

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 876 949**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12P 13/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2016 PCT/KR2016/004893**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16182321**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2016 E 16792967 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3296400**

54 Título: **Método para producir L-triptófano mediante el uso de microorganismos del género *Escherichia***

30 Prioridad:

**14.05.2015 KR 20150067660**

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

**15.11.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE, SEOK MYUNG;  
LEE, BAEK SEOK;  
KIM, KYUNGRIM;  
LEE, KWANG HO;  
LEE, KEUN CHEOL y  
HONG, HYEONGPYO**

74 Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester**

**ES 2 876 949 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

Método para producir L-triptófano mediante el uso de microorganismos del género *Escherichia*

5 [Campo técnico]

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se refiere a un método para producir L-triptófano mediante el uso de un microorganismo modificado del género *Escherichia* que produce L-triptófano, en donde se inactiva la actividad de una fosfatasa que consiste en la SEQ ID N° 1.

10

[Antecedentes de la técnica]

El L-triptófano, que es un aminoácido esencial, se ha usado ampliamente como aditivo para piensos, material de base para medicamentos como agentes de transfusión, etc., y material de base para alimentos funcionales para la salud, etc. Aunque tal L-triptófano se puede producir por quimiosíntesis, reacción enzimática, métodos de fermentación, etc., el L-triptófano se produce en la actualidad, principalmente por fermentación directa mediante el uso de microorganismos. En las primeras etapas, el desarrollo de cepas productoras de L-triptófano se llevó a cabo mediante selección de mutaciones (publicación de solicitud patente coreana núm. 1987-0001813). Junto con el desarrollo de la ingeniería genética, el desarrollo de cepas productoras de triptófano se llevó a cabo mediante un método para superar la inhibición de triptófano por retroalimentación de las enzimas en las vías biosintéticas mediante el mejoramiento de la síntesis de enzimas en los procesos metabólicos, como en el mejoramiento de la expresión de las enzimas biosintéticas de triptófano. Sin embargo, todavía se requiere desarrollar cepas productoras de triptófano que tengan una producción altamente eficiente para el uso industrial.

15

20

En particular, se sabe que la triptófano sintasa (EC 4.2.1.20), que participa en la etapa de reacción final durante la biosíntesis de triptófano por microorganismos, usa fosfato de piridoxal (PLP) como una coenzima. Además, en el caso de la serina, que se usa como sustrato para la reacción de la triptófano sintasa, la fosfohidroxitreonina aminotransferasa (EC 2.6.1.52) codificada por serC usa PLP como una coenzima y, así, PLP se considera una coenzima importante para la biosíntesis de triptófano.

25

30

Por lo tanto, se espera que el mantenimiento de una concentración apropiada de PLP juegue un papel importante en reacciones efectivas para las enzimas correspondientes y reacciones biosintéticas para los productos deseados. Sin embargo, las coenzimas contribuyen a varias reacciones además de la producción de triptófano y, por lo tanto, aún no se ha descubierto un método para mantener adecuadamente el nivel de PLP. Además, aún queda por dilucidar si el mantenimiento del nivel de PLP en microorganismos productores de triptófano podría conducir a un aumento en la productividad de L-triptófano.

35

El documento EP 2801611 se refiere a un microorganismo capaz de producir L-treonina o L-triptófano, y a un método para producir L-treonina o L-triptófano mediante el uso de los mismos. Con mayor especificidad, el documento se refiere a una *Escherichia coli* recombinante que es más eficiente en la producción de L-treonina o L-triptófano al aumentar la capacidad de producir ATP, que se usa como la fuente de energía más abundante en las células cuando se produce L-treonina o L-triptófano; y un método para producir L-treonina o L-triptófano mediante el uso de los mismos.

40

Sun y otros, "Physiological Consequences of Multiple-Target Regulation by the Small RNA SgrS in *Escherichia Coli*" se refiere a un estudio que examina cómo la regulación de SgrS de diferentes dianas impacta el crecimiento bajo diferentes condiciones nutricionales cuando se induce el estrés de azúcar-fosfato. La gravedad de la inhibición del crecimiento asociado al estrés depende de la disponibilidad de nutrientes. El estrés en los medios ricos en nutrientes requirió la regulación de SgrS solamente de los ARNm transportadores de azúcar (ptsG o manXYZ). Sin embargo, la represión de los ARNm de los transportadores fue insuficiente para el rescate del crecimiento durante el estrés en medios pobres en nutrientes; la regulación de SgrS de la fosfatasa (yigL) y las dianas aún no definidas también contribuyeron al rescate del crecimiento. Los resultados de este estudio implican que la regulación de solo un subconjunto de las dianas de un ARNs puede ser importante en un entorno determinado. Además, los resultados sugieren que SgrS y quizás otros ARNs son reguladores flexibles que modulan la expresión de regulones multigénicos para permitir que las células se adapten a una serie de condiciones de estrés.

45

50

55

[Descripción de la invención]

[Problema técnico]

60

Los presentes inventores realizaron grandes esfuerzos para desarrollar un método para producir L-triptófano con alta eficacia. Inactivaron la actividad de la proteína representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que está codificada por el gen yigL cuya función aún no está clara, con el fin de aumentar la capacidad de producción de triptófano mediante la inhibición de la descomposición de PLP, que es el coenzima y el mantenimiento adecuado de la concentración intracelular de PLP. Como resultado, confirmaron que mejoró la capacidad de producción de L-triptófano, completando así la invención.

65

[Solución técnica]

Un objetivo de la presente descripción es proporcionar un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir L-triptófano mediante el uso de los microorganismos que producen L-triptófano.

[Efectos ventajosos]

La presente invención usa un microorganismo modificado del género *Escherichia* que produce L-triptófano, en donde se inactiva una actividad de la fosfatasa representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La presente invención muestra los efectos de producir L-triptófano de forma efectiva y económica, lo que resulta en un mayor rendimiento mediante el uso de los microorganismos del género *Escherichia*. El L-triptófano producido como anteriormente puede aplicarse no solo a piensos animales o aditivos para piensos, sino también a diversos productos, tales como alimentos para humanos o aditivos alimentarios de los mismos, medicinas, etc.

[Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención]

Con el fin de lograr los objetivos anteriores, en un aspecto, se proporciona un microorganismo modificado del género *Escherichia* que produce L-triptófano, en donde se inactiva una actividad de la fosfatasa representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el microorganismo modificado del género *Escherichia* que produce L-triptófano puede ser un microorganismo que tiene aumentada la capacidad de producción de triptófano en comparación con los microorganismos no modificados del género *Escherichia*.

Como se usa en esta descripción, el término "L-triptófano", que se refiere a un  $\alpha$ -aminoácido, es un aminoácido esencial que no se sintetiza *in vivo* y es un L-aminoácido aromático cuya fórmula química es  $C_{11}H_{12}N_2O_2$ . Para aumentar la capacidad de producción de L-triptófano en microorganismos, se han usado anteriormente métodos que incluyen mejorar la expresión de enzimas biosintéticas en las vías de producción de triptófano y bloquear las vías de la cadena lateral.

Como se usa en esta descripción, el término "fosfatasa" puede referirse a una proteína que cataliza reacciones para eliminar grupos fosfato de los sustratos. En la presente invención, se predice que la "fosfatasa que incluye los aminoácidos de SEQ ID NO: 1", que es una proteína codificada por el gen *yigL*, cataliza las reacciones que descomponen el PLP, que es un sustrato, en piridoxal y ácido fosfórico. Dado que la proteína codificada por *yigL* se denomina fosfato piridoxal fosfatasa (ID del gen en NCBI: 12930615) en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pero fosfoazúcar fosfatasa en la base de datos EcoCyc (<http://www.ecocyc.org>), no se conoce qué función es la función principal de la proteína. De acuerdo con una investigación reciente, se informó que la expresión de *yigL* es inducida por un choque térmico (J. Gen. Appl. Microbiol., (2005) V51, págs. 93-103) y hay resultados de investigación que describen que la traducción de *yigL* es activada por *sgrS*, que es un tipo de ARNs, para descomponer así los fosfoazúcares intracelulares (J. Bacteriol. (2013) V195, págs. 4804-4815). Sin embargo, aún quedan por dilucidar claramente las funciones.

Como tales, las enzimas descritas son aminoácidos que tienen una homología del 70 % o más, específicamente del 80 % o más, con mayor especificidad del 90 % o más, incluso con mayor especificidad del 95 % o más, incluso aún con mayor especificidad del 98 % o más, e incluso aún con mayor especificidad del 99 % o más con las secuencias anteriores, además de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1, y las enzimas sin limitación siempre que tengan un efecto sustancialmente igual o correspondiente al de las enzimas anteriores.

Los genes que codifican la fosfatasa representada por SEQ ID NO: 1 se describen sin limitación siempre que sean las secuencias que pueden codificar las enzimas y puedan indicarse como el gen *yigL*. Específicamente, los genes que codifican las enzimas son las secuencias de nucleótidos que tienen una homología del 80 % o más, específicamente del 90 % o más, con mayor especificidad del 95 % o más, incluso con mayor especificidad del 98 % o más, y aún con mayor particularidad del 99 % o más con las secuencias enumeradas anteriormente además de las secuencias de nucleótidos representadas por SEQ ID NO: 2. Las secuencias de genes se describen sin limitación siempre que codifiquen enzimas que tienen un efecto sustancialmente igual o correspondiente al de las enzimas anteriores.

Como se usa en esta descripción, el término "homología" se refiere a un porcentaje de identidad entre dos restos de polinucleótidos o de polipéptidos. La homología entre secuencias de un resto a otro resto puede determinarse mediante una tecnología conocida en la técnica. Por ejemplo, la homología puede determinarse ordenando directamente la información de la secuencia (es decir, parámetros, tales como puntuación, identidad, similitud, etc.) entre dos moléculas de polinucleótidos o dos moléculas de polipéptidos mediante el uso de un programa de computadora (Ejemplo: BLAST 2.0) que es fácilmente accesible y capaz de ordenar la información de la secuencia. Además de esto, la homología entre polinucleótidos puede determinarse mediante la hibridación de polinucleótidos

bajo la condición de formar una cadena doble estable entre las regiones homólogas y desensamblar con una nucleasa específica de cadena simple, seguido de la determinación del tamaño de los fragmentos desensamblados.

5 Como se usa en esta descripción, el término "actividad endógena" se refiere a un estado activo de una enzima en un estado natural o antes de la modificación poseída por un microorganismo.

10 El término "inactivar" se refiere al caso donde el gen que codifica una enzima no se expresa en absoluto, en comparación con una cepa en un estado natural o antes de la modificación, y/o el caso en el que la enzima tiene la actividad disminuida o nula incluso si se expresa el gen.

15 Así, la actividad inactivada con respecto a la actividad endógena se refiere a una actividad disminuida o nula, en comparación con la actividad de una enzima en un estado natural o antes de la modificación poseída originalmente por un microorganismo. La disminución es un concepto integral que incluye el caso en donde la actividad de la enzima en sí es menor que la actividad de la enzima originalmente poseída por un microorganismo debido a la modificación del gen que codifica las enzimas, etc.; el caso en donde el nivel general de actividad enzimática intracelular es menor que el de la cepa en estado natural o antes de la modificación debido a la inhibición de la expresión del gen que codifica la enzima o la inhibición de la traducción; y una combinación de los mismos.

20 El método de modificación para inactivar la actividad enzimática puede lograrse mediante la aplicación de varios métodos que son bien conocidos en la técnica. Aunque sin limitarse a ello, los ejemplos de los métodos pueden incluir un método para reemplazar el gen que codifica la enzima en el cromosoma con el gen mutado para disminuir su actividad enzimática, incluido el caso en el que se elimina la actividad enzimática; un método para eliminar parcial o completamente el gen que codifica la enzima; un método para reemplazar la secuencia de control de expresión del gen que codifica la enzima con la secuencia que tiene actividad débil o nula; un método para introducir una modificación en la secuencia de control de la expresión del gen que codifica la enzima en el cromosoma; un método para eliminar parcial o completamente el gen que codifica la enzima en el cromosoma; un método para introducir un oligonucleótido antisentido (por ejemplo, ARN antisentido), que inhibe la traducción del ARNm a la enzima mediante la unión complementaria al transcrito del gen en el cromosoma; un método para incorporar artificialmente una secuencia complementaria a la secuencia SD corriente arriba de la secuencia SD del gen que codifica la enzima, mediante la formación de una estructura secundaria, para inhibir así la unión ribosómica; y un método de ingeniería de transcripción inversa (RTE) para incorporar un promotor en el extremo 3' de un marco abierto de lectura (ORF) en la secuencia correspondiente para la transcripción inversa; y una combinación de los mismos.

35 Específicamente, el método para eliminar parcial o completamente el gen que codifica la enzima se llevó a cabo mediante el reemplazo del polinucleótido que codifica la proteína diana endógena en el cromosoma con un polinucleótido o gen marcador que tiene una eliminación parcial de las secuencias de ácido nucleico por los vectores para la inserción cromosómica dentro de las bacterias. El método para eliminar los genes mediante recombinación homóloga puede usarse como el método para eliminar genes parciales o completos.

40 Como se indicó anteriormente, el término "parcial" puede variar en dependencia de los tipos de polinucleótidos, pero puede ser específicamente de 1 a 300, con mayor especificidad de 1 a 100, e incluso con mayor especificidad de 1 a 50, pero no se limita a los mismos.

45 Como se indicó anteriormente, el término "recombinación homóloga" se refiere a una recombinación genética que se produce a través del cruzamiento en los loci de las cadenas genéticas que tienen homología entre sí.

50 Específicamente, el método para modificar las secuencias de control de la expresión se llevó a cabo mediante la inducción de las modificaciones en las secuencias de ácido nucleico de las secuencias de control de la expresión mediante eliminación, inserción, sustitución no conservadora o conservadora, o la combinación de las mismas, o reemplazándolas con promotores significativamente más débiles, etc. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores, secuencias operadoras, las secuencias que codifican regiones de unión a ribosomas y las secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción.

55 Adicionalmente, el método para modificar la secuencia del gen en el cromosoma se llevó a cabo mediante la inducción de una modificación en la secuencia mediante delección, inserción, sustitución no conservadora o conservadora, o una combinación de los mismos para disminuir aún más la actividad enzimática, o reemplazándola con la secuencia de genes que se mejoraron para que tengan una actividad más débil o la secuencia de genes que se mejoraron para que no tengan actividad.

60 En una modalidad ilustrativa de la presente invención, se confirmó que varias *Escherichia coli* que producen triptófano en las que *yigL* que codifica la fosfatasa correspondiente se eliminó para inactivar la actividad endógena de la fosfatasa representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, aumentó la capacidad de producción de L-triptófano en comparación con las cepas parentales en las que *yigL* no se eliminó, lo que confirma que los microorganismos del género *Escherichia* que producen L-triptófano, en donde el microorganismo se modificó para inactivar la actividad de fosfatasa endógena, pueden producir L-triptófano de forma efectiva.

65

En la presente invención, el microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano se refiere a un microorganismo que puede producir L-triptófano a partir de fuentes de carbono en los medios. Además, el microorganismo productor de L-triptófano puede ser un microorganismo recombinante. Específicamente, los tipos no están particularmente limitados siempre que se pueda producir L-triptófano, pero el microorganismo puede pertenecer al género *Enterbacter*, al género *Escherichia*, al género *Erwinia*, al género *Serratia*, al género Providencia, al género *Corynebacterium*, y al género *Brevibacterium* y específicamente el género *Escherichia*.

Con mayor especificidad, el microorganismo del género *Escherichia* puede ser *Escherichia coli*, pero el microorganismo del género *Escherichia* que tenga aumentada la capacidad de producción de L-triptófano debido a la inactivación de la actividad fosfatasa puede incluirse sin limitación.

Específicamente, en la presente invención, la cepa parental del microorganismo del género *Escherichia*, que tiene la capacidad de producción de L-triptófano debido a la inactivación de la actividad fosfatasa, no está particularmente limitada siempre que sea un microorganismo productor de triptófano. Por ejemplo, el microorganismo productor de triptófano puede modificarse para debilitar o inactivar una actividad del gen en vías competitivas, la de reguladores en las vías direccionales del operón triptófano, la del importador de triptófano y la del gen de entrada y descomposición de triptófano y/o sobreexpresar la actividad del operón triptófano. El método para debilitar o inactivar la activación es el mismo que el descrito anteriormente, y se pueden incluir métodos conocidos sin limitación. Además, los métodos conocidos para la sobreexpresión de la actividad del operón triptófano se incluyen sin limitación, pero los ejemplos pueden incluir un método para inserción adicional de secuencias de genes parciales o completas de genes o polinucleótidos del operón que contienen las regiones de control de la expresión introducidas desde el exterior en los cromosomas, un método para aumentar el número de copias mediante la introducción en el sistema vector; sustitución de las regiones de control de la expresión que controlan la expresión génica por otras secuencias de control; modificaciones en donde se induce una modificación en secuencias de genes parciales o completas en las regiones de control de la expresión; y potenciación de la actividad del operón mediante la introducción de modificaciones del propio gen, pero los ejemplos no se limitan a ello. Específicamente, puede ser *Escherichia coli* en la que los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y/o *tnaAB* se eliminaron parcial o completamente y/o se ha sobreexpresado el operón triptófano.

En la presente invención, además de los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB*, operones de triptófano, y secuencias de proteínas codificadas por estos, las secuencias de genes y las secuencias de proteínas usadas para la presente invención pueden recuperarse de bases de datos conocidas (es decir, GenBank de NCBI, etc.), pero los ejemplos no se limitan a ello. Además, se puede hacer referencia a información detallada sobre los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB*, etc., a partir de los contenidos descritos en la patente coreana núm. 10-0792095 y en la publicación de patente coreana núm. 10-2013-0082121.

Con respecto a la presente invención, como resultado de la inactivación de la actividad fosfatasa en diversas cepas parentales, en el caso del microorganismo del género *Escherichia* productor de L-triptófano, se confirmó que la producción de L-triptófano mejoró significativamente cuando la actividad fosfatasa se inactivó independientemente de los tipos de cepas parentales.

En la presente invención, se proporciona un método para producir L-triptófano que incluye el cultivo del microorganismo modificado del género *Escherichia* que produce L-triptófano en un medio, en donde está inactivada una actividad de la fosfatasa representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y recuperar L-triptófano del microorganismo cultivado y del medio.

Cualquier medio o condiciones de cultivo puede usarse sin limitación para cultivar el microorganismo siempre que sea un medio convencional usado para cultivar el microorganismo del género *Escherichia*, pero específicamente, el microorganismo puede cultivarse en medios convencionales que contengan fuentes de carbono adecuadas, fuentes de nitrógeno, fuentes de fósforo, compuestos inorgánicos, aminoácidos y/o vitaminas, etc., bajo condiciones aeróbicas con control de la temperatura, pH, etc.

En la presente invención, las fuentes de carbono pueden incluir carbohidratos, tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, sorbitol, etc.; alcoholes tales como alcoholes de azúcar, glicerol, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido cítrico, etc.; y aminoácidos tales como ácidos orgánicos, ácido glutámico, metionina, lisina, etc. Además, las fuentes nutricionales orgánicas naturales, tales como hidrolizados de almidón de maíz, melaza, salvado de arroz, yuca, residuos de caña de azúcar y licor de maíz macerado y específicamente, pueden usarse carbohidratos, como glucosa, puede usarse melaza preprocesada estéril (es decir, melaza transformada en azúcares reductores, etc.), y puede usarse ampliamente sin limitación una cantidad adecuada de fuentes de carbono además de la lista. Estas fuentes de carbono pueden usarse solas o en combinación de al menos dos tipos, pero no se limitan a ello.

Para las fuentes de nitrógeno, pueden usarse fuentes de nitrógeno inorgánico, tales como amoníaco, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, nitrato de amonio, etc.; aminoácidos, tales como ácido glutámico, metionina, glutamina, etc.; y fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, NZ-amina, extractos de carne, extractos de levadura, extractos de malta, licor de maíz macerado,

hidrolizados de caseína, pescado o el producto de descomposición del mismo, y torta de soja desgrasada o el producto de descomposición del mismo. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación de al menos dos tipos, pero no se limitan a ello.

5 Para las fuentes de fósforo, pueden incluirse fosfato monopotásico, fosfato dipotásico, las correspondientes sales que contienen sodio, etc. Para compuestos inorgánicos, pueden usarse cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de hierro, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sulfato de manganeso, carbonato de calcio, etc., y además, pueden incluirse aminoácidos, vitaminas, precursores apropiados, etc. Estos medios o precursores pueden añadirse a los productos de cultivo como un cultivo en lotes o cultivo continuo.

10 En la presente invención, durante el cultivo de microorganismos, pueden añadirse compuestos tales como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, etc. a los productos de cultivo mediante métodos apropiados con el fin de regular el pH de los productos de cultivo. Además, en el proceso de cultivo, pueden usarse agentes antiespumantes tales como éter poliglicólico de ácido graso para inhibir la formación de espuma. Además, puede inyectarse oxígeno o un gas que contiene oxígeno en el producto de cultivo para mantener las condiciones aeróbicas de los 7 productos de cultivo, o se pueden inyectar gases de nitrógeno, hidrógeno y dióxido de carbono o puede no inyectarse gases para mantener las condiciones anaeróbicas y microaerofílicas.

15 La temperatura de los productos de cultivo puede oscilar específicamente entre 27 °C y 40 °C, con mayor especificidad entre 30 °C y 37 °C, pero no se limita a ello. El cultivo puede continuarse hasta que se recupere el rendimiento de producción deseado de los productos útiles, y se puede continuar específicamente durante 10 horas a 100 horas, pero no se limita a ello.

20 El paso anterior para recuperar L-triptófano puede recuperar el L-triptófano deseado del microorganismo cultivado y el medio de cultivo mediante el uso de los métodos de cultivo de la presente invención, por ejemplo, cultivo en lotes, cultivo continuo, cultivo en lotes con alimentación, etc., basado en los métodos apropiados conocidos en el campo técnico. El paso de recuperación puede incluir un proceso de purificación. El proceso de purificación puede purificar el L-triptófano recuperado mediante el uso de los métodos apropiados conocidos en la técnica.

25 [Modo de llevar a cabo la invención]

En lo adelante, la presente invención se describirá en detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos tienen únicamente propósitos ilustrativos, y el alcance de la presente invención no se limita a estos ejemplos, sino que está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

35 Ejemplo 1: Preparación de una cepa de tipo salvaje deficiente en fosfatasa

En este ejemplo, se preparó una cepa en donde se inactivó la actividad de la fosfatasa a partir de una cepa productora de triptófano.

40 El gen *yigL*, que se predijo que codificaría la fosfatasa, se eliminó mediante recombinación homóloga en la cepa W3110 *trpΔ2* (publicación de solicitud de patente coreana núm. 10-2013-0082121), donde el gen *pheA* (ID del gen NCBI: 12934467) que codifica la corismato mutasa/prefenato deshidratasa (CM-PDT), el gen *tnaA* (ID del gen NCBI: 12933600) que codifica la triptofanasa y el gen *tnaAB*, que son formas de operón del gen *tnaB* (ID de gen NCBI: 12933602) que codifica el importador de triptófano, se eliminaron de la cepa W3110, que es una cepa de tipo salvaje de *Escherichia coli*, un microorganismo representativo del género *Escherichia*, con el fin de mejorar la capacidad de producción de triptófano.

45 Específicamente, se usó un método de inactivación de un paso que involucra la recombinasa roja lambda desarrollado por Datsenko KA, etc. Se usó para eliminar el gen *yigL* que contiene las secuencias de genes de SEQ ID NO: 2 (Proc Natl Acad Sci USA, (2000) V97, pp6640-6645). En cuanto a los marcadores para confirmar la inserción en los genes, los promotores *rmf* se ligaron a pUC19 (New England Biolabs (USA)), y se usaron los genes de cloranfenicol de pUCprmfloxP, que se recuperó por ligación del casete 1oxP-CmR-1oxP mutado recuperado por pACYC184 (New England Biolab), (publicación de patente coreana núm. 10-2009-0075549).

50 Primeramente, el pUCprmfloxP se designó como molde mediante el uso de la combinación de cebadores de SEQ ID NOS: 3 y 4 que contienen el gen *yigL* parcial y las secuencias de genes parciales del gen pUCprmfloxP de resistencia al cloranfenicol. Luego,  $\Delta yigL1st$ , un producto de reacción en cadena de la polimerasa (en lo adelante, 'PCR') de aproximadamente 1,2 kb se recuperó mediante la PCR primaria, que repitió 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto. Posteriormente, el  $\Delta yigL1st$ , el producto de PCR de aproximadamente 1,2 kb recuperado de la PCR, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, se eluyó y se usó como molde para la PCR secundaria. Durante la PCR secundaria, se recuperó  $\Delta yigL$ , un producto de PCR de aproximadamente 1,3 kb, mediante la repetición de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto mediante el uso de la combinación de cebadores de SEQ ID NOS: 5 y 6 que contienen 20 pb de las secuencias de genes en las regiones 5' y 3' de los productos de PCR que se recuperaron de la PCR primaria,

mientras se usan los productos de PCR primarios eluidos como molde. El producto de PCR así recuperado se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, se eluyó y se usó para recombinación.

5 Se preparó *Escherichia coli* W3110 trpΔ2 transformada en vector pKD46 en un estado competente de acuerdo con el método de inactivación de un paso (Proc Natl Acad Sci USA., (2000) V97, pp. 6640-6645) desarrollado por Datsenko KA, etc. y luego se transfeció por los fragmentos ΔyigL de 1,3 kb de longitud recuperados de las PCR primaria y secundaria. Posteriormente, se cultivaron en medios LB que contenían cloranfenicol y se seleccionaron los transfectantes primarios que tenían resistencia al cloranfenicol.

10 Después de eliminar pKD46 de las cepas recombinantes primarias así recuperadas que tenían resistencia al cloranfenicol, los genes marcadores de cloranfenicol se eliminaron de las bacterias (Gene, (2000) V247, págs. 255-264) mediante la introducción de vectores pJW168 (Gene, (2000) V247, pp255-264). Se confirmó que el gen yigL se eliminó mediante productos de PCR de aproximadamente 0,6 kb recuperados de las bacterias finalmente recuperadas mediante la PCR, mediante el uso de los cebadores de SEQ ID NOS: 7 y 8, y se nombró como W3110 trpΔ2 yigL.

Las secuencias de cebadores usadas en el Ejemplo se muestran en la Tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO
yigL-Cm-R2	ttgcgtctgatttagatggcacgttacttctcccgaccatacgttatcctagtgatctgatgggtacc	3
25 yigL-R1	cccagcggaaaccgctctacagaggtttaaattcttatgtaccaggttggtgcgtctgatttagatggc	4
yigL-Cm-F2	ccattgtagcgaagtatcaggttgacaactgaccaataaagaacgattaaggtgacactat agaacgcg	5
yigL-F 1	tggtgatgataagtagcgccacaatggaaaactttgattaacgggtatccattgtagcgaagtatcag	6
30 yigL conF1	aaccgcatgcatgaccgttt	7
yigL conR1	atatacaggccgaccgttt	8

35 Ejemplo 2: Producción de cepas productoras de triptófano con fosfatasa inactivada

En este ejemplo, el gen yigL, que se predijo que codifica la fosfatasa, se eliminó mediante recombinación homóloga como se describe en el método del Ejemplo 1, mientras que tiene KCCM11166P (patente coreana núm. 10-1261147), que es otra *Escherichia coli* representativa que produce triptófano, como una cepa parental.

40 Se confirmó que el gen yigL se eliminó mediante productos de PCR de aproximadamente 0,6 kb recuperados de las bacterias finalmente recuperadas a través de la PCR mediante el uso de los cebadores de SEQ ID NOS: 7 y 8, y se nombró como CA04-2803.

45 Ejemplo 3: Evaluación de la productividad de triptófano de cepas de tipo salvaje deficientes en el gen yigL

Se introdujeron pCL-Dtrp\_att-trpEDCBA y pBAC-Dtrp\_att-trpDCBA en cada cepa mediante métodos de transformación para comparar la productividad de triptófano entre W3110 trpΔ2 yigL producida en el Ejemplo 1 y W3110 trpΔ2, que es una cepa parental. Los vectores introducidos fueron los vectores que tenían mejorada la expresión de operones de triptófano para la sobreproducción de triptófano mediante la liberación del mecanismo de control en las regiones de control del operón de triptófano (publicación de patente coreana núm. 10-2013-0082121). Las cepas con vectores introducidos se cultivaron en el medio de prueba de triptófano que se preparó de acuerdo con la composición de la Tabla 2 y se compararon sus actividades productoras de L-triptófano.

55

60

65

[Tabla 2]

Composición del medio de prueba de triptófano	
Composición	Conc. (por litro)
Glucosa	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12 g
NaCl	1 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	5 g
MgSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1 g
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	15 mg
CuSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3 mg
ZnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	30 mg
Citrato de sodio	1 g
Extracto de levadura	1 g
Fenilalanina	0,15 g
pH	6,8

Las cepas, que se cultivaron durante la noche en medio sólido LB en una incubadora a 37 °C, se inocularon en 25 mL del medio de prueba de la Tabla 2 mediante un asa de platino, respectivamente, y se cultivaron durante 48 horas en una incubadora a 37 °C a 200 rpm. Luego, se compararon las concentraciones de triptófano (Tabla 3).

[Tabla 3]

Cepa	Conc. de Triptófano (g/L)
W3110 trpΔ2 / pCL-Dtrp_att-trpEDCBA, pBAC-Dtrp_att-trpDCBA	0,5
W3110 trpΔ2 yigL / pCL-Dtrp_att-trpEDCBA, pBAC-Dtrp_att-0.8 trpDCBA	0,8

Los resultados anteriores muestran que la cepa en la que se inactivó la actividad de la fosfatasa codificada por el gen yigL mostró un aumento del 60 % en la productividad de triptófano en comparación con la cepa en la que no se inactivó la activación de la fosfatasa. Se confirmó que la productividad del triptófano podría mejorarse mediante la inactivación de la fosfatasa, que está codificada por yigL. Esto podría interpretarse en el sentido de que la biosíntesis de triptófano aumentó debido al aumento en la concentración de PLP, el que juega un papel crucial como una coenzima importante para la biosíntesis de triptófano, debido a la inactivación de la fosfatasa, que está codificada por yigL.

Ejemplo 4: Evaluación de la productividad de triptófano de cepas deficientes en el gen yigL

Para medir el título de triptófano de la cepa deficiente en yigL (CA04-2803) producida en el Ejemplo 2 y KCCM11166P, que es la cepa parental, la cepa se cultivó en medio de titulación de triptófano que se preparó de acuerdo con la composición de la Tabla 4 que se muestra a continuación. Luego, se confirmó la eficiencia mejorada de producción de L-triptófano.

[Tabla 4]

Composición del medio de titulación de triptófano	
Composición	Conc. (por litro)
Glucosa	60 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g
NaCl	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
Citrato de sodio	5 g 14
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	40 g
Citrato de sodio	5 g
Fenilalanina	0,15 g
Tirosina	0,1 g
pH	6,8

Las cepas de *Escherichia coli*, KCCM 11166P y CA04-2803, que se cultivaron durante la noche en medio sólido LB en una incubadora a 37 °C, se inocularon en los medios de titulación de 25 mL de la Tabla 4 mediante un asa de platino, respectivamente, y se cultivaron durante 48 horas en una incubadora a 37 °C a 200 rpm. Luego, se compararon la velocidad de consumo de glucosa y las concentraciones de triptófano.

Como resultado, como se indica en la Tabla 5 que se muestra a continuación, la concentración de triptófano de CA04-2803, que es una cepa con fosfatasa inactivada codificada por el gen *yigL*, mostró un aumento en la concentración de triptófano de aproximadamente un 30 %, en comparación con el control, KCCM11166P.

[Tabla 5]

Cepa	Conc. de Triptófano (g/L)
KCCM11166P	7,48
CA04-2803	9,62

Los presentes inventores confirmaron que la productividad de triptófano se incrementó en las cepas inactivadas que son deficientes en *yigL* que codifica la fosfatasa y se basan en la cepa KCCM11166P. Las cepas se nombraron "CA04-2803" o "CA04-2803 (KCCM11166P\_Δ*yigL*)" y se depositaron en el Centro de cultivo de microorganismos de Corea, reconocido como una autoridad depositaria internacional en virtud del Tratado de Budapest el 5 de diciembre de 2014, con el número de acceso, KCCM11635P.

Los resultados anteriores sugieren que la productividad de L-triptófano aumentó más en la cepa con la actividad fosfatasa inactivada, en comparación con la cepa sin inactivación de la fosfatasa, en el microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano. Además, tales resultados con respecto al aumento en la producción de triptófano son causados por la inactivación de la fosfatasa codificada por *yigL* y se considera que son causados por la función inactivada de la PLP fosfatasa, que es una de las funciones previstas de la fosfatasa codificada por el gen. Esto es muy probable debido al aumento de la concentración de PLP intracelular.

Sin embargo, las modalidades ilustrativas descritas en esta descripción son únicamente para propósitos ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención. La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> MICROORGANISMO DEL GÉNERO DE ESCHERICHIA QUE TIENE ACTIVIDAD PRODUCTORA DE L-TRIPTÓFANO Y MÉTODO PARA PRODUCIR L-TRIPTÓFANO MEDIANTE EL USO DEL MISMO.

ES 2 876 949 T3

<130> OPA16039-PCT  
 <150> KR 10-2015-0067660  
 <151> 2015-05-14  
 5 <160> 8  
 <170> KopatentIn 2.0  
 10 <210> 1  
 <211> 266  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia  
 15 <400> 1  
 Met Tyr Gln Val Val Ala Ser Asp Leu Asp Gly Thr Leu Leu Ser Pro  
 1 5 10 15  
 20 Asp His Thr Leu Ser Pro Tyr Ala Lys Glu Thr Leu Lys Leu Leu Thr  
 20 25 30  
 Ala Arg Gly Ile Asn Phe Val Phe Ala Thr Gly Arg His His Val Asp  
 35 40 45  
 25 Val Gly Gln Ile Arg Asp Asn Leu Glu Ile Lys Ser Tyr Met Ile Thr  
 50 55 60  
 30 Ser Asn Gly Ala Arg Val His Asp Leu Asp Gly Asn Leu Ile Phe Ala  
 65 70 75 80  
 His Asn Leu Asp Arg Asp Ile Ala Ser Asp Leu Phe Gly Val Val Asn  
 85 90 95  
 35 Asp Asn Pro Asp Ile Ile Thr Asn Val Tyr Arg Asp Asp Glu Trp Phe  
 100 105 110  
 Met Asn Arg His Arg Pro Glu Glu Met Arg Phe Phe Lys Glu Ala Val  
 115 120 125  
 40 Phe Gln Tyr Ala Leu Tyr Glu Pro Gly Leu Leu Glu Pro Glu Gly Val  
 130 135 140  
 45 Ser Lys Val Phe Phe Thr Cys Asp Ser His Glu Gln Leu Leu Pro Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Gln Ala Ile Asn Ala Arg Trp Gly Asp Arg Val Asn Val Ser Phe  
 165 170 175  
 50 Ser Thr Leu Thr Cys Leu Glu Val Met Ala Gly Gly Val Ser Lys Gly  
 180 185 190  
 His Ala Leu Glu Ala Val Ala Lys Lys Leu Gly Tyr Ser Leu Lys Asp  
 195 200 205  
 55 Cys Ile Ala Phe Gly Asp Gly Met Asn Asp Ala Glu Met Leu Ser Met  
 210 215 220  
 60 Ala Gly Lys Gly Cys Ile Met Gly Ser Ala His Gln Arg Leu Lys Asp  
 225 230 235 240



ES 2 876 949 T3

	gatgggtacc	70
5	<210> 4 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador yigL-R1	
	<400> 4	
15	cccagcggaa accgctctac agaggtttaa atttcttatg taccaggttg ttgcgtctga	60
	tttagatggc	70
20	<210> 5 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador yigL-Cm-F2	
	<400> 5	
30	ccattgtagc gaagtatcag gttgacaact gaccaaataa agaacgatta aggtgacact	60
	atagaacgcg	70
35	<210> 6 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador yigL-F1	
	<400> 6	
45	tggtgatgat aagtagcgcc acaatggaaa actctttgat taacgggtat ccattgtagc	60
50	gaagtatcag	70
55	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador yigL conF1	
60	<400> 7	
65	aaccgcatgc atgaccgttt	20

# ES 2 876 949 T3

<210> 8  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Cebador yigL conR1

10 <400> 8

atatacaggc cgaccgtttt

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir L-triptófano, que comprende:
  - 5 (i) cultivar un microorganismo modificado del género *Escherichia* que produce L-triptófano en donde la actividad de una fosfatasa que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 está inactivada, en un medio; y
  - (ii) recuperar el L-triptófano del microorganismo cultivado y del medio.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo del género *Escherichia* es *Escherichia coli*.