingen rekombinante plasmider kodende for treoninbiosyntese-
10 enzymer for å produsere treonin.

Det er å foretrekke at stammene ifølge oppfinnelsen har evnen til å produsere minst ca. 50 g/l L-treonin på ca. 30 timer, mer foretrukket minst ca. 70 g/l i ca. 30 timer, og enda mer foretrukket minst ca. 80 g/l på ca. 30 timer og mest foretrukket minst ca. 90 g/l på
15 ca. 30 timer. Det er å foretrekke at stammene ifølge oppfinnelsen har evnen til å produsere minst ca. 90 g/l på ca. 48 timer, mer foretrukket minst ca. 100 g/l på ca. 48 timer og mest foretrukket minst ca. 110 g/l treonin på ca. 48 timer.

Det er å foretrekke at stammene ifølge oppfinnelsen har evnen til å produsere L-treonin
20 ved en hastighet på minst ca. 2 g/l/t, mer foretrukket minst ca. 2,5 g/l/t, ytterligere mer foretrukket minst ca. 3 g/l/t og mest foretrukket minst ca. 3,6 g/l/t.

I en spesielt foretrukket utførelsesform har de nye bakteriestammene ingen aminosyrenæringsbehov for fermenteringsproduksjon av treonin, dvs. cellene har ikke behov for
25 aminosyresupplementer for vekst og treoninproduksjon.

Bakteriestammen ifølge oppfinnelsen trenger ingen rekombinante plasmider som inneholder ett eller flere gener som koder for treoninbiosyntese-enzymene for treoninproduksjon, dvs. stammen er i stand til å produsere treonin uten behovet for én
30 eller flere av treoninbiosyntese-enzymene som kodes for av gener på et rekombinant plasmid. Stammene ifølge oppfinnelsen kan selvfølgelig valgfritt inneholde ett eller flere rekombinante plasmider hvis ønskelig. For eksempel, mens slike plasmider ikke er ønsket for treoninproduksjon, kan stammene ifølge oppfinnelsen allikevel inneholde rekombinante plasmider som koder for treoninbiosyntese-enzymene for å øke treoninpro-
35 duksjon. Stammene ifølge oppfinnelsen kan på samme måte inneholde rekombinante plasmider kodene for andre enzymer involvert i treoninbiosyntesen, slike som aspartat-semialdehyd-dehydrogenase (*asd*).

Det er å foretrekke at bakteriestammene ifølge oppfinnelsen er stammer fra *Escherichia coli*. Mer foretrukket er bakteriestammene ifølge foreliggende stammer av *E. coli* som uttrykker resistens mot det makrolide antibiotiske borrelidinet. Et spesielt foretrukket eksempel på bakteriestammene ifølge oppfinnelsen, er *E. coli*-stamme kat-13, som ble deponert ved the Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, 28. juni 1996 og tildelt tiltredelsesnummer NRRL B-21593.

10 Treonin (*thr*) operonet på kromosomet i cellene fra bakteriestammene ifølge oppfinnelsen, koder for enzymer nødvendige for treoninbiosyntese. Det er å foretrekke at treoninoperonet består av et AK-HD-gen (*thrA* eller *metL*), et homoserinkinasegen (*thrB*), og et treoninsyntasegen (*thrC*). Mer foretrukket er det at *thr*-operonet består av *thrA* (AK I-HD I-genet), *thrB* og *thrC*. Passende *thr*-operoner kan bli ervervet for eksempel fra *E. coli* stamme ATCC 21277 og stamme ATCC 21530. *thr*-operonet fra 15 stamme ATCC 21277 er spesielt foretrukket. Flere kopier av *thr*-operonet kan være tilstede på kromosomet.

Det er å foretrekke at *thr*-operonet inneholder minst ett ikke-attenuert gen, dvs. at ekspresjon av genet ikke er suppressert av nivåene (ekstra- og/eller intracellulære) av én eller flere av de treoninbiosyntetiske enzymene og/eller produktene derav (f.eks. treonin og isoleucin). Stammen ifølge oppfinnelsen kan også inneholde et *thr*-operon som inneholder en defekt *thr*-attenuator (regulatorisk region nedstrøms for transkripsjonsinitieringssetet og oppstrøms for det første strukturelle genet) eller et *thr*-operon som helt 25 mangler *thr*-attenuatoren.

I en spesielt foretrukket utførelsesform ifølge oppfinnelsen, koder *thr*-operonet for ett eller flere feedback-resistente treoninbiosyntetiske enzymer, dvs. aktiviteten til enzymet er ikke inhibert ved ekstra- og/eller intracellulære nivåer av intermediater og produkter av treoninbiosyntese. Mest foretrukket er det at *thr*-operonet inneholder et gen som 30 koder for et feedback-resistent AK-HD, slik som et feedback-resistent AK I-HD I. Bruk av et feedback-resistent AK-HD tilveiebringer et høyere nivå av enzymatisk aktivitet av treoninbiosyntese, selv ved tilstedeværelse av det produserte L-treoninet.

35 Ekspresjon av treoninoperonet(ene) i stammene ifølge oppfinnelsen, er kontrollert av en ikke-naturlig promoter, dvs. en promoter som ikke kontrollerer ekspresjonen av *thr*-operonet i *E. coli*-bakterielle stammer som normalt finnes i naturen. Ved å erstatte den

naturlige promoteren hos de treoninbiosyntetiske enzymene med en sterk ikke-naturlig promoter for å kontrollere ekspresjonen av *thr*-operonet, resulterer dette i høyere treoninproduksjon til og med en enkel, genomisk kopi av *thr*-operonet. I tillegg, siden en ikke-naturlig promoter blir brukt for å kontrollere ekspresjonen av treoninoperonet, er det ikke nødvendig å gjøre bakteriestammene auxotrofe for isoleucin for å oppnå denne høyere treoninproduksjonen. Illustrative eksempler på passende promoter inkluderer, men er ikke begrenset til: *lac*-promoter; *trp*-promoter; P_L -promoter fra λ bakteriofag; P_R -promoter, *lpp*-promoter; og *tac*-promoter. Spesielt foretrukket for bruk i de bakterielle stammene ifølge oppfinnelsen, er *tac*-promoter.

10

I tillegg til treoninoperonet, inneholder kromosomet i cellene hos de bakterielle stammene ifølge oppfinnelsen, fortrinnsvis også minst ett gen kodende for asparatatsesialdehyd-dehydrogenase (*asd*). Mest foretrukket er det at kromosomet i cellene ifølge oppfinnelsen inneholder minst ett *asd*-gen, minst ett *thrA*-gen, minst ett *thrB*-gen og minst ett *thrC*-gen. Kromosomet kan selvfølgelig inneholde flere kopier av ett eller flere av disse genene.

Treonindehydrogenase (*tdh*) katalyserer oksydasjonen av L-treonin til α -amino- β -ketobutyrat. I overensstemmelse med en spesielt foretrukket utførelsesform, inneholder kromosomet hos cellene ifølge oppfinnelsen, videre minst ett defekt treonindehydrogenase (*tdh*)gen. Det defekte *tdh*-genet kan være et gen som har et redusert nivå av ekspresjon av treonindehydrogenase eller et gen som koder for en treonindehydrogenasemutant som har redusert enzymatisk aktivitet relativ til den naturlige treonindehydrogenasen. Det er å foretrekke at det defekte *tdh*-genet, tatt i bruk i stammen ifølge oppfinnelsen, ikke ekspresserer treonindehydrogenase. Illustrative eksempler på passende *tdh*-gener som ikke ekspresserer treonindehydrogenase, inkluderer et *tdh*-gen som har et kloramfenikol-acetyltransferase (*cat*) gen innsatt eller et *tdh*-gen som har et transposon Tn5 innsatt, som beskrevet i U.S. patent nr. 5.175.107.

Bakteriestammene ifølge oppfinnelsen, kan fremstilles ved enhver av metodene og teknikkene kjent og tilgjengelig for de som kjenner fagfeltet. Illustrative eksempler på passende metoder for konstruksjon av bakteriestammene ifølge oppfinnelsen, inkluderer mutagenese ved å bruke passende midler slik som NTG; genintegrasjonsteknikker, formidlet ved transformering av lineære DNA-fragmenter og homolog rekombinasjon; og transduksjon formidlet av bakteriofag P1. Disse metoder er velkjente innen fagfeltet, og er beskrevet for eksempel i J.H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972);

35

J.H. Miller, *A Short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer og P. Berg, *Genes & Genomes*, University Science Books, Mill Valley, California (1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch og T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufman *et al.*, *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, B.R. Glick og J.E. Thompson, red., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); og P.F. Smith-Keary, *Molecular Genetics of Escherichia coli*, The Guilford Press, New York, NY (1989).

10

I en spesielt foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen, kan *E. coli*-stamme 472T23, som krever treonin for vekst, bli omdannet til en treoninprodusent ved å bruke P1-mediert transduksjon for å introdusere treoninoperonet fra *E. coli*-stamme ATCC 21277, som kan bli tilveiebragt fra the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA. Dette *thr*-operonet består av et feedback-resistent aspartatkinasehomosérin-dehydrogenasegen (*thrA*), et homoserinkinasegen (*thrB*) og et treoninsyntasegen (*thrC*).

20

For å forbedre treoninproduksjonen i stammene ifølge oppfinnelsen, ble det defekte treonindehydrogenasegenet fra *E. coli*-stamme CGSC6945 (relevant genotype: *tdh-1::cat1212*; tilveiebragt fra *E. coli* Genetic Stock Center, 355 Osborne Memorial Laboratory, Department of Biology, Yale University, New Haven, Connecticut 06520-8104, USA) bli introdusert ved P1-transduksjon. Den resulterende treoninprodusent kan videre forbedres ved mutagenisering med NTG og/eller selektering av borrelidinresistens.

25

Plasmider som bærer et antibiotika-resistent markørgen, slike som *kan* (som koder for kanomycinresistens), og en sterk promoter, slik som P_L eller *tac*, fortrinnsvis flankert av DNA oppstrøms for *thrA* og noen få hundre basepar av vild-type *thrA*-genet (dvs. ikke det hele *thrA*-genet), kan konstrueres og brukes som en bærer for å avlevere de ønskede DNA-fragmentene inn i kromosomet. Fragmentet på plasmidet kan bli isolert ved kutting med et passende restriksjonsenzym og renses, og deretter bli introdusert ved transformasjon eller elektroporering, inn i en stamme for å fjerne kontrollregionen av treoninoperon og erstatte den med homolog rekombinasjon med det ønskede fragmentet, dvs. et antibiotikaresistent markørgen og en sterk promoter i begynnelsen av *thrA*-genet. Dette fragmentet kan deretter bli overflyttet inn i den borrelidinresistente stammen ved P1-transduksjon.

35

Isoleucinkravet fra stammen til den foretrukne verten, 472T23, kan elimineres, for eksempel ved å introdusere et villtype-allel av markøren ved P1-transduksjon. Uønskede næringskrav fra andre verter kan bli fjernet på en lignende måte, eller i overensstemmelse med andre metoder kjente og tilgjengelige for de som kjenner fagfeltet.

En annen utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er rettet mot bruken av de ovenfor beskrevne bakteriestammene i fermenteringsprosessene for produksjon av aminosyrer fra aspartatfamilien. L-treonin er for eksempel tilveiebrakt ved å dyrke bakteriestammene ifølge oppfinnelsen, i et syntetisk eller naturlig medium som inneholder minst én karbonkilde, minst én nitrogenkilde og, som passende, inorganiske salter, vekstfaktorer og deres like.

Illustrative eksempler på passende karbonkilder inkluderer, men er ikke begrenset til: Karbohydrater, slike som glukose, fruktose, sukrose, stivelseshydrolysat, cellulosehydrolysat og molasser; organiske syrer slike som eddiksyre, propionsyre, maursyre, maleinsyre, sitronsyre og fumarsyre; og alkoholer slike som glyserol.

Illustrative eksempler på passende nitrogenkilder inkluderer, men er ikke begrenset til: Ammonium, inklusive ammoniumgass og vandig ammonium; ammoniumsalter av inorganiske eller organiske syrer, slike som ammoniumklorid, ammoniumfosfat, ammoniumsulfat og ammoniumacetat; og andre nitrogeninnholdende, inklusive kjøttekstrakt, peptone, maisuttrekksvæske, kaseinhydrolysat, soyabønnekekehydrolysat og gjærekstrakt.

Etter dyrking kan L-treoninet som har akkumulert i dyrkingsmediumet, separeres i overensstemmelse med enhver av de kjente metodene, dvs. ved bruk av ionebytteresiner som beskrevet i U.S. patent nr. 5.342.766. Denne metoden omfatter først at mikroorganismene fjernes fra dyrkingsmediumet ved sentrifugering, og deretter innstilling av pH i mediumet til ca. 2 ved å bruke hydroklorisyre. Den surgjorte oppløsningen blir deretter kjørt gjennom et sterkt syrekationbyttresin og det adsorberte eluert ved å bruke fortynnet, vandig ammoniakk. Ammoniakk fjernes ved evaporering under vakuum, og slutt oppløsningen kondenseres. Tilsetning av alkohol og deretter kjøling, tilveiebringer krystaller av L-treonin.

Andre aminosyrer fra aspartatfamilien kan produseres ved metoder lignende de som er beskrevet i detalj ovenfor. Isoleucin for eksempel, kan lages fra bakteriestammene ifølge

oppfinnelsen, som inneholder et amplifisert *ilvA*-gen eller *tdc*-gen på kromosomet eller på plasmidet, som begge koder for treonindeaminase, det første enzymet involvert i den biologiske endringen av treonin til isoleucin. Amplifisering av dette genet, for eksempel ved bruk av et *ilA*-gen som koder for et feedback-resistent enzym, medfører øket biosyntese av isoleucin.

På samme måte kan metionin bli preparert fra mikroorganismer sånne som *E. coli* som inneholder minst ett *met*-operon på kromosomet, dvs. *metL*-genet (som koder for AK II-HD II), *metA*-genet (homoserinsuksinyltransferase), *metB*-genet (cystationin- γ -syntase), *metC*-genet (cystationin- β -lyase) og *metE*- og *metH*-genene (homocysteinmetylase). Disse genene inklusive feedback-resistensvarianter herav og, valgfritt, en ikke-naturlig promoter, kan introduseres i kromosomet hos vertsmikroorganismen i overensstemmelse til én eller flere av de generelle metodene som er beskrevet ovenfor og/eller er kjente for de som kjenner fagfeltet. Lysin kan på samme måte bli fremstilt fra mikroorganismer som inneholder et gen som koder for lysinbiosyntese-enzymene (fortrinnsvis et feedback-resistent lysinbiosyntese-enzym som koder for av *lysC* og/eller *dapA*) og, valgfritt, en ikke-naturlig promoter.

En tredje utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, er rettet mot bruken av borrelidinresistente bakteriestammer i fermenteringsprosesser for produksjon av L-treonin. Det er å foretrekke at borrelidinresistente stammer er mutanter av en *E. coli*-stamme. En spesielt foretrukket utførelsesform av en slik mutant, er *E. coli*-stammen kat-13, som ble deponert ved the Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, 28. juni 1996 og tildelt tiltredelsesnummer NRRL B-21593.

Borrelidinresistens kan bli bestemt ved enhver av de aksepterte metodene for den som kjenner fagfeltet. For eksempel kan borrelidinresistente stammer isoleres ved å plate dem ut på minimalmedium som inneholder ca. 139 μ M borrelidin, som beskrevet i G. Nass og J. Thomale, *FEBS Lett.* 39:182-186 (1974). I tillegg er borrelidinresistens i spesifikke stammer uttrykt som en endring i én eller flere fenotypiske karakteristika hos cellene. For eksempel fremstår borrelidinresistente mutanter av *E. coli*-stamme 6-8 og dens avledninger som runde, heller enn som staver. I slike tilfeller kan bevis for en endring i fenotypekjennetegn være nok for å tilstrekkelig identifisere borrelidin-resistens-stammer.

Borrelidinresistensmutanter nyttige i denne utførelsesformen av foreliggende oppfinnelse, er i stand til å produsere treonin. Genene som koder for treoninbiosyntese-enzym, kan være tilstede på kromosomet eller på plasmider eller en blanding. Flere kopier av disse genene kan altså være tilstede. Det er å foretrekke at genene som koder for treoninbiosyntese-enzymene er resistente for attenueringskontroll og/eller koder for feedback-resistente enzymer.

Som beskrevet ovenfor, kan borrelidinresistente stammene ifølge oppfinnelsen inneholde én eller flere rekombinante plasmider etter ønske. For eksempel kan mikroorganismene ifølge oppfinnelsen inneholde rekombinante plasmider som koder for treoninbiosyntese-enzym. Bakteriestammene ifølge oppfinnelsen kan likeledes inneholde rekombinante plasmider som koder for andre enzymer involvert i treoninbiosyntese, slike som aspartatsemialdehyd-dehydrogenase (*asd*) eller enzymer, for å øke veksten.

I tillegg kan borrelidinresistente stammer modifiseres etter ønske, for eksempel for å øke treoninproduksjonen, kan næringskrav og dets like fjernes ved å bruke en av de metodene og teknikker som er kjent og tilgjengelig for de som kjenner fagfeltet. Illustrative eksempler på passende metoder for å modifisere borrelidinresistente *E. coli*-mutanter og inklusive varianter, men er ikke begrensende til: Mutagenese ved stråling med ultraviolett lys eller røntgen, eller ved behandling med kjemisk mutagen slik som nitrosoguanidin (N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin), metylmetansulfonat, nitrogensenep og dets like; genintegrasjonsteknikker, slike som de formidlet ved å transformere lineære DNA-fragmenter og homolog rekombinasjon, og transduksjon formidlet ved bakteriofager slik som P1. Disse metodene er velkjente innen fagfeltet, og er beskrevet for eksempel i J.H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, *A short Course in Bacterial Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer og P. Berg, *Genes & Genomes*, University Science Books, Mill Valley, California (1991); J. Sambrook, E. F. Fritsch og T. Maniatis, *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann *et al.*, *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, B.R. Glick og J.E. Thompson, red., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); og P.F. Smith-Keary, *Molecular Genetics of Escherichia coli*, The Guilford Press, New York, NY (1989).

Fortrinnsvis er borrelidinresistente mutanter ifølge oppfinnelsen, modifisert slik at de inkluderer en ikke-naturlig promoter oppstrøms for og i en operabel kobling med én eller flere av genene som koder for treoninbiosyntese-enzym, uten hensyn til om disse genene er på kromosomet og/eller på plasmider.

5

I overensstemmelse med en spesielt foretrukket måte av denne utførelsesformen hos den foreliggende oppfinnelsen, er L-treonin oppnådd ved å dyrke minst én borrelidinresistent bakteriestamme i et syntetisk eller naturlig medium som inneholder minst én karbonkilde, minst én nitrogenkilde og, passende, inorganiske salter, vekstfaktorer og dets
10 like, som beskrevet ovenfor. Akkumulert treonin kan bli gjenvunnet ved enhver av de kjente metodene av de som kjenner fagfeltet.

15 **Eksempel 1: Preparering av *E. coli*-stamme kat-13**

A. Overføring av treoninoperonet hos *E. coli* -stamme ATCC 21277 inn i kromosomet hos *E. coli*-stamme 472T23.

E. coli-stamme ATCC 21277 (U.S. patent nr. 3.580.810), tilgjengelig fra the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, er
20 amino-β-hydroksyvalerisk syre (AHV) resistent, men trenger prolin, tiamin, isoleucin, metionin for å vokse i et minimalmedium. ATCC 21277 er beskrevet å akkumulere 6,20 g/l treonin i en fermenteringsprosess. Treoninoperonet hos ATCC 21277 består av et aspartatkinase-I homoserindehydrogenase-I-gen (*thrA*) som koder for et feedback-resistent enzym, et homoserinkinasegen (*thrB*) og et treoninsyntasegen (*thrC*).

25

E. coli-stamme 472T23, som er deponert i the USSR Collection of Commercial Microorganisms at USSR Antibiotics Research Institute under Reg. nr. BKIIM B-2307, er beskrevet å kreve treonin og isoleucin for å vokse i et minimalt medium som inneholder glukose, ammonium, vitamin B1 og mineralsalter. Denne stammen kan ikke produsere
30 treonin fordi den bærer et defekt *thrC*-gen, et essensielt gen for treoninbiosyntese. Stammen 472T23 bærer også et defekt treonindeaminasegen, *ilvA*, som koder for det første enzymet i isoleucinbiosyntesen.

Bakteriofag P1-lysat ble tillaget ved å la fagen vokse på ATCC 21277. Stamme 472T23
35 ble deretter infisert med P1-lysatet, hvor et lite antall av fagpartiklene bærer treoninoperonet av ATCC 21277. Etter infeksjonen ble bakterier som syntetiserte treonin selektert ved å plate dem ut på minimalmedium E [glukose 0,05 g/l;

MgSO₄·7H₂O 0,2 g/l; sitronsyre·H₂O 2,0 g/l; K₂HPO₄ 10,0 g/l; NaH₂NH₄·4H₂O 3,5 g/l; agar 15,0 g/L] agarplater supplert med 0,25 g/l isoleucin. Flere treoninprototrofiske transduktanter som bærer treoninoperonet fra ATCC 21277, var nå istand til å vokse på minimalplater tilsatt bare isoleucin.

5

Disse transduktantene ble screenet ved risteflaskefermentering for treoninproduksjon beskrevet nedenfor i eksempel 2. En av dem, G9, produserte treonin, og ble selektert for videre stammeutvikling.

10

B. Overføring av et defekt treonindehydrogenase (*tdh*) gen innskutt med en kloramfenikolacetyltransferase (*cat*) gen inn i kromosomet hos *E. coli*-stamme G9.

Stamme CGSC6945 som bærer et defekt treonindehydrogenasegen (*tdh*⁻), ble tilveiebragt fra the *E. coli* Genetic Stock Center, 355 Osborne Memorial Laboratory, Department of Biology, Yale University, New Haven, Connecticut 06520-8140, USA. Treonondehydrogenasegenet er defekt fordi kloramfenikolacetyltransferase (*cat*) genet er satt inn i det. For å overføre dette defekte genet til G9, ble fag P1 dyrket på CSCG6945, og lysatet ble brukt for å infisere G9. Flere kloramfenikolresistente transduktanter fra G9 ble selektert og screenet for treoninproduksjon med risteflaskefermentering som beskrevet nedenfor i eksempel 2. En av dem, G909, med et høyere treonintiter enn G9, ble selektert for videre utvikling.

20

C. Innskudd av en ikke-naturlig promoter inn i kromosomet hos *E. coli*-stamme G909.

For å få avlevert *tac*-promoteren inn i kromosomet hos G909, ble homolog rekombinasjon mellom et lineært DNA-fragment og kromosomet fra en eksonuklease-V-minus-stamme (*recD*) tatt i bruk.

25

Det lineære DNA-fragmentet inneholdt 1,5 kb av sekvensen oppstrøms (5'-ende) av treoninoperonet, en kanamycinresistent markør, *tac*-promotersekvensen og ca. 480 bp av *thrA*-genet. Dette fragmentet, som tilveiebringer 5' endehomologi, en seleksjonsmarkør (kanamycinresistens), en sterk og kontrollerbar promoter til treoninoperonet (*tac*) og 3' endehomologi, ble dannet som følger.

30

Treoninoperonet hos vildtype *E. coli* W3110, ble klonet inn i restriksjonsenzym SphI-setet på plasmidet pUC19 ved å bruke DNA fra lambda-klon 676 fra dr. Yuji Kohara, Department of Molecular Biology, School of Science, Nagoya University, Shikusa-ku, Nagoya, Japan. DNA fra lambda-klon 676 og pUC19 ble deretter kuttet med SphI.

35

pUC19-fragmentet ble deretter defosforylert med rekealkalisk fosfatase (SAP) og renset på agarosegel. 6,9 kb-fragmentet av treoninoperon fra lambda-klonen ble også renset. Disse to fragmentene ble deretter ligert med T4 DNA-ligase for å danne plasmidet pAD103.

5

En oppstrømsflankerende region for homolog rekombinasjon og kanamycinresistens-markør ble deretter konstruert. pAD103 ble kuttet med restriksjonsenzym BstEII, XbaI og blunt-ended med klenow-fragmentbehandling. 1,5 kb fragmentet som inneholder bare 5'enden (oppstrøms) av treoninoperonet (men ikke selve *thr*-operonet eller dets kontrollregion) ble isolert og ligert til kanamycinresistensfragmentet fra pUC4K (Pharmacia), som var kuttet med restriksjonsenzym SalI og klenow-fragmentbehandlet for å fylle inn 3' overheng for å danne det intermediære plasmidet pAD106.

15

pAD103 ble også kuttet med restriksjonsenzymet TaqI og blunt-ended med klenow-fragmentbehandling. Fragmentet som inneholder det naturlige ribosombindingssetet og omtrent 480 bp av den kodende sekvensen fra *thrA*-genet, ble isolert og deretter ligert til et fragment fra pKK233-3 (Pharmacia), som hadde blitt kuttet med restriksjonsenzym SmaI og defosforylert med SAP, for å oppnå plasmid pAD115, som inneholdt DNA-sekvensen fra *tac*-promoter, ribosombindingsseter og noen hundre baser av *thrA*-genet.

20

pAD115 ble deretter kuttet med restriksjonsenzym BamHI og 0,75 kb av DNA-fragmentet som inneholdt de ønskede DNA-sekvensene, ble isolert. pAD106 ble også kuttet med BamHI og så defosforylert med SAP. De to fragmentene ble deretter ligert for å tilveiebringe plasmid pAD123, som inneholdt DNA-sekvensen oppstrøms for treoninoperonet, et kanamycinresistensmarkørgen, *tac*-promoter og ca. 480 bp av begynnelsen på *thrA*-genet.

25

pAD123 ble deretter kuttet med SpeI, BglI og fragmentet som inneholdt de ønskede DNA-sekvensene, ble isolert.

30

Eksonuklease V minus-stammen (*recD*) ble dyrket ved at P1 fag(?) vokste på *E. coli*-stamme KW251 (relevant genotype: *argA81::Tn10, recD1014*; tilveiebragt fra Pharmacia), som inneholder et *recD*-gen med et kotransduserbart transposon Tn10 innskutt i *argA*. Lysatet som ble laget fra fagen, ble deretter brukt for å infisere stamme G9 og den tetracyklinresistente transduktanten G9T7 ble isolert.

35

DNA-fragmentet fra plasmid pAD123 ble avlevert til *E. coli*-stamme G9T7 ved elektroporering. En kanamycinresistent stamme av G9T7 ble isolert og et P1 faglysat ble laget ved å dyrke fag på denne stammen. P1 faglysatet ble deretter brukt for å transducere G909. En av de kanamycinresistente transduktantene fra G909, tac3, som viste en høyere treonintiter ved tilstedeværelse av IPTG i risteflaskestudiet, ble isolert.

P1 faglysat ble deretter laget i stand med stamme tac3, og deretter brukt for å infisere stamme 6-8 (beskrevet nedenfor). De kanamycinresistente transduktantene ble selektert, og én av dem, stamme 6-8tac3, som produserte en enda høyere titer enn tac3 i en risteflaskestudie, ble isolert.

D. NTG-mutagenese og isolasjonen av borrelidinresistente mutanter fra *E. coli*-stammer G909 og 6-8.

Cellene fra stamme G909 ble mutagenisert med N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) behandling (50 mg/l, 30 min. ved 36°C) ved å bruke konvensjonelle metoder. De resulterende cellene ble så sådd ut på minimalmedium E agarplate som inneholdt 0,25 g/l L-isoleucin og 0,1% v/v borrelidin. Etter inkubasjon i 3-5 dager ved 36°C, ble de store koloniene som ble dannet på platen, som omfattet stamme 6-8, selektert ved testing for borrelidinresistens og L-treoninproduksjon.

For å teste borrelidinresistens, ble hver stamme dyrket i 20 ml frømedium SM [32,5 g/l glukose, 1 g/l MgSO₄·7H₂O; 24,36 g/l K₂HPO₄; 9,52 g/l KH₂PO₄; 5 g/l (NH₄)₂SO₄; 15 g/l gjærekstrakt; pH 7,2] ved 36°C i 17 timer med risting. Cellene ble deretter høstet og vasket med minimalmedium E. Cellesuspensjonen ble deretter inokulert i et sterilisert rør inneholdende 3 ml minimalt medium E og 0, 0,1, 0,5 eller 1 mM borrelidin. Etter 24 timers dyrking ved 36°C med risting, ble veksten målt ved å måle den optiske tettheten ved 660 nm. Resultatene er vist nedenfor relativ til vekst i fraværet av borrelidin.

borrelidin (mM)	G909	6-8
0	100,0	100,0
0,1	24,2	134,5
0,5	2,9	141,0
1	0,9	184,5

E. Fjerning av isoleucinkrav og laktosepressor-gen (*lacI*).

Ved å introdusere den ikke-naturlige *tac*-promoter og et feedback-resistent *thrA*-gen, er ekspresjon av *thr*-operonet (*thrA*, *thrB*, *thrC*) ikke lenger kontrollert ved attenueringsmekanismen. Som et resultat er sulting for isoleucin og/eller tilstedeværelsen av en *ilvA* auxotrof markør ikke lenger påkrevet for treoninproduksjon.

I overensstemmelse med dette ble vildtype *ilvA*-markør introdusert ved transduksjon inn i 6-8tac3 for å fiksere stammens isoleucinkrav, dvs. å eliminere behovet for isoleucin-supplementert medium for cellevekst. P1 faglysat laget fra CGSC7334 (relevant genotype: *lacI42::Tn10*, *lacZU118*; skaffet fra *E. coli* Genetic Stock Center, 355 Osborne Memorial Laboratory, Department of Biology, Yale University, New Haven, Connecticut 06520-8104, USA) ble brukt for å infisere 6-8tac3 og transduktanter positive for isoleucinbiosyntese ble selektert. Disse transduktanter produserte omtrent den samme mengde L-treonin som stamme 6-8tac3 i en risteflaskestudie. En av disse transduktantene, 6-8tac3ile+, ble selektert for videre utvikling.

Siden treoninoperonet hos 6-8tac3ile er under kontroll av *tac*-promoterens, var isopropyl- β -D-tiogalaktosidase (IPTG) nødvendig for å inducere cellene til full ekspresjon av *thr*-operonet. Bruken av IPTG for å inducere ekspresjon av *thr*-operonet, er imidlertid mindre foretrukket i samsvar med metodene av den foreliggende oppfinnelse.

I samsvar med å eliminere denne unødvendige regulatoriske hindringen, er et defekt *lac*-repressor (*lacI*) gen introdusert ved å infisere 6-8tac3ile+ med P1 fag laget fra CGSC-7334. De resulterende transduktanter (6-8tac3lacI-) ble testet for resistens mot tetracyklin, og tetracyklinresistente kolonier ble selektert.

Eksempel 2: Risteflaskefermenteringsstudie av treoninproduksjon.

En sammenligning av treoninproduksjon blant forskjellige *E. coli*-stammer ble bestemt ut fra deres yteevne i risteflaskefermentering. Stammene som ble testet vokste på LB agarmedium [10 g/l trypton, 5 g/l ekstrakt, 15 g/l agar]. Etter 1 til 2 dager med vekst, ble cellene suspendert i 5 ml frømedium [dekstrose 32,5 g/l; K₂HPO₄ 24,35 g/L; KH₂PO₄ 9,5 g/l; gjærekstrakt 15 g/l; (NH₄)₂SO₄ 5 g/l; MgSO₄·7H₂O 1 g/l] ved pH 7,2. Blandingen ble dyrket i 24 timer med en ristingshastighet på 250 rpm ved 37°C. 15 ml av fermenteringsmediumet [dekstrose 40 g/l; gjærekstrakt 2 g/l; sitronsyre 2 g/l; (NH₄)₂SO₄ 25 g/l; MgSO₄·7H₂O 2,8 g/l; CaCO₃ 20 g/l; spormetalloppløsning 2 ml] ved pH 7,2, ble deretter tilsatt til blandingen, og fermenteringsprosessen ble utført ved 37°C med en

ristehastighet på 250 rpm. Etter dyrkingen ble mengden av L-treonin som hadde akkumulert i kulturmediet, analysert med HPLC (ISCO Model 2353 pump, Rainin Model RI-1 refraktiv indekstdetektor og aminex Hp87-CA-kolonne).

- 5 Mengden av L-treonin produsert av hver av de testede stammene er presentert under.

Stamme	L-treoninprodusert (g/l)
G909	4,95
6-8	11,45
tac3	12,9 (indusert ved IPTG)
	10,6 (ikke-indusert)
6-8 tac3 ile+	12,7 (indusert ved IPTG)
6-8 tac3 lacI-	13,9
kat 13	14,0

Eksempel 3: Fermenteringsstudie

- 10 *E. coli*-stammene ifølge oppfinnelsen og deres utgangsstammer ble testet for L-treoninproduksjon ved fermentering.

G909 ble testet under de følgende forhold: 0,5 l vandig kulturmedium som inneholdt 30 g/l tryptisk soyamedium og 5 g/l gjærekstrakt i en 2 liters risteflaske med lederplate, ble
 15 inokulert med 1,5 ml G909 og inkubert på en rister ved 35°C og 200 rpm i 8,5 time. 0,9 ml (0,03%) av det modne inokulum ble tilsatt til en glassfermentor inneholdende 3,0 l av frøfermentormediumet [10 g/l d.s. av kornvæske, 0,4 g/l av L-isoleucin, 2,5 g/l av KH₂PO₄, 2,0 g/l av MgSO₄·7H₂O, 0,5 g/l av (NH₄)₂SO₄, 0,192 g/l av anhydrt sitronsyre, 0,03 g/l av FeSO₄·7H₂O, 0,021 g/l av MnSO₄·H₂O og 80 g/l dekstrose]. Inkubasjon ble utført under følgende forhold: En temperatur på 39°C de første 18 timene og
 20 deretter 37°C for de gjenværende; pH på 6,9 (oppretholdt ved å tilsette NH₄OH); lufttilstrømning ved 3,5LPM; risting ved 500 rpm i starten, som deretter øket for å opprettholde DO ved 20%; og baktrykk på 1-2 psi. Fullføring av frøfermentorstadiumet ble bestemt ved å redusere dekstrose. 315 ml (15%) av moden inokulum fra frøfermentoren
 25 ble tilsatt til en glassfermentor inneholdende det samme mediumet (hovedfermentormedium) som beskrevet over med de følgende unntakene: Volumet var 2,1 l, og 0,34 g/l av L-isoleucin ble tilsatt. Inkubasjon ble utført i 48 timer under de følgende forhold: Temperatur på 37°C; pH på 6,9 (oppretholdt med NH₄OH); luftstrøm på 3,5 LPM inntil

- 20 timer, deretter økende til 4,0 LPM; risting med 500 rpm i starten, som deretter ble øket for å opprettholde DO ved 20%; baktrykk på 1-2 psi; og dekstrosenivå på 10 g/l (opprettholdt ved å tilsette en 50% w/w dekstroseoppløsning). Fermenteringen ble avsluttet etter 48 timer. G909 produserte følgende resultater: En slutt-titer på 62,3 g/l treonin med en total produktivitet på 274 g og et utbytte på 23,2%. tac3 ble testet under de samme forhold som G909, beskrevet ovenfor, med de følgende unntak: 1 mg/l IPTG ble tilsatt ved begynnelsen på hovedfermentorstadiet. Med tilsetning av IPTG, produserte tac3 en slutt-titer på 85,7 g/l treonin med en total produktivitet på 355 g og et utbytte på 28,8%.
- 6-8 ble testet under de samme forhold som G909 beskrevet ovenfor. 6-8 produserte de følgende resultater: En slutt-titer på 74,1 g/l treonin med en total produktivitet på 290 g og et utbytte på 28,3%.
- 6-8tac3 ble testet under de samme forhold som tac3 beskrevet ovenfor, inklusiv tilsetningen av IPTG. 6-8tac3 produserte de følgende resultater: En slutt-titer på 99,3 g/l treonin med en totalproduktivitet på 421 g og et utbytte på 35,1%.
- 6-8tac3ile+ ble testet under de samme forhold som 6-8tac3 som beskrevet ovenfor, med det følgende unntak: L-isoleucin var ikke påkrevet i hverken frøfermentorstadiet eller hovedfermentorstadiet. På grunn av en ristefeil etter 22,5 timer, ble bare titeret etter 22 timer registrert (62 g/l treonin).
- kat-13 ble testet under de samme forhold som 6-8tac3 som beskrevet ovenfor, med de følgende unntak: IPTG ble ikke tilsatt. Under disse forhold produserte kat-13 en slutt-titer på 102 g/l treonin med en total produktivitet på 445 g og et utbytte på 33,1%.

De relevante genotyper på de konstruerte stammene, supplementskrav for fermenteringsproduksjon av treonin og de bokførte titerne, presenteres i tabellen nedenfor:

Stamme	Relevant genotype	Supplementer for produksjon	titer etter 30 timer	titer etter 48 timer	Utbytte
G9	ilvA ⁺	Ile	ND	ND	ND
G909	ilvA ⁺ tdh::Cm	Ile	53	62,3	23,2
tac3	ilvA ⁺ , tdh::Cm, <i>ptacthrABC</i>	Ile, IPTG	86	85,7	28,8
6-8	ilvA ⁺ , tdh::Cm, Bor-R	Ile	70	74,1	28,3
6-8tac3	ilvA ⁺ , thd::Cm, <i>ptacthrABC</i> , Bor-R	Ile, IPTG	75	99,3	35,1
6-8tac3ile+	tdh::Cm, Bor-R, <i>ptacthrABC</i>	IPTG	62 (etter 22 timer)	NA	NA
kat13	tdh::Cm, Bor-R, <i>ptacthrABC</i> lacI	Ingen	92,1	102	33,1

Bor-R: Borrelidinresistanse

5 ND: Ikke utført

NA: Ikke tilgjengelig

ptacthrABC: *thrA*-, *thrB*- og *thrC*-gener under kontroll av *tac*-promoter.

P a t e n t k r a v

1.
Fremgangsmåte for å produsere L-treonin, k a r a k t e r i s e r t
5 v e d trinnene:
 - (a) dyrking av en stamme av *E. coli* i et medium; og
 - (b) gjenvinne L-treonin som er produsert av nevnte *E. coli*;
hvor nevnte stamme av *E. coli*:
 - (i) inneholder på kromosomet minst ett treonin (*thr*) operon, funksjonsdyktig koblet
10 med minst én ikke-naturlig promoter som erstatter den native promoter via
innføyelse i nevnte kromosom; og
 - (ii) som ikke har krav noen til rekombinante plasmider som inneholder én eller flere
gener som koder for én eller flere treonin-biosynteseenzymmer for å produsere
treonin.
15
2.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte *E. coli* har evnen til å produsere minst ca. 50 g/l av L-treonin på ca. 30 timer.
- 20 3.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte ikke-naturlige promoter er selektert fra gruppen bestående av *tac*-promoter, *lac*-promoter, *trp*-promoter, *lpp*-promoter, P_L-promoter og P_R-promoter.
- 25 4.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte treoninoperon inneholder et gen som koder for en feedback-resistent aspartat-
kinasehomoserin-dehydrogenase.
- 30 5.
Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte *E. coli* er stamme *cat*-13, NRRL B-21593.
6.
35 Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nevnte ikke-naturlige promoter er *tac*-promoter.

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* inneholder et defekt treonindehydrogenasegen på kromosomet.

5 8.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte treoninoperon er ervervet fra ATCC 21277.

9.

10 Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* er borrelidinresistent.

10.

Metode for å produsere en aminosyreproduserende stamme fra *E. coli* som ikke bærer rekombinante plasmider som koder for én eller flere biosyntetiske enzymer for nevnte aminosyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder trinnene:

- (a) introduksjon av genetisk materiale fra en aminosyreproduserende mikroorganisme inn i kromosomet til en *E. coli*-stamme;
- (b) innsetting av en ikke-naturlig promoter inn i nevnte kromosom før kromosom lokaliseringen av og i en funksjonsdyktig kobling med aminosyrebiosyntesegener for kontroll av ekspresjon derav der nevnte ikke-naturlige promoter erstatter den native promoter; og
- (c) valgfritt å fjerne regulatoriske hindringer for og/eller næringsmessige krav for aminosyrebiosyntese fra nevnte kromosom.

25

11.

Stamme fra mikroorganismen *E. coli*, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har følgende karakteristikk:

- (i) dens kromosom inneholder minst ett treonin (*thr*) operon, funksjonsdyktig koblet med minst én ikke-naturlig promoter som erstatter den native promoter via innføyelse i nevnte kromosom; og
- (ii) den krever ingen rekombinante plasmider som inneholder ett eller flere gener som koder for ett eller flere av treoninbiosyntese-enzymene for å produsere treonin; og
- 35 (iii) den produserer L-treonin.

12.

Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte treoninoperon består av et feedback-resistent aspartatkinase I-homoserindehydrogenase-I-gen (*thrA*), et homoserinkinase (*thrB*) gen, et treoninsyntasegen (*thrC*).

5

13.

Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* er stamme *cat-13*, NRRL B-21593.

10 14.

Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte ikke-naturlige promoter er *tac*-promoteren.

15.

15 Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* inneholder et defekt treonindehydrogenasegen på kromosomet.

16.

20 Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte treoninoperon er ervervet fra ATCC 21277.

17.

Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* er borrelidinresistent.

25

18.

Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* har karakteristikkene fra stamme NRRL B-21593.

30 19.

Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* er i stand til å produsere minst ca. 50 g/l L-treonin på ca. 30 timer.

20.

35 Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ikke-naturlige promoter er utvalgt fra gruppen bestående av *tac*-promoteren, *lac*-promoteren, *trp*-promoteren, *lpp*-promoteren, P_L-promoteren og P_R-promoteren.

21.

Stamme ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte treonin-operon inneholder et gen som koder for en feedback-restistent aspartat-kinase-homoserin-dehydrogenase.

22.

Stamme ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at *E. coli* er borrelidin-resistent.

23.

Stamme ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at *E. coli* er borrelidin-resistent.

24.

Stamme ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at *E. coli* er borrelidin-resistent.

25.

Stamme ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at *E. coli* er borrelidin-resistent.

26.

Stamme ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t v e d at *E. coli* er borrelidin-resistent.

27.

Stamme ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at *E. coli* er borrelidin-resistent.

28.

Stamme ifølge krav 12, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* inneholder et defekt treonin dehydrogenasegen på kromosomet.

29.

Stamme ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* inneholder et defekt treonin dehydrogenasegen på kromosomet.

30.

Stamme ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* inneholder et defekt treonin dehydrogenasegen på kromosomet.

5

31.

Stamme ifølge krav 21, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte *E. coli* inneholder et defekt treonin dehydrogenasegen på kromosomet.

1/5

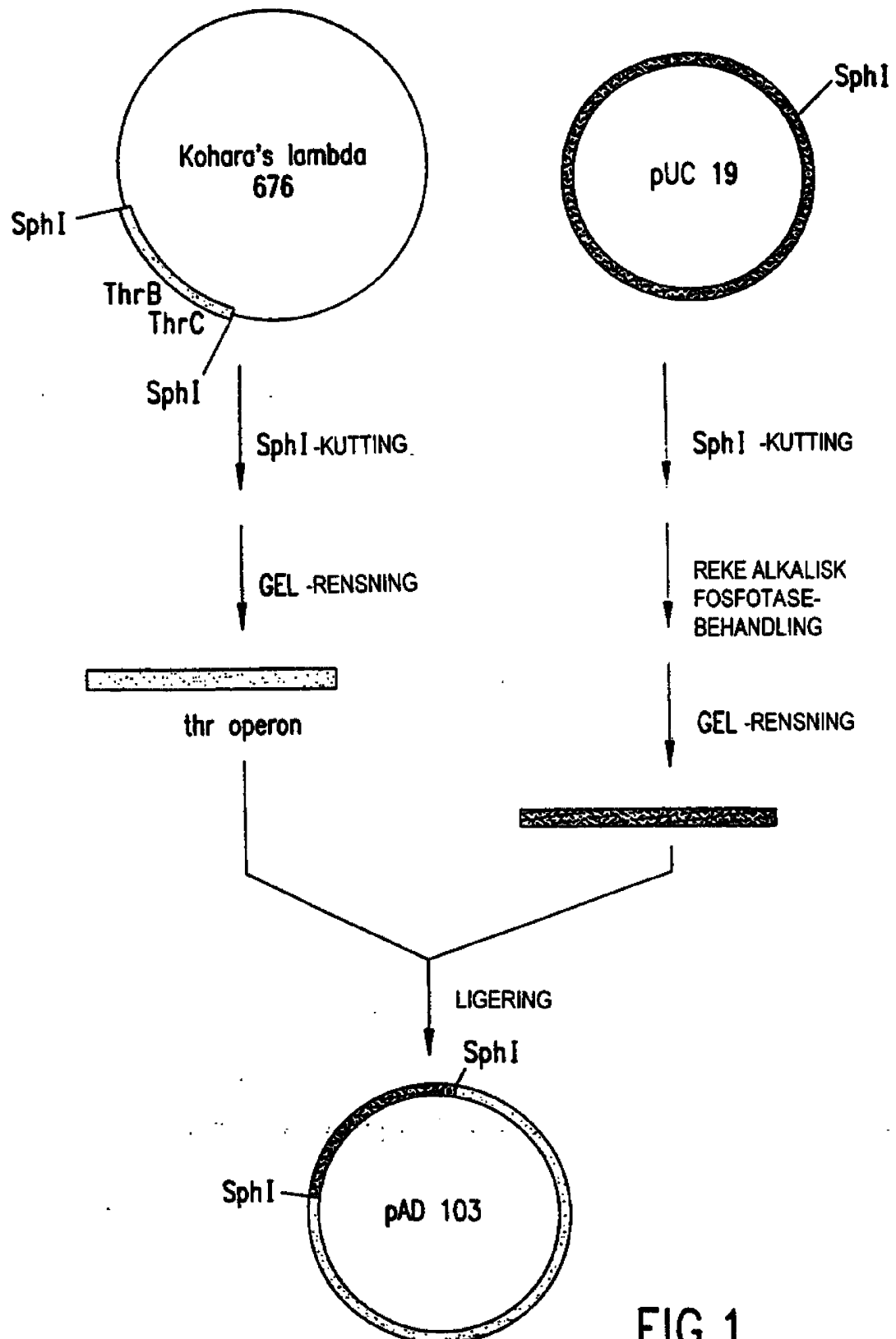


FIG.1

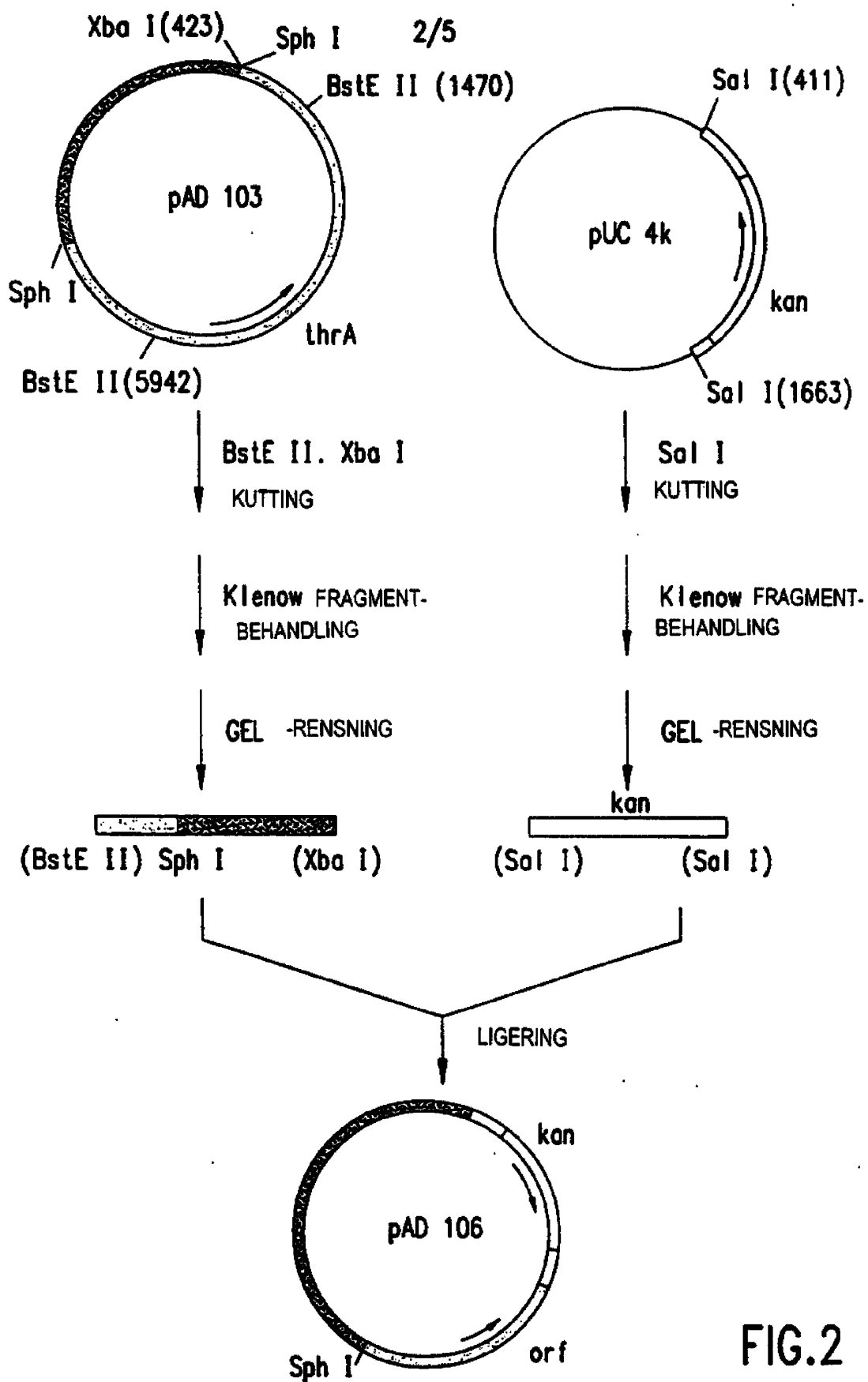


FIG.2

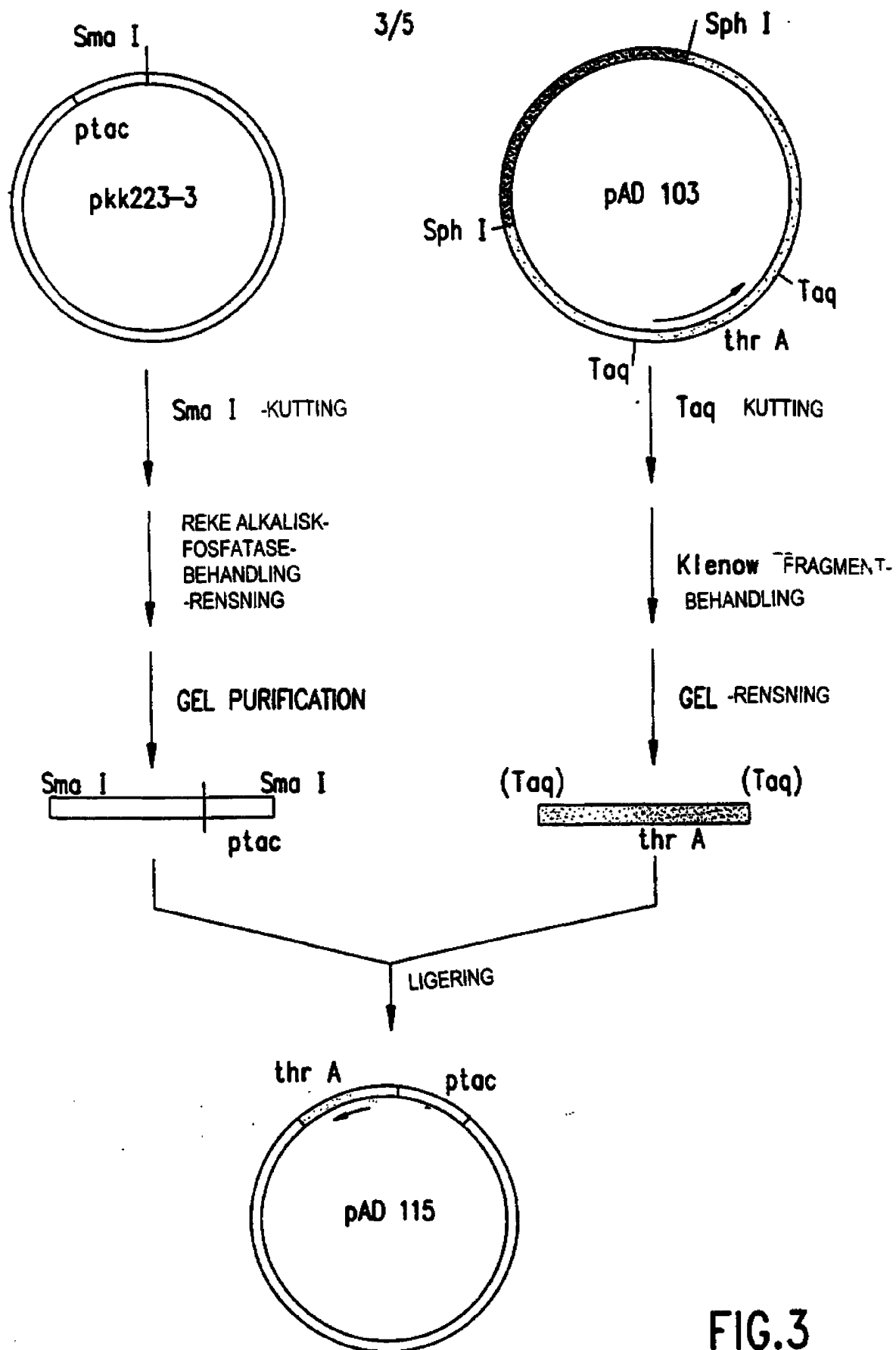


FIG.3

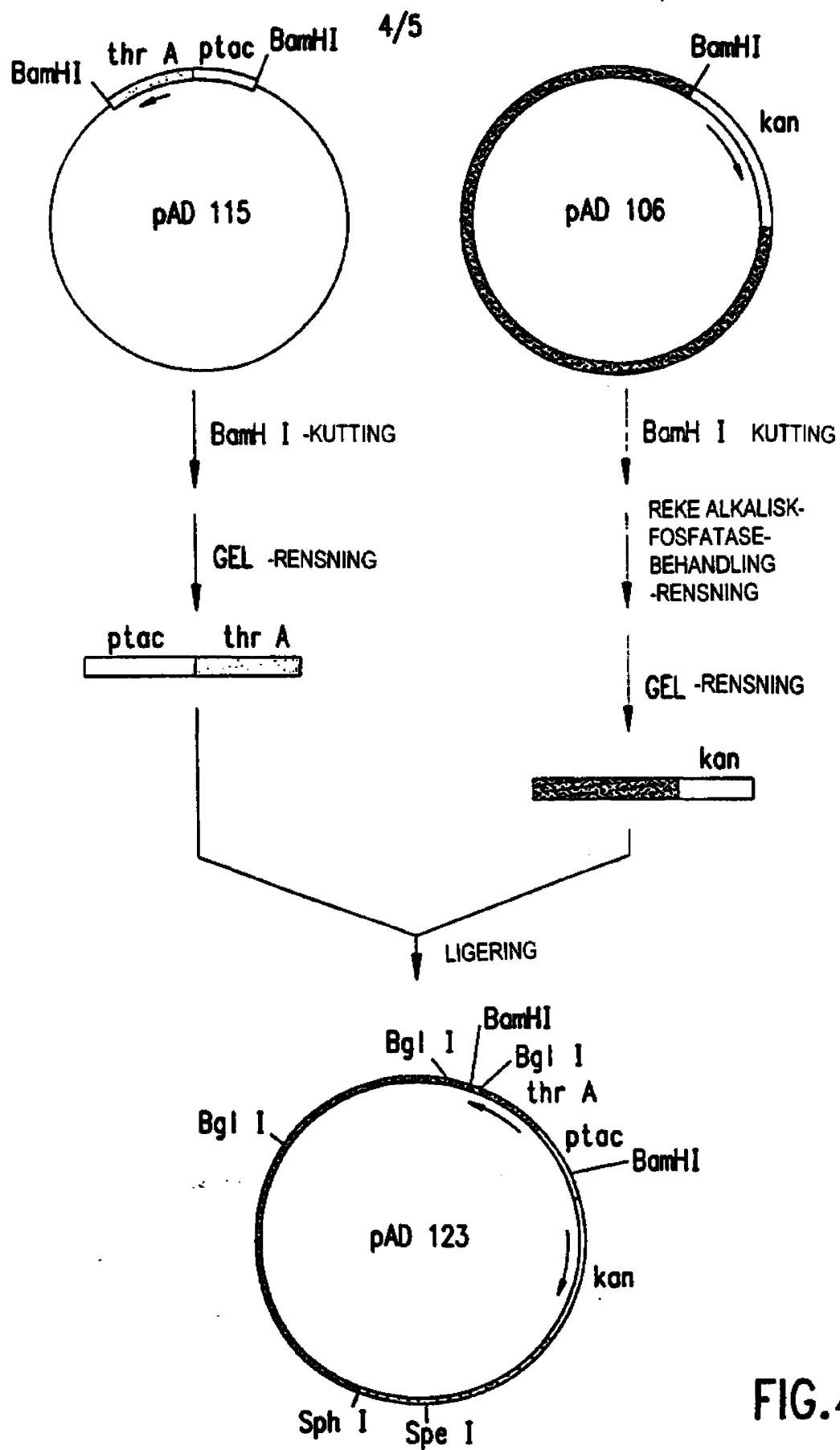


FIG.4

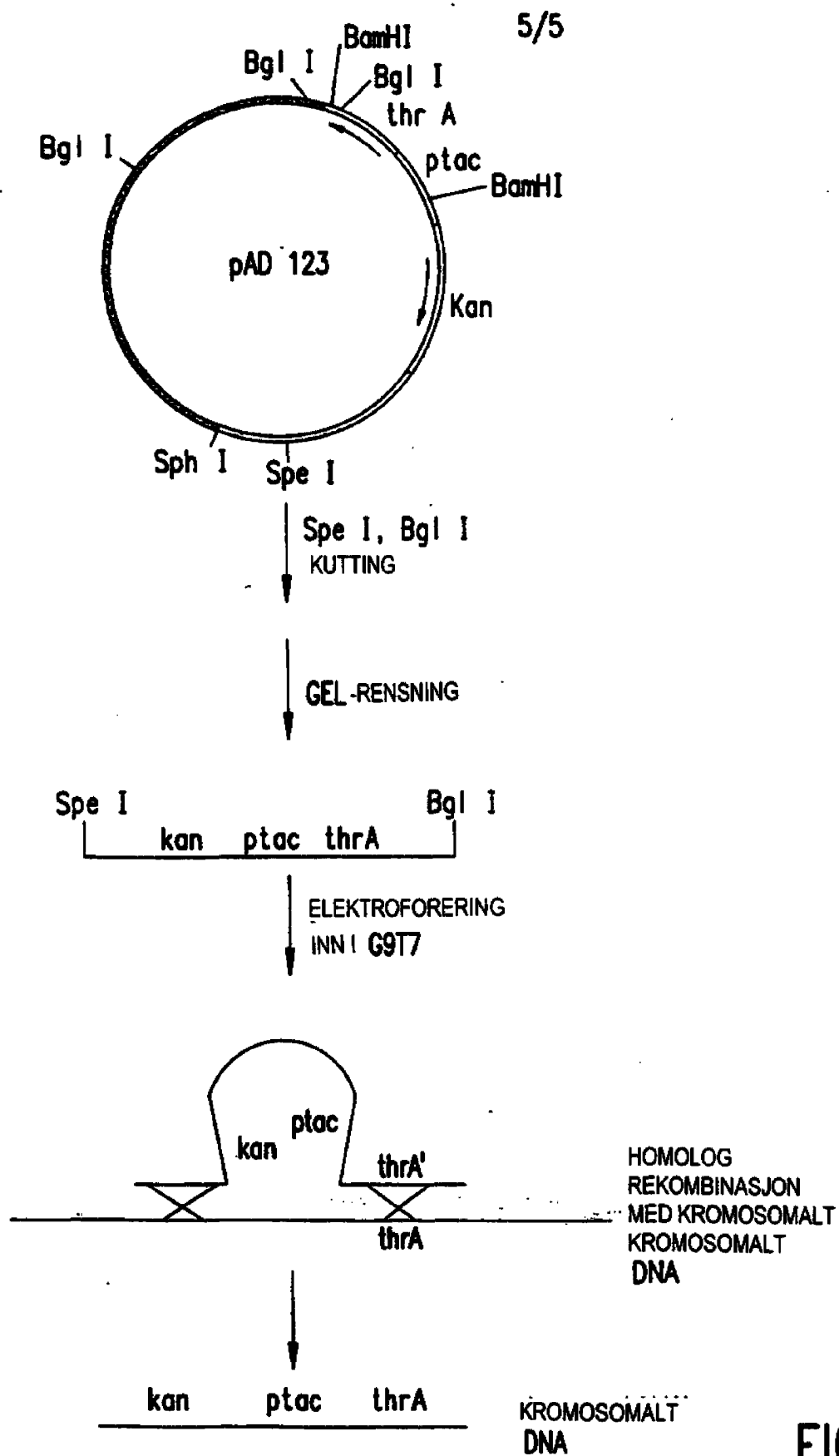


FIG.5