

Ejemplo 8

Aplicaciones y manipulaciones adicionales de *orf24* y/o *orf18* para mejorar las cepas productoras de enduracidina

Además de los ejemplos proporcionados anteriormente, hay otras formas posibles de utilizar los roles reguladores de *orf24* y *orf18* para mejorar la producción de enduracidina.

i. Expresión de *orf24* bajo un promotor de sobreexpresión alternativo, constitutivo o inducible

pXY152-endorf24 (mostrado en la FIG. 2) se construyó para la expresión ectópica integradora de *orf24* bajo el control de ermE*p, un estreptomiceto ampliamente utilizado como el promotor de la expresión constitutivo fuerte. La sobreexpresión de *orf24* también puede ser impulsada por otros promotores constitutivos o inducibles. El promotor tipA es un promotor de estreptomicetos de sobreexpresión inducible por tiostrepton. Se desarrolló un plásmido de lanzadera de *E. coli-Streptomyces* con el promotor tipA multicopia, pXY200, que se ha utilizado con éxito para la sobreexpresión de genes de estreptomicetos. Para aplicaciones relevantes a esta descripción, el promotor tipA puede escindirarse de pXY200 y clonarse en pXY152 para reemplazar ermE*p y dirigir la expresión de *orf24*. Del mismo modo, *orf24* puede transferirse fácilmente de pXY152-endorf24 a pXY200 para la expresión basada en plásmidos. Otras opciones de promotores incluyen, pero sin limitarse a, el sistema P(nitA)-NitR y el promotor de estreptomicetos SF14. Recientemente, el plásmido integrador pKC1139 y el promotor nativo del gen resistente a la apramicina se utilizaron con éxito para expresar genes reguladores para la hiperproducción del antibiótico peptídico teicoplanina. El gen regulador sanG codifica un activador específico a la vía para la producción de nikomicina. La expresión de una copia adicional de sanG bajo el control de cinco promotores diferentes (P_{hrdB} , P_{tcp830} , P_{SF14} , P_{ermE^*} y P_{neos}) llevó a aumentos en los rendimientos de nikomicina en un 69%, 51%, 26%, 22% y 13%, respectivamente (véase Du, Applied Microbiology and Biotechnology 97: 6383-6396, 2013).

ii. Cepas mutantes dobles de *S. fungicidicus* con eliminación de *orf18* y sobreexpresión de *orf24*

Tanto con el mutante de delección *orf18* como con las cepas de sobreexpresión *orf24* que exhiben una mayor producción de enduracidina, se puede generar un doble mutante que contenga ambos y si se observa un efecto aditivo sobre el rendimiento de este antibiótico peptídico. Se puede crear el mutante doble introduciendo el plásmido de sobreexpresión