

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 559 193**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2009 E 09164073 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2147972**

(54) Título: **Procedimiento para la obtención de L-triptófano bajo empleo de cepas mejoradas de la familia Enterobacteriaceae**

(30) Prioridad:

11.07.2008 DE 102008040352

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.02.2016

(73) Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
RELLINGHAUSER STRASSE 1-11
45128 ESSEN, DE**

(72) Inventor/es:

**RIEPING, MECHTHILD y
DUSCH, NICOLE**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

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

ES 2 559 193 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

Procedimiento para la obtención de L-triptófano bajo empleo de cepas mejoradas de la familia Enterobacteriaceae

La presente invención se refiere a variantes resistentes a retroalimentación de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa (DAHP-sintasa), a microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae que contienen estos enzimas, así como su empleo para la obtención por fermentación de compuestos químicos orgánicos.

5 Estado de la técnica

Compuestos químicos orgánicos, en especial L-aminoácidos aromáticos, encuentran aplicación en medicina humana y en industria farmacéutica, en la industria de productos alimenticios y en la alimentación animal.

10 Si a continuación se mencionan compuestos químicos orgánicos, con ello se indica uno o varios compuestos seleccionados a partir del grupo de compuestos de la vía metabólica del shikimato, como los L-aminoácidos aromáticos, L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptófano, corismato, enterobactina, menaquinona, tetrahidrofolato y ubiquinona. Son preferentes los L-aminoácidos aromáticos, son especialmente preferentes L-triptófano y L-fenilalanina.

15 Es sabido que los compuestos químicos orgánicos se obtienen mediante fermentación de cepas de Enterobacteriaceae, en especial *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*. Debido al gran significado se trabaja constantemente en la mejora de procedimientos de obtención. Mejoras de procedimiento pueden afectar a medidas técnicas de fermentación, como por ejemplo agitación y abastecimiento con oxígeno, o la composición de medios nutريentes, como por ejemplo la selección del azúcar empleado, o la concentración de azúcar durante la fermentación, o la elaboración para dar la forma de producto, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio 20 iónico, o las propiedades de rendimiento intrínsecas del propio microorganismo.

En cepas de tipo salvaje, los mecanismos de regulación estrictos impiden la producción, que excede la demanda propia, de productos metabólicos, como aminoácidos, y su emisión al medio. Por consiguiente, la construcción de cepas que sobreproducen compuestos químicos orgánicos desde el punto de vista del fabricante requieren superar estas regulaciones metabólicas.

25 Para la eliminación de los mecanismos de control y la mejora de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos se aplican métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. De este modo se obtienen cepas que producen metabolitos resistentes contra antimetabolitos, como por ejemplo el análogo de treonina ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV) o significativos para la regulación desde el punto de vista auxótirofo, y L-aminoácidos, como por ejemplo L-treonina. Por ejemplo una cepa que produce L-triptófano está caracterizada por 30 resistencia contra el análogo de triptófano 5-metil-D,L-triptófano (5-MT).

35 Desde hace algunos años se emplean igualmente métodos de técnica de ADN recombinante para la mejora de cepa selectiva de cepas que producen L-aminoácidos de la familia Enterobacteriaceae, amplificándose, por ejemplo, genes biosintéticos de aminoácidos aislados, o modificándose las propiedades de genes especiales, y analizándose la repercusión sobre la producción. Se pueden encontrar informaciones sinópticas sobre biología celular y molecular de *Escherichia coli* y *Salmonella* en Neidhardt (ed): *Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology*, 2^a edición, ASM Press, Washington, D.C. USA, (1996). Una síntesis sobre el metabolismo y la producción de L-treonina es publicada por Debabov (Advances in Biochemical Engineering vol. 79, 113-136 (2003)).

40 La vía metabólica del shikimato para la síntesis de, entre otros, corismato, enterobactina, menaquinona, tetrahidrofolato, ubiquinona y los aminoácidos aromáticos, está fuertemente regulada. La biosíntesis de compuestos aromáticos se regula en *E. coli* tanto en el plano genético mediante atenuación y represión, como también mediante inhibición del producto final de enzimas (Frost und Draths, Annual review of microbiology, 49:557-79 (1995); Pittard, Genes to Cells 1 (8): 717-25 (1996)). A través de esta vía se adapta la producción de metabolitos aromáticos exactamente a la demanda de la célula. La vía del ácido shikímico se regula sobre todo mediante el control de la reacción de partida, que se cataliza mediante tres diferentes isoenzimas de DAHP-sintasa (codificados por los genes 45 aroF, aroG y aroH). El producto génico de AroG constituye en *E. coli* un 80 % de la actividad total de todas las DAHP-sintasas (Tribe et al., Journal of Bacteriology 127 (3): 1085-1097 (1976); Pittard, Genes to Cells 1 (8): 717-25 (1996)); AroG se inhibe mediante el aminoácido aromático L-fenilalanina en un 95 %. AroF se inhibe igualmente en un 95 % mediante L-tirosina, mientras que AroH se puede inhibir hasta un 60 % mediante L-triptófano (Camakaris und Pittard, Journal of Bacteriology 120(2): 590-7 (1974)). Ya que AroH se inhibe sólo parcialmente mediante L-triptófano, la vía de ácido shikímico tampoco se inhibe completamente a altas concentraciones de los tres aminoácidos aromáticos, de modo que mediante la actividad residual que permanece se puede formar aún algo de ácido corísmico, que se encuentra disponible entonces para otras vías de biosíntesis. En el plano genético, el

regulador TyrR reprime la transcripción de aroG en presencia de fenilalanina y triptófano (Baseggio et al., Journal of Bacteriology 172 (5): 2547-57 (1990); Davies et al., Gene 33(3): 323-31 (1985)).

La secuencia de nucleótidos de la forma salvaje del gen aroG codificante para 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa de Escherichia coli se determinó por Davies y Davidson (Nucleic Acids Research 10 (13): 4045-4058 (1982)) y se encuentra disponible generalmente, incluyendo las zonas situadas en línea de entrada (upstream) y en línea de salida (downstream) en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicin (Bethesda, MD, USA) bajo el número de acceso (accession number) NC000913 (Region: 784.856 > 785.908 y upstream/downstream).

En la solicitud de patente EP 1 270 721 se describe la adecuada acción del empleo de un aroG-alelo sobre la producción y obtención de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-triptófano con cepas de la especie Escherichia, tratándose en este caso de un alelo, donde la prolina se substituye por una leucina en la posición 150. En la solicitud de patente WO2005/056776 se describen alelos en los que la valina en posición 57 está substituida por una alanina, o bien la cisteína en posición 61 está substituida por arginina. Kikuchi et al. (Applied and Environmental Microbiology 63 (2): 761-762 (1996) describen además alelos con mutaciones en las posiciones 146, 147 y 202.

Ya que la biosíntesis de compuestos químicos orgánicos de la vía metabólica del shikimato es muy compleja, se regula de múltiples maneras, y además está conectada a otras diferentes vías metabólicas en la célula, es deseable disponer de muchas variantes de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa, que se diferencien en su capacidad de inhibición a través de L-fenilalanina. Debido a la complejidad de vía biosintética no es predecible con qué variante se puede conseguir una producción mejorada de compuestos químicos orgánicos, preferentemente L-triptófano y L-fenilalanina.

Tarea de la invención

Los inventores se han planteado la tarea de poner a disposición nuevas variantes de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa que poseen una resistencia a retroalimentación incrementada en comparación con el enzima de tipo salvaje (WT) respecto a L-fenilalanina, y por consiguiente poner a disposición nuevas bases para procedimientos mejorados para la obtención por fermentación de compuestos químicos orgánicos, preferentemente L-triptófano y L-fenilalanina, con microorganismos de la familia Enterobacteriaceae.

Descripción de la invención

Son objeto de la invención alelos del gen aroG, esto es, secuencias de nucleótidos (ADN) que codifican para variantes resistentes a retroalimentación del enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa (DAHP-sintasa AroG), caracterizados porque su secuencia de aminoácidos presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, incluyendo delección y/o inserción de 1 a 20 aminoácidos, y comprende esencialmente una longitud de 350 aminoácidos, y contiene en las correspondientes secuencias de aminoácidos los intercambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 seleccionados a partir del grupo

- 35 a) intercambio de L-alanina en posición 33 por L-valina,
- b) intercambio de L-alanina en posición 33 por L-valina, e intercambio de L-serina en posición 211 por L-fenilalanina,

y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 contiene, en caso dado, adicionalmente uno o varios de los intercambios seleccionados a partir del grupo

- 40 c) intercambio de L-lisina en posición 14 por un aminoácido seleccionado a partir del grupo L-asparagina y L-glutamina, preferentemente L-asparagina,
- d) intercambio de L-valina en posición 67 por un aminoácido seleccionado a partir del grupo L-alanina, L-lisina, L-arginina y L-histidina, preferentemente L-alanina,
- 45 e) intercambio de L-treonina en posición 74 por un aminoácido seleccionado a partir del grupo L-alanina, L-lisina, L-arginina y L-histidina, preferentemente L-alanina,
- f) intercambio de ácido L-glutámico en posición 81 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo ácido L-aspártico, L-serina, L-alanina y L-treonina, preferentemente ácido aspártico,

- g) intercambio de L-lisina en posición 84 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-glutamina, L-serina, L-treonina, ácido L-glutámico, ácido L-aspártico y L-asparagina, preferentemente L-glutamina,
- h) intercambio de ácido L-aspártico en posición 85 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-alanina y glicina, preferentemente glicina,
- 5 i) intercambio de ácido L-glutámico en posición 238 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo ácido L-aspártico, L-serina, L-alanina y L-treonina, preferentemente L-alanina,
- j) intercambio de L-lisina en posición 244 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-glutamina, ácido L-glutámico, ácido L-aspártico, L-serina, L-treonina y L-asparagina, preferentemente L-glutamina,
- 10 k) intercambio de L-asparagina en posición 254 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-treonina, L-serina, ácido L-glutámico y ácido L-aspártico, preferentemente L-treonina,
- l) intercambio de L-prolina en posición 259 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-serina, L-treonina, preferentemente L-treonina,
- m) intercambio de L-alanina en posición 260 por L-prolina,
- 15 n) intercambio de L-serina en posición 272 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-cisteina y L-metionina, preferentemente L-cisteina,
- o) intercambio de L-lisina en posición 276 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-glutamina, ácido L-glutámico, ácido L-aspártico, L-serina, L-treonina y L-asparagina, preferentemente L-glutamina,
- p) intercambio de ácido L-aspártico en posición 280 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-serina, L-alanina, ácido L-glutámico y L-treonina, preferentemente ácido L-glutámico,
- 20 q) intercambio de ácido L-glutámico en posición 313 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-serina, L-alanina, ácido L-aspártico y L-treonina, preferentemente ácido L-aspártico,
- r) intercambio de ácido L-glutámico en posición 316 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-glutamina, L-serina, L-treonina, ácido L-aspártico y L-asparagina, preferentemente L-glutamina,
- s) intercambio de L-alanina en posición 319 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-treonina, L-valina y L-serina, preferentemente L-treonina,
- 25 t) intercambio de L-alanina en posición 342 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-serina, L-valina y L-treonina, preferentemente L-serina o L-valina,
- u) intercambio de L-asparagina en posición 343 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-serina, L-alanina y L-treonina, preferentemente L-alanina.
- 30 Los polipéptidos codificados poseen preferentemente una longitud correspondiente a 350 aminoácidos.
- Son preferentes polinucleótidos aislados según SEQ ID NO: 1, caracterizados por que su secuencia contiene los siguientes intercambios:
- en la posición 98 timina, o
 - en la posición 98 y 632 timina.
- 35 Además son objeto de la invención compuestos químicos orgánicos recombinantes seleccionados a partir del grupo de compuestos de la vía metabólica del shikimato, preferentemente los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae que producen L-aminoácidos aromáticos, que contienen un alelo aroG resistente a retroalimentación, que codifica para 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa, y que producen de manera acrecentada y concentran en la célula o en el medio los citados compuestos.

Son objeto de la invención preferentemente microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae que producen L-triptófano, que contienen un alelo aroG resistente a retroalimentación según la invención, que codifican para 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa, y que producen de manera acrecentada y concentran L-triptófano en la célula o en el medio.

- 5 Son igualmente objeto de la invención microorganismos de la familia Enterobacteriaceae que producen L-aminoácidos, que son resistentes frente a L-fenilalanina y que producen de manera acrecentada y concentran en la célula o en el medio L-triptófano. L-fenilalanina se emplea en general en concentraciones de \geq (mayor/igual) 2 a \leq (menor/igual) 15 mM. Como punto de partida para la comparación sirven respectivamente los microorganismos menos resistentes contra L-fenilalanina, en los que no se llevó a cabo la medida según la invención.
- 10 Del mismo modo es objeto de la invención un procedimiento para la obtención por fermentación de compuestos químicos orgánicos, seleccionados a partir de compuesto de la vía metabólica del shikimato, preferentemente de L-aminoácidos aromáticos, en especial L-triptófano, bajo empleo de microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae, que producen los citados compuestos químicos orgánicos ya antes de la pérdida de la inhibición de retroalimentación según la invención, y en los que al menos se expresa, preferentemente de manera amplificada, o se sobreexpresa, o bien se sobreexpresan, el alelo aroG o secuencias de nucleótidos que codifican su producto génico.
- 15

En este caso, entre los microorganismos que producen L-aminoácidos antes de la pérdida de inhibición de retroalimentación según la invención cuentan las cepas de tipo salvaje, y cepas de laboratorio utilizadas frecuentemente, como, entre otras, DH5 α , DH5amcr, W3110, MG1655, MC4100, Y1089, H560 y MM152.

- 20 Preferentemente se emplean los microorganismos descritos.

Si a continuación se mencionan L-aminoácidos o aminoácidos, con ello se indica uno o varios aminoácidos, incluyendo sus sales, seleccionados a partir del grupo L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-tyrosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-arginina y L-homoserina. Son especialmente preferentes L-triptófano y L-fenilalanina.

- 25 El concepto „expresión“ describe en este contexto la realización de la actividad celular de uno o varios enzimas o una o varias proteínas en un microorganismo, que codifican a través de el correspondientes ADN exprimido.

El concepto „amplificación“ describe en este contexto el aumento de la actividad intracelular o concentración de uno o varios enzimas o una o varias proteínas en un microorganismo, que codifican a través del correspondiente ADN, elevándose, a modo de ejemplo, el número de copias del gen, o bien de los genes, de ORF, o bien de los ORF, o del alelo, o bien de los alelos, en al menos una (1) copia, uniéndose funcionalmente un promotor fuerte con el gen, mutándose la región endógena de promotor y regulación o el punto de unión de ribosomas, que se encuentra en línea de entrada del gen estructural, o empleándose un gen o alelo u ORF que codifica para un correspondiente enzima, o bien una correspondiente proteína, con una actividad elevada, y en caso dado combina estas medidas.

- 35 Se entiende por „genes endógenos“ o „secuencias de nucleótidos endógenas“ los genes presentes en la población de un tipo, o marcos de lectura abiertos o alelos, o bien secuencias de nucleótidos.

40 En caso dado puede ser ventajoso llevar a cabo sólo un aumento moderado de la actividad intracelular o concentración de uno o varios enzimas o una o varias proteínas en un microorganismo, que puede conducir a un fuerte aumento, por ejemplo a una división celular errónea, o a morfología celular modificada, hasta la toxicidad (Guthrie y Wickner, Journal of Bacteriology 172(10): 5555-5562 (1990); Genevaux P. Et al.; EMBO Reports 5 (2): 195-200 (2004)).

45 El concepto „aumento moderado“ describe el aumento de la actividad intracelular o concentración de la correspondiente proteína en un máximo de 10, 8, 6, 4, 3, 2 o 1,5 veces referido a la de la proteína de tipo salvaje, o bien a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo no recombinante o cepa madre para el correspondiente enzima, o bien la correspondiente proteína. Se entiende por microorganismo no recombinante o cepa madre (parent strain) el microorganismo en el que se lleva a cabo la amplificación o la sobreexpresión según la invención.

50 El número de copias del alelo aroG según la invención se aumenta preferentemente en un máximo de ocho (8) copias, de modo especialmente preferente en un máximo de cuatro (4) copias. Tal expresión moderada se puede conseguir, por ejemplo, mediante el empleo de plásmidos con genes controlados con alelo lac^Q (Glascock y Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)) sin inducción mediante adición de IPTG, que conduce a una expresión muy

débil del gen aroG clonado sin promotor propio. El inicio de transcripción del gen aroG se localizó 40 pares de bases antes del codón iniciador ATG (Baseggio et al., *Journal of Bacteriology* 172(5): 2547-2557 (1990)), y se transfirió al plásmido no junto con la secuencia de nucleótidos que codifica para DAHP-sintasa.

Para la generación de mutaciones de aroG, que se emplean en los microorganismos utilizados para el procedimiento según la invención, se pueden emplear, entre otros, métodos para mutagénesis orientada descritos en el estado de la técnica.

Se pueden emplear procedimientos de mutagénesis orientada bajo empleo de oligonucleótidos mutágenos (T.A. Brown: *Gentechnologie für Einsteiger*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1993), o la reacción en cadenas de polimerasa (PCR), como se describe en el manual de Gait: *Oligonucleotide synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, UK, 1984), o de Newton y Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994). Para la construcción de mutaciones en el gen aroG se puede emplear, por ejemplo, el Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit de la firma Stratagene (Amsterdam, Holanda). En el caso de empleo de estos métodos, el gen aroG descrito en el estado de la técnica, partiendo de ADN total aislado de una cepa de tipo salvaje, se amplifica con ayuda de la reacción en cadenas de polimerasa (PCR), se clona en vectores plásmidos apropiados, y el ADN se somete a continuación al procedimiento de mutagénesis. Por medio de „GeneSOEing“ (Gene Splicing by Overlap Extension, Horton, *Molecular Biotechnology* 3: 93-98 (1995)) se pueden obtener las mutaciones puntuales ya por medio de PCR. Las mutaciones generadas se pueden determinar y verificar por medio de secuenciación de ADN, a modo de ejemplo según el método de Sanger et al. (*Proceedings of the National Academy of Science USA* 74 (12): 5463-5467 (1977)).

Los alelos generados se pueden incorporar en cepas apropiadas, a modo de ejemplo, mediante transformación y el procedimiento de intercambio de genes, o bien alelos.

Un método común es el método de intercambio de genes descrito por Hamilton et al. (*Journal of Bacteriology* 174: 4617-4622 (1989)), con ayuda de un derivado de pSC101 replicante condicionalmente, pMAK705 o con PK03 (Link et al., *Journal of Bacteriology* 179: 6228-6237). Otros métodos descritos en el estado de la técnica, como por ejemplo el de Martinez-Morales et al. (*Journal of Bacteriology* 1999, 7143-7148 (1999)) o el de Boyd et al. (*Journal of Bacteriology* 182, 842-847 (2000)) se pueden utilizar del mismo modo.

Es igualmente posible transformar los alelos generados en diversas cepas mediante conjugación o transducción.

Se encuentran explicaciones más detalladas sobre los conceptos de genética y biología molecular en métodos conocidos de genética y biología molecular, como por ejemplo el método de Birge (*Bacterial and Bacteriophage Genetics*, 4^a ed., editorial Springer, New York (USA), 2000) o el método de Berg, Tymoczko and Stryer (*Biochemistry*, 5^a ed., Freeman and Company, New York (USA), 2002) o el método de Sambrook et al. (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, (set de 3 volúmenes), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001).

Para la consecución de una sobreexpresión se puede aumentar, a modo de ejemplo, el número de copias de los correspondientes genes o marcos de lectura abiertos, o se puede mutar la región de promotor o regulación o el punto de unión de ribosomas, que se encuentra en línea de entrada arriba del gen estructural. Del mismo modo actúan cassettes de expresión que se incorporan en línea de entrada del gen estructural. Mediante promotores inducibles es posible adicionalmente aumentar la expresión en el transcurso de la producción de L-triptófano por fermentación, por lo demás también puede ser ventajoso el empleo de promotores para la expresión génica, que posibilitan otra expresión génica temporal. En el plano de la regulación translacional de la expresión génica es posible aumentar la frecuencia de iniciación (adición de ribosoma al m-ARN), o la velocidad de elongación (fase de prolongación). Mediante medidas para la prolongación del período de vida de m-ARN se mejora igualmente la expresión. Además, impidiendo la degradación de la proteína enzimática se amplifica igualmente la actividad enzimática. Los genes, ORFs o elementos génicos, se pueden presentar en plásmidos con diferente número de copias, o estar integrados y amplificados en el cromosoma. Además se puede emplear alternativamente una sobreexpresión de los respectivos genes mediante modificación de la composición del medio y control de cultivo.

En el estado de la técnica se describen extensamente métodos de sobreexpresión, a modo de ejemplo en Makrides et al (*Microbiological Reviews* 60 (3), 512-538 (1996)). Mediante empleo de vectores se aumenta el número de copias en al menos uno (1). Como vectores se pueden emplear igualmente fagos, a modo de ejemplo el fago Mu, como se describe en el documento EP 0332448, o el fago lambda (λ) También se puede conseguir un aumento del número de copias al incorporarse una copia adicional en otro punto del cromosoma, a modo de ejemplo en el sitio att del fago λ (Yu y Court, *Gene* 223, 77-81 (1998)). En el documento 5 939 307 se describe que mediante incorporación de cassettes de expresión o promotores, como por ejemplo promotor tac, promotor trp, promotor lpp o

promotor P_L y promotor P_R del fago λ , a modo de ejemplo aguas arriba de treoninoperona cromosómica, se pudo conseguir un aumento de la expresión. Se pudo mostrar que el promotor tac es 3 veces más fuerte que el promotor trp y 10 veces más fuerte que el promotor lac (de Boer et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 80: 21-25 (1983)). Del mismo modo se pueden emplear los promotores del fago T7, los promotores gear-

5 box, el promotor nar, o los promotores de los genes rrsG, rnpB, csrA, csrB, ompA, fusA, pepQ, rplX o rpsG. Tales
cassettes de expresión o promotores se pueden emplear también para sobreexpresar genes unidos a plásmido,
como se describe en el documento EP 0 593 792. Mediante empleo del alelo lac^Q se puede controlar a su vez la
expresión de fusiones promotor lac-gen (Glascock y Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)), el empleo de estos
10 plásmidos sin inducción debida a adición de IPTG conduce a una expresión muy débil de genes clonados sin
promotor propio. Además es posible que la actividad de promotores se aumente mediante modificación de su
secuencia por medio de uno o varios intercambios de nucleótidos, mediante inserción (inserciones) y/o delección
(deleciones). El intercambio del promotor por un promotor, determinado por ejemplo en análisis de expresión
15 comparativos en extensión genómica, con expresión uniformemente elevada en el transcurso de un proceso de
fermentación, ocasiona una amplificación uniforme. Otra expresión génica temporal se puede conseguir como se
describe en Walker et al. (Journal of Bacteriology 181: 1269-80 (1999)) mediante el empleo del promotor fis,
dependiente de fase de crecimiento. Se influye sobre la velocidad de elongación mediante el empleo de codón,
mediante el empleo de codón para t-ARN presente frecuentemente en la cepa madre (parent strain) se puede
20 amplificar la expresión génica. Por lo demás, el intercambio de un codón iniciador con el codón ATG, presente en
Escherichia coli con un 77 % en el más frecuente de los casos, puede mejorar considerablemente la translación, ya
que el codón AUG es dos a tres veces más efectivo que, por ejemplo, el codón GUG y UUG (Khudyakov et al.,
FEBS Letters 232 (2): 369-71 (1988); Reddy et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 82
(17): 5656-60 (1985)). También el entorno de secuencia del codón iniciador se puede optimizar, ya que se describen
25 efectos cooperantes entre el codón inicial y las zonas acompañantes (Stenstrom et al., Gene 273(2): 259-65 (2001);
Hui et al., EMBO Journal 3(3): 623-9 (1984)).

25 El especialista encuentra instrucciones generales a tal efecto, entre otros, en Chang y Cohen (Journal of
Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), en Hartley y Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), en Amann y Brosius (Gene
40: 183-190 (1985)), en de Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of
America 80: 21-25 (1983)), en LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), en PCT/US97/13359, en
30 Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), en Quandt y Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), en Hamilton et al. (Journal
of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), en Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195
(1998)), y en métodos de genética y biología molecular conocidos.

35 En vectores plásmidos replicables en Enterobacteriaceae, como vectores de clonación derivados, por ejemplo, de
pACYC184 (Bartolome et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) o
derivados de pSC101 (Vocke y Bastia; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561
(1983)). En un procedimiento según la invención se puede emplear una cepa transformada con un vector plásmido,
portando el vector plásmido al menos el alelo aroG o secuencias de nucleótidos que codifican para su producto
genético.

Bajo el concepto transformación se entiende la absorción de un ácido nucleico aislado a través de un huésped
(microorganismo).

40 Mediante las medidas de amplificación, en especial sobreexpresión, se aumenta la actividad o concentración de la
correspondiente proteína en general en al menos un 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %
o 500 %, como máximo 1000 % o 2000 %, referido a la proteína de tipo salvaje, o bien a la actividad o concentración
45 de la proteína en el microorganismo o cepa madre no recombinante para el correspondiente enzima, o bien la
correspondiente proteína. Se entiende por microorganismo no recombinante o cepa madre (parent strain) el
microorganismo en el que se lleva a cabo la pérdida de la inhibición de retroalimentación o sobreexpresión según la
invención.

50 Para la determinación de la medida de la resistencia a retroalimentación de una variante de 3-desoxi-D-arabinohexulonat-7-fosfato-sintasa según la invención se emplea, a modo de ejemplo, el ensayo de tiobarbiturato según
Schoner y Herrmann (The Journal of Biological Chemistry 251(18): 5440-5447 (1976); modificado según Waravdekar
y Saslaw, Biochimica et Biophysica Acta 24, 439 (1957)). Este ensayo se basa en la oxidación de peryodato de
DAHP para dar formilpiruvato, que reacciona con tiobarbiturato para dar un complejo de color. Ese incuba una
mezcla de 100 µl que contiene tampón fosfato (50 mM, pH 7) y 75 µmoles de piruvato de fosfoenol (PEP), así como
55 0,3 µmoles de 4-fosfato de eritrosa (E4P), 5 min a 37°C en el baño de agua. La reacción se inicia mediante adición
de 50 µl de extracto crudo, obtenido mediante desgregación ultrasónica (Simpson et al., Journal of Bacteriology
107(3): 798-805 (1971), y se detiene después de 10 minutos mediante adición de 300 µl de una disolución de ácido
tricloroacético 0,6 M. La proteína precipitada se separa por centrifugado. A 400 µl de carga de reacción se añaden
100 µl de disolución I (peryodato sódico 0,2 M en H₃PO₄ 9 M) y se incuba 20 min a 25°C en baño de agua. A tal

efecto se añaden 400 μ l de disolución II (arsenato sódico 0,75 M en Na_2SO_4 0,5 M y H_2SO_4 0,05 M), se incuba 2 min a temperatura ambiente, y a continuación se añaden 3 ml de disolución III (tiobarbiturato 0,04 M en Na_2SO_4 0,5 M), y se calienta 15 min en baño de agua en ebullición. Como muestra en blanco se emplea agua. La muestra en blanco permanece incolora, y los extractos crudos sometidos a ensayo se tiñen de rosa con mayor o menor intensidad; el contenido en DAHP se mide mediante la variación de la extinción tras enfriamiento de la disolución a 549 nm (coeficiente de extinción $\epsilon = 3,34 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Para la determinación de la medida de la resistencia a retroalimentación se mide la actividad catalítica en variantes de DAHP-sintasa en presencia y ausencia de L-fenilalanina 2 mM.

5 La concentración de proteína se puede determinar a través de separación de gel proteico mono- y bidimensional, y
 10 subsiguiente identificación óptica de la concentración de proteína con correspondiente software de valoración en el gel. Un método usual para la preparación de geles proteicos y para la identificación de proteínas es el modo de proceder descrito por Hermann et al. (*Electrophoresis*, 22: 1712-23 (2001)). La concentración de proteína se puede determinar igualmente mediante hibridación Western-Blot con un anticuerpo específico para la proteína a identificar (Sambrook et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), y subsiguiente valoración óptica con correspondiente software para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1998) *Biospektrum* 5: 32-39; Lottspeich, *Angewandte Chemie* 38: 2630-2647 (1999)).

15 Un gen o alelo es un polinucleótido desde el punto de vista químico. Otro concepto a tal efecto es ácido nucleico, en especial ácido desoxirribonucleico.

20 Los conceptos polipéptido y proteína son intercambiables entre sí.

25 Se denomina marco de lectura abierto (ORF, open reading frame) una sección de una secuencia de nucleótidos que codifica o puede codificar para una proteína, o bien para un polipéptido o ácido ribonucleico, al que no se puede asignar una función según el estado de la técnica. Tras asignación de una función a la respectiva sección de secuencia de nucleótidos se habla en general de un gen. En general se entiende por alelos formas alternativas de un gen dado. Las formas se distinguen por diferencias en la secuencia de nucleótidos.

30 Se denomina producto génico en general la proteína codificada o el ácido ribonucleico codificado por una secuencia de nucleótidos, es decir, un ORF, un gen o un alelo.

35 Es objeto de la invención un procedimiento para la obtención de compuestos químicos orgánicos seleccionados a partir del grupo de compuestos de la vía metabólica del shikimato, preferentemente de L-aminoácidos aromáticos, en especial L-triptófano, mediante fermentación de microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae según la invención, caracterizado porque

- 35 a) los microorganismos que producen compuestos químicos orgánicos, en los que se expresa, en especial se sobreexpresa el gen aroG o secuencias de nucleótidos codificantes para su producto génico, o alelos, alcanzándose la pérdida de inhibición de retroalimentación mediante una medida de mutagénesis dentro del gen aroG, se cultivan en un medio bajo condiciones en las que los compuestos químicos orgánicos se concentran en el medio o en las células, y
- b) los compuestos químicos orgánicos se aislan, permaneciendo o eliminándose completamente, en caso dado, otros componentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad, o en fracciones (≥ 0 a 100 %) en el producto aislado.

40 Los microorganismos, en especial recombinantes, con un alelo aroG expresado o sobreexpresado, que son igualmente objeto de la presente invención, pueden producir los compuestos químicos orgánicos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, en caso dado almidón, en caso dado celulosa, o a partir de glicerina y etanol, en caso dado también a partir de mezclas. Se trata de representantes de la familia Enterobacteriaceae, seleccionados a partir de las especies *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*. Las especies *Escherichia* y *Serratia* son preferentes. En el caso de la especie *Escherichia* se debe citar en especial el tipo *Escherichia coli* y en el caso de la especie *Serratia* se debe citar en especial el tipo *Serratia marcescens*.

45 En general se producen microorganismos recombinantes mediante transformación, transducción o conjugación, o una combinación de estos métodos, con un vector, que contiene el gen deseado, el ORF deseado, un alelo de este gen u ORF, o parte de los mismos, y/o un promotor que amplifica la expresión del gen, alelo u ORF. En el caso de este promotor se trata de un promotor que procede, mediante mutación amplificada, de la propia secuencia reguladora que se encuentra en línea de entrada del gen, alelo u ORFs.

Para la obtención de las cepas de la familia Enterobacteriaceae, que proporcionan compuestos químicos orgánicos, que contienen un alelo aroG, se emplean preferentemente cepas (cepas de partida, o bien cepas madre), que poseen ya la capacidad de enriquecer en la célula y/o separar en el medio nutriente que lo envuelve, o bien acumular en el caldo de fermentación el compuesto químico orgánico deseado. A tal efecto se puede emplear 5 también la expresión „producir“. En especial, las cepas empleadas para las medidas de la invención poseen la capacidad de concentrar, o bien acumular \geq (al menos) 0,25 g/l, \geq 0,5 g/l, \geq 1,0 g/l, \geq 1,5 g/l, \geq 2,0 g/l, \geq 4 g/l o \geq 10 g/l en L-aminoácidos, preferentemente L-triptófano y L-fenilalanina, en \leq (máximo) 120 horas, \leq 96 horas, \leq 48 horas, 10 \leq 36 horas, \leq 24 horas o \leq 12 horas en la célula y/o en el medio nutriente, o bien el caldo de fermentación. En este caso se puede tratar de cepas que se obtuvieron mediante mutagénesis y selección, mediante técnicas de ADN recombinantes, o mediante una combinación de ambos métodos.

Las citadas cepas que eliminan L-aminoácidos producen uno o varios, de modo preferente o esencialmente un aminoácido seleccionado a partir del grupo L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano, L-arginina y L-homoserina, seleccionados preferentemente a partir del grupo formado por L-treonina, L-homoserina, L-leucina, L-valina, L-alanina, L-isoleucina y L-histidina. El concepto L-aminoácido o aminoácido comprende también sus sales. 15

El concepto „un o esencialmente un aminoácido“ considera que, adicionalmente al L-aminoácido deseado, se pueden producir uno o varios de los citados L-aminoácidos (aminoácidos secundarios). La fracción de estos aminoácidos secundarios asciende a \geq 0 a un máximo de 40 %, preferentemente \geq 0 a un máximo de 20 %, de modo 20 especialmente preferente \geq 0 a un máximo de 10 %, y de modo muy especialmente preferente \geq 0 a un máximo de 5 %, referido a la cantidad de L-aminoácido deseado.

Como cepas de la especie Escherichia, en especial de tipo Escherichia coli, apropiadas como cepa madre, que producen, o bien eliminan L-triptófano, se deben citar, a modo de ejemplo:

- Escherichia coli JP4735/pMU3028 (US5,756,345)
- 25 - Escherichia coli JP6015/pMU91 (US5,756,345)
- Escherichia coli SV164(pGH5) (WO94/08031)
- E. coli AGX17(pGX44) (NRRL B-12263) (US4,371,614)
- E. coli AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) (US4,371,614)
- Escherichia coli AGX17/pGX50,pACKG4-pps (WO97/08333)
- 30 - Escherichia coli ATCC 31743 (CA1182409)
- E. coli C534/pD2310,pDM136 (ATCC 39795) (WO87/01130)
- Escherichia coli JB102/p5LRPS2 (US5,939,295).

Las cepas de la familia de Enterobacteriaceae que producen o eliminan L-triptófano poseen preferentemente, entre otras, una o varias de las características genéticas, o bien fenotípicas del grupo: resistencia contra 5-metil-DL-triptófano, resistencia contra 5-fluor-triptófano, resistencia contra 4-metil-DL-triptófano, resistencia contra 6-metil-DL-triptófano, resistencia contra 4-fluor-triptófano, resistencia contra 6-fluor-triptófano, resistencia contra antranilato, resistencia contra triptazano, resistencia contra indol, resistencia contra indol-ácido acrílico, necesidad de fenilalanina, necesidad de tirosina, en caso dado capacidad de aprovechamiento de sacarosa, amplificación del operón triptófano, preferentemente de antranilato-sintasa, preferentemente de la forma resistente a retroalimentación, una triptofanil-tARN-sintasa parcialmente defectuosa, una absorción de triptófano debilitada, una triptofanasa defectuosa, proteínas represoras inactivadas, amplificación de la biosíntesis de serina, amplificación de la síntesis de piruvato de fosfoenol, amplificación de la síntesis de 4-fosfato de D-eritrosa, amplificación de la síntesis de 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DHAP), amplificación de la biosíntesis de corismato. 35 40

En los trabajos que motivan la invención se descubrió que los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, tras expresión o sobreexpresión de los alelos aroG, producen y concentran en la célula o en el medio L-aminoácidos de manera acrecentada, en especial L-triptófano. 45

Las secuencias de nucleótidos de los genes o marco de lectura abierto (ORF) de Escherichia coli pertenecen al estado de la técnica, y se pueden extraer de la secuencia genómica de Escherichia coli publicada por Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)). Es sabido que, mediante enzimas propios del huésped (metionin-aminopeptidasa) se puede disociar el aminoácido N-terminal metionina.

- 5 A partir de *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, que pertenece igualmente a la familia Enterobacteriaceae, es igualmente conocida la secuencia de nucleótidos para el gen aroG (nº de acceso: NC_003197 (REGIÓN: 823772-824824) y nº de acceso NC_004337 (REGIÓN: complementaria (571488-572540))). Otras secuencias de nucleótidos para el gen aroG se encuentran a partir de los siguientes Enterobacteriaceae: *Shigella boydii* (nº de acceso: CP000036); *Shigella dysenteriae* (nº de acceso: CP000034); *Shigella sonnei* (nº de acceso: CP000038); *Salmonella enterica* (nº acceso: AE017220); *Serratia proteamaculans* (nº de acceso: CP000826).

El gen aroG de Escherichia coli K12 se describe, entre otros, mediante los siguientes datos:

Denominación: 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa (DAHP-sintasa) AroG

Función: metaloenzima dependiente de hierro, que se regula, o bien se inhibe mediante la regulación genética a través de atenuación y represión, como también por vía alostérica mediante L-fenilalanina. El enzima condensa piruvato de fosfoenol (PEP) de la glicólisis y 4-fosfato de eritrosa (E4P) de la vía de fosfato de pentosa en la reacción de partida de la vía biosintética de compuestos aromáticos para dar DAHP.

Referencia: Ray et al., Journal of Bacteriology 170(12): 5500-6 (1988);

Davies et al., Nucleic Acids Research 10(13): 4045-8 (1982);

20 Frost and Draths, Annual review of microbiology, 49: 557-79 (1995);

Pittard, Genes to Cells 1(8): 717-25 (1996)

Nº de acceso: NC000913 (región: 784.856 -> 785.908)

El polipéptido codificado posee una longitud de 350 aminoácidos.

Número de gen alternativo: b0754

25 Las secuencias de ácidos nucleicos se pueden extraer de los bancos de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), del banco de datos de secuencias de nucleótidos de European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemania, o bien Cambridge, Reino Unido), o del banco de datos de ADN de Japón (DDBJ, Mishima, Japón).

30 Para una mayor claridad se representa la secuencia conocida para el gen aroG de Escherichia coli bajo SEQ ID nº 1, y las secuencias conocidas para el gen aroG de *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* bajo SEQ ID nº 3 y SEQ ID nº 5. Las proteínas codificadas por este marco de lectura se representan como SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4 y SEQ ID nº 6. La secuencia conocida para el gen aroG de Escherichia coli, incluyendo las secuencias de nucleótidos situadas en línea de entrada (upstream) y en línea de salida (downstream) se representa bajo SEQ ID nº 9, la proteína codificada por este marco de lectura se representa bajo SEQ ID nº 10.

35 Los genes o marcos de lectura abiertos descritos en los textos indicados se pueden emplear según la invención. Además se pueden emplear alelos o genes, o marcos de lectura abiertos, que resultan de la degeneración del código genético o debido a mutaciones de sentido neutras en función („sense mutations“). El empleo de genes endógenos, o bien marcos de lectura abiertos endógenos, es preferente.

40 Entre los alelos del gen aroG, que contienen mutaciones de sentido neutras en función, cuentan, entre otros, aquellos que conducen a lo sumo a 30, o a lo sumo a 20, preferentemente a lo sumo a 10 o a lo sumo a 5, de modo muy especialmente preferente a lo sumo a 3, o a lo sumo a 2, o al menos a un intercambio de aminoácidos conservador en la proteína codificada por los mismos.

45 En el caso de aminoácidos aromáticos se habla de intercambios conservadores si se intercambian entre sí fenilalanina, triptófano y tirosina. En el caso de aminoácidos hidrófobos se habla de intercambios conservadores si se intercambian entre sí leucina, isoleucina y valina. En el caso de aminoácidos polares se habla de intercambios

conservadores si se intercambian entre sí glutamina y asparagina. En el caso de aminoácidos básicos se habla de intercambios conservadores si se intercambian entre sí arginina, lisina e histidina. En el caso de aminoácidos ácidos se habla de intercambios conservadores si se intercambian entre sí ácido aspártico y ácido glutámico. En el caso de aminoácidos que contienen grupos hidroxilo se habla de intercambios conservadores si se intercambian entre sí serina y treonina.

Del mismo modo, también se pueden emplear aquellas secuencias de nucleótidos que codifican para variantes de las citadas proteínas, que contienen adicionalmente una prolongación o acortamiento en al menos un (1) aminoácido en el término N o C. Esta prolongación o alargamiento no asciende a más de 40, 30, 20, 10, 5, 3 o 2 aminoácidos o restos aminoácido.

10 Entre los alelos apropiados cuentan también aquellos que codifican para proteínas en las que al menos un (1) aminoácido está insertado (inserción) o eliminado (deleción). El máximo número de tales variaciones denominadas indels puede alcanzar 2, 3, 5 o 10, pero en ningún caso más de 20 aminoácidos.

15 El especialista encuentra instrucciones para la identificación de secuencias de ADN por medio de hibridación, entre otros, en el manual „The DIG System Users Guide for Filter Hybridization“ de la firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar bajo condiciones restrictivas, es decir, se forman solo híbridos en los que sonda y secuencia objetivo, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son idénticas al menos en un 70 %. Es sabido que la restricción de la hibridación, incluyendo los pasos de lavado, se puede influenciar, o bien determinar, mediante variación de la composición de tampón, la temperatura y la concentración de sales. La reacción de hibridación se lleva a cabo en general con restricción relativamente reducida en comparación con los pasos de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

25 Para la reacción de hibridación se puede emplear, a modo de ejemplo, un tampón correspondiente a 5 x tampón SSC a una temperatura de aproximadamente 50°C-68°C. En este caso se pueden hibridar sondas también con polinucleótidos, que presentan menos de un 70 % de identidad con la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables y se eliminan mediante lavado bajo condiciones restrictivas. Esto se puede conseguir, a modo de ejemplo, mediante reducción de la concentración de sales a 2x SSC, y en caso dado a continuación 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), ajustándose una temperatura de aproximadamente 50°C-68°C, aproximadamente 52°C-68°C, aproximadamente 54°C-68°C, aproximadamente 56°C-68°C, aproximadamente 58°C-68°C, aproximadamente 60°C-68°C, aproximadamente 62°C-68°C, aproximadamente 64°C-68°C, aproximadamente 66°C-68°C. Son preferentes intervalos de temperatura de aproximadamente 64°C-68°C o aproximadamente 66°C-68°C. En caso dado, es posible reducir la concentración de sales hasta una concentración correspondiente a 0,2x SSC o 0,1x SSC. Mediante aumento gradual de la temperatura de hibridación en pasos de aproximadamente 1-2°C de 50°C a 68°C se pueden aislar fragmentos de polinucleótidos que poseen, a modo de ejemplo, al menos un 70 % o al menos un 80 % o al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, o al menos un 99 % de identidad respecto a la secuencia de sonda empleada, o bien respecto a las secuencias de nucleótidos representadas en SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 3 o SEQ ID nº 5. Otras instrucciones para la hibridación se pueden obtener en el mercado en forma de los denominados kits (por ejemplo DIG Easy Hyb de la firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, catálogo nº 1603558).

40 Además, para la producción de L-aminoácidos, en especial L-triptófano, con cepas de la familia Enterobacteriaceae, adicionalmente a la expresión del alelo aroG puede ser ventajoso amplificar uno o varios enzimas de la vía biosintética conocida, o enzimas del metabolismo anaplerótico, o enzimas para la producción de nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido o enzimas de glicólisis, o enzimas PTS, o enzimas de metabolismo de azufre. En general es preferente el empleo de genes endógenos.

45 A modo de ejemplo, para la producción de L-triptófano se puede amplificar, en especial sobreexprimir simultáneamente uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo

- al menos un gen del operón triptófano que codifica para antranilato-sintasa, antranilato-fosforibosiltransferasa, fosforibosilantranilato-isomerasa, indol-3-glicerinfosfato-sintasa y triptófano-sintasa (Applied and Environmental Microbiology 38 (2): 181-190 (1979)),
- el gen serA que codifica para 3-fosfoglicerato-dehidrogenasa (WO87/01130),
- el gen serB que codifica para fosfoserinfosfataza (WO87/01130),

- el gen serC que codifica para fosfoserinaminotransferasa (WO87/01130),
 - el gen aroF que codifica para DHAP-sintasa sensible a L-tirosina (WO87/01130; EP1270721),
 - el gen aroH que codifica para DHAP-sintasa sensible a L-triptófano (WO87/01130; EP1270721),
 - el gen pps que codifica para fosfoenolpiruvato-sintasa (WO96/08567),
- 5 • el gen pckA que codifica para fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (WO2004/090125),
- el gen tktA que codifica para transcetolasa A (US5, 168, 056),
 - el gen tktB que codifica para transcetolasa B (US5, 168, 056),
- 10 • el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yddG de Escherichia coli (número de acceso NC000913 (región 1544312-1545193) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), EP1449918).

Además, para la producción de L-aminoácidos, en especial L-triptófano, puede ser ventajoso eliminar adicionalmente reacciones secundarias no deseadas adicionalmente a la pérdida de la inhibición de retroalimentación del gen aroG (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

- 15 A modo de ejemplo, para la producción de L-triptófano se puede debilitar, en caso dado eliminar o reducir la expresión de uno o varios genes simultáneamente, seleccionados a partir del grupo
- el gen tnaA que codifica para triptofanasa (US4 371 614),
 - el gen trpR que codifica para el represor del operón trp (US4 371 614),
 - el gen tyrA que codifica para corismato-mutasa T y prefenato-dehidrogenasa (US4 371 614),
- 20 • el gen pheA que codifica para corismato-mutasa P y prefenato-dehidrogenasa (US4 371 614),
- el gen mtr que codifica para la proteína de transporte específica de triptófano (US5 756 345),
 - el gen tnaB que codifica para triptófano-permeasa (US5 756 345),
 - el gen aroP que codifica para el transportador de aminoácidos aromáticos (US 5 756 345),
 - el gen sdaA que codifica para L-serin-deaminasa (EP0149539),
- 25 • el gen pgi que codifica para glucosa-6-fosfato-isomerasa (WO87/01130),
- el gen tyrB que codifica para tirosin-aminotransferasa (WO87/01130),

Estas medidas se llevan a cabo en caso dado adicionalmente a, o bien en combinación apropiada con las medidas indicadas de amplificación de genes para el aumento de la producción de triptófano.

- 30 El concepto „debilitamiento“ describe en este contexto la reducción o eliminación de la actividad intracelular o concentración de uno o varios enzimas, o bien una o varias proteínas en un microorganismo, que se codifican mediante el correspondiente ADN, al emplearse, a modo de ejemplo, un promotor más débil que el microorganismo o cepa madre no recombinante para el correspondiente enzima, o bien la correspondiente proteína, o un gen, o bien alelo que codifica para un correspondiente enzima, o bien desactiva una correspondiente proteína con una baja actividad, o bien el correspondiente enzima, o bien la correspondiente proteína, o el marco de lectura abierto o el gen, y en caso dado combina estas medidas.

Mediante las medidas de debilitamiento se reduce la actividad o concentración de la correspondiente proteína en general a un 0 hasta un 75 %, un 0 a un 50 %, un 0 a un 25 %, un 0 a un 10 % o un 0 a un 5 % de actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o bien la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo o cepa madre no recombinante para el correspondiente enzima, o bien la correspondiente proteína. Se entiende por 5 microorganismo no recombinante o cepa madre (parent strain) el microorganismo en el que se lleva a cabo el debilitamiento o eliminación según la invención.

Para la consecución de un debilitamiento se pueden reducir, o bien eliminar, a modo de ejemplo, la expresión de los genes o marcos de lectura abiertos, o las propiedades catalíticas de la proteína enzimática. En caso dado se pueden combinar ambas medidas.

- 10 La reducción de la expresión génica se puede efectuar mediante control de cultivo apropiado, mediante modificación genética (mutación) de las estructuras de señal de expresión génica, o también mediante técnica de ARN antisentido. Estructuras de señal de expresión génica son, a modo de ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, puntos de unión de ribosomas, el codón iniciador y terminadores. Se encuentran datos a tal efecto, entre otros, a modo de ejemplo, en Jensen y Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58: 191-195 (1998)), en Carrier y Keasling (*Biotechnology Progress* 15: 58-64 (1999)), Franch y Gerdes (*Current Opinion in Microbiology* 3: 159-164 (2000)), Kawano et al. (*Nucleic Acids Research* 33(19), 6268-6276 (2005)) y en métodos de genética y biología molecular conocidos, como por ejemplo el método de Knippers ("Molekulare Genetik", 6^a edición, editorial Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995) o el de Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990).
- 15
- 20 Mutaciones que conducen a una modificación, o bien reducción de las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas, son conocidas por el estado de la técnica. Como ejemplos citense los trabajos de Qiu y Goodman (*Journal of Biological Chemistry* 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5511-5515 (1998)), Wente y Schachmann (*Journal of Biological Chemistry* 266: 20833-20839 (1991)). Se pueden extraer representaciones sinópticas de métodos de genética y 25 biología molecular conocidos, como por ejemplo el de Hagemann ("Allgemeine Genetik", editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1986).

- 30 Como mutaciones entran en consideración transiciones, transversiones, inserciones y delecciones de al menos un (1) par de bases, o bien nucleótido. En dependencia de la acción del intercambio de aminoácidos provocado por la mutación sobre la actividad enzimática se habla de mutaciones de sentido erróneas („missense mutations“) o mutaciones sin sentido („nonsense mutations“). La mutación de sentido errónea conduce a un intercambio de un aminoácido dado en una proteína por otro, tratándose en especial de un intercambio de aminoácidos no conservador. De este modo se influye sobre la funcionalidad, o bien actividad de la proteína, y se reduce a un valor de un 0 a un 75 %, un 0 a un 50 %, un 0 a un 25 %, un 0 a un 10 %, o un 0 a un 5 %. La mutación sin sentido 35 conduce a un codón de terminación en la zona de codificación del gen, y con ello a una interrupción prematura de la traslación. Inserciones o delecciones de al menos un par de bases en un gen conducen a mutaciones de desplazamiento de rastro („frame shift mutations“), que conducen a que se incorporen aminoácidos erróneos, o que se interrumpe la translación de manera prematura. Si como consecuencia de la mutación se produce un codón de terminación en la zona de codificación, esto conduce igualmente a una interrupción prematura de la translación. Del mismo modo, delecciones de al menos uno (1) o varios codones conducen típicamente a una eliminación completa de 40 la actividad enzimática. En el documento WO 03/074719 se describe la reducción de la expresión génica mediante supresión de una mutación de codón de terminación en la zona de codificación mediante supresores de t-ARN apropiados.

- 45 Las instrucciones para la generación de tales mutaciones pertenecen al estado de la técnica, y se pueden extraer de métodos de genética y biología molecular conocidos, como por ejemplo el método de Knippers ("Molekulare Genetik", 6^a edición, editorial Georg Thieme, Stuttgart, Alemania, 1995), el método de Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990), o el de Hagemann ("Allgemeine Genetik", editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1986).

Se pueden incorporar mutaciones apropiadas en los genes mediante intercambio de genes, o bien alelos.

- 50 Un método común es el método de intercambio de genes con ayuda de un derivado de pSC101 pMAK705, replicante de manera condicional, descrito por Hamilton et al. (*Journal of Bacteriology* 171: 4617-4622 (1989)). Se pueden utilizar igualmente otros métodos descritos en el estado de la técnica, como por ejemplo el de Martinez-Morales et al. (*Journal of Bacteriology* 181: 7143-7148 (1999)) o el de Boyd et al. (*Journal of Bacteriology* 182: 842-847 (2000)).

Es igualmente posible transformar mutaciones en los respectivos genes, o mutaciones que afectan a la expresión de los respectivos genes o marcos de lectura abiertos, en diversas cepas mediante conjugación o transducción.

En caso dado se pueden combinar las medidas para la amplificación y para la debilitación a voluntad.

5 El rendimiento de bacterias aisladas, o bien del proceso de fermentación bajo empleo de las mismas respecto a uno o varios de los parámetros seleccionados a partir del grupo de concentración de producto (producto por volumen), rendimiento de producto (producto formado por fuente de carbono consumida), y formación de producto (producto formado por volumen y tiempo), o también otros parámetros de proceso y combinaciones de los mismos, se aumenta en al menos un 0,5 %, al menos un 1 %, al menos un 1,5 % o al menos un 2 %, referido al microorganismo no recombinante o a la cepa madre, o bien al proceso de fermentación, bajo empleo de los mismos.

10 Según la invención, los microorganismos obtenidos se cultivan en procedimiento discontinuo (cultivo por cargas), en carga por alimentación (procedimiento de alimentación), en procedimiento discontinuo de alimentación reiterada (procedimiento de alimentación repetitivo), o en un procedimiento continuo (DE102004028859.3 o US5 763 230). Se dispone de resúmenes sobre tales procedimientos en el método de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (editorial Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)), o en el método de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

15 En el caso de un procedimiento discontinuo, con pocas excepciones, como por ejemplo oxígeno y agente corrector de pH, se disponen todas las substancias de empleo en forma de una carga, y se cultiva el microorganismo en el medio obtenido.

20 En el caso de un procedimiento discontinuo de alimentación se cultiva el microorganismo en primer lugar por medio de un procedimiento por cargas (fase discontinua). A continuación se añade al cultivo una substancia de empleo esencial para la obtención del producto, en caso dado también varias substancias de empleo, de manera continua o discontinua (fase de alimentación, feed-phase). En el caso de obtención de L-aminoácidos se trata de una fuente de carbono.

25 En el caso de un procedimiento discontinuo de alimentación reiterada se trata de un procedimiento discontinuo de alimentación en el que, una vez concluida la fermentación, una parte del caldo de fermentación objetido sirve como inóculo para la iniciación de un nuevo procedimiento discontinuo de alimentación reiterada. En caso dado, este ciclo se puede repetir varias veces. Se describen procedimientos discontinuos de alimentación reiterada, a modo de ejemplo, en los documentos WO 02/18543 y WO 05/014843.

30 En el caso de un procedimiento continuo, a continuación de un procedimiento discontinuo o discontinuo de alimentación, se añade continuamente al cultivo, en caso dado, la totalidad de substancias de empleo, y simultáneamente se extrae caldo de fermentación. Se describen procedimientos continuos, a modo de ejemplo, en las solicitudes de patente US 5 763 230, WO 05/014840, WO 05/014841 y WO 05/014842.

35 El medio de cultivo a emplear debe cumplir los requisitos de las respectivas cepas de modo apropiado. En el método „Manual of Methods for General Bacteriology“ de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) se encuentran descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos. Los conceptos medio de cultivo, medio de fermentación y medio nutriente, o bien medio, se pueden intercambiar entre sí.

En general, un medio de cultivo contiene, entre otras cosas, una o varias fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y fuentes de fósforo.

40 Como fuentes de carbono se pueden emplear azúcares e hidratos de carbono, como por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón, y en caso dado celulosa, aceites y grasas, como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, como por ejemplo ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, como por ejemplo glicerina y etanol, y ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido acético. Estas substancias se pueden emplear aisladas o como mezcla.

45 Como fuente de nitrógeno se pueden emplear compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, aguas de remojo de maíz, harina de habas de soja y urea, o compuestos inorgánicos, como sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrito amónico. Las fuentes de nitrógeno se pueden emplear aisladas o como mezcla.

Como fuente de carbono se pueden emplear ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico o hidrogenofosfato dipotásico, o las correspondientes sales que contienen sodio.

El medio de cultivo debe contener además sales de metales, como por ejemplo sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarios para el crecimiento. Finalmente se pueden emplear substancias de crecimiento esenciales, como aminoácidos y vitaminas, adicionalmente a las substancias citadas anteriormente. Al medio de cultivo se pueden añadir además precursores apropiados. Las citadas substancias de empleo se pueden añadir al cultivo en forma de una única carga, o alimentar de modo apropiado durante el cultivo.

La fermentación se lleva a cabo en general a un valor de pH de 5,5 a 9,0, en especial 6,0 a 8,0. Para el control de pH del cultivo se emplean de manera apropiada compuestos básicos, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco, o bien agua amoniacal, o compuestos ácidos, como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para el control del desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes, como por ejemplo poliglicolésteres de ácido graso. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos se pueden añadir al medio substancias de acción selectiva apropiadas, por ejemplo antibióticos. Para mantener condiciones aerobias se introduce en el cultivo oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno, como por ejemplo aire. La temperatura del cultivo se sitúa normalmente en 25°C a 45°C, y preferentemente en 30°C a 40°C. Mediante la actividad de los microorganismos se llega a una concentración, o bien acumulación de L-aminoácido en el caldo de fermentación, o bien cultivo. El cultivo se continúa hasta que se ha formado un máximo en el L-aminoácido deseado. Este objetivo se consigue normalmente en el intervalo de 10 horas a 160 horas. En el caso de procedimientos continuos son posibles tiempos de cultivo más largos.

Se entiende por caldo de fermentación, o bien caldo de cultivo, un medio de fermentación en el que se cultivó un microorganismo durante un cierto tiempo y a una cierta temperatura.

Al final de la fermentación, el caldo de fermentación producido contiene correspondientemente a) la biomasa (masa celular) de microorganismo producida a consecuencia de la propagación de células de microorganismo, b) el L-aminoácido formado en el transcurso de la fermentación, c) los productos secundarios orgánicos formados en el transcurso de la fermentación, y d) los componentes del/de los medio/medios de fermentación empleado(s), o bien de las substancias de empleo, como por ejemplo vitaminas, como tiamina, o sales, como sulfato de magnesio, no consumidos debido a la fermentación.

El caldo de cultivo, o bien fermentación obtenido, se puede recoger a continuación, y el L-aminoácido deseado, o bien el producto que contiene L-aminoácido, se puede separar o aislar a continuación.

En una variante de procedimiento se concentra el caldo de fermentación en caso dado, y a continuación se purifica, o bien se aíslla en forma pura o casi pura el L-aminoácido. Son métodos típicos de purificación de L-aminoácidos la cromatografía de intercambio iónico, la cristalización, procedimientos de extracción, y el tratamiento con carbón activo. De este modo se obtienen L-aminoácidos esencialmente puros, con un contenido de ≥ 90 % en peso, ≥ 95 % en peso, ≥ 96 % en peso, ≥ 97 % en peso, ≥ 98 % en peso o ≥ 99 % en peso.

En otra variante de procedimiento es igualmente posible obtener un producto a partir del caldo de fermentación formado, al eliminarse la biomasa de la bacteria contenida en el caldo de fermentación por completo (100 %) o casi por completo, es decir, en más de (>) 90 %, >95 %, >97 %, >99 %, y al dejarse esencialmente en el producto los demás componentes del caldo de fermentación, es decir, en 30 % - 100 %, 40 % - 100 %, 50 % - 100 %, 60 % - 100 %, 70 % - 100 %, 80 % - 100 % o 90 % - 100 %, preferentemente en cantidad mayor o igual (\geq) 50 %, ≥ 60 %, ≥ 70 %, ≥ 80 %, ≥ 90 % o ≥ 95 %, o también completamente (100 %).

Para la eliminación o separación de la biomasa se emplean métodos de separación, como por ejemplo centrifugación, filtración, decantación, floculación, o una combinación de los mismos.

El caldo obtenido se evapora, o bien se concentra a continuación con métodos conocidos, como por ejemplo con ayuda de un evaporador rotatorio, evaporador de capa fina, evaporador molecular por gravedad, mediante ósmosis inversa, mediante nanofiltración, o una combinación de ambos.

Este caldo concentrado se elabora a continuación mediante métodos de liofilización, secado por pulverizado, granulación por pulverizado, o mediante otros procedimientos, para dar un polvo preferentemente susceptible de esparcido, finamente dividido. Este polvo susceptible de esparcido, finamente dividido, se puede transformar a su vez en un polvo de grano grosero, convenientemente susceptible de esparcido, almacenable y sensiblemente exento de polvo, mediante procedimientos de compactado o granulación apropiados. En este caso se elimina el agua en total en más de un 90 %, de modo que el contenido en agua en el producto asciende a menos de un 10 % en peso, menos de un 5 % en peso, menos de un 4 % en peso, o menos de un 3 % en peso.

El análisis de L-aminoácidos para la determinación de la concentración en uno o varios momentos en el transcurso de la fermentación se puede efectuar mediante separación de L-aminoácidos por medio de cromatografía de

intercambio iónico, preferentemente cromatografía de intercambio catiónico, con subsiguiente derivatización en columna subsiguiente bajo empleo de ninhidrina, como describen Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)). En lugar de ninhidrina se puede emplear también orto-ftadialdehído para la derivatización en columna subsiguiente. Se encuentra un artículo sinóptico sobre cromatografía de intercambio iónico en Pickering (LC.GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)).

5 Es igualmente posible efectuar una derivatización en columna previa, a modo de ejemplo bajo empleo de orto-ftadialdehído o fenilisotiocianato, y separar el derivado de aminoácidos producido mediante Reversed-Phase-Chromatographie (RP), preferentemente en forma de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se describe tal método, a modo de ejemplo, en Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

10 La detección se efectúa mediante fotometría (absorción, fluorescencia).

Se encuentra una representación sintética sobre el análisis de aminoácidos, entre otros, en el método „Bioanalytik“ de Lottspeich y Zorbas (editorial Spektrum Akademischer, Heidelberg, Alemania 1998).

15 El procedimiento según la invención sirve para la obtención por fermentación de compuestos químicos orgánicos seleccionados a partir del grupo de compuestos de la vía metabólica del shikimato, son preferentes los L-aminoácidos aromáticos L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptófano, corismato, enterobactina, menaquinona, tetrahidrofolato y ubiquinona. Son especialmente preferentes L-triptófano y L-fenilalanina.

ES 2 559 193 T3

PROTOCOLO DE SECUENCIA

<110> Evonik Degussa GmbH

<120> Procedimiento para la obtención de L-aminoácidos bajo empleo de cepas mejoradas de la familia Enterobacteriaceae

5 <130> 200800207

<160> 10

<170> Patent In version 3.3

10 <210> 1

<211> 1053

<212> DNA

<213> Escherichia coli

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1053)

15 <223> aroG región codificante

<400> 1

atg aat tat cag aac gac gat tta cgc atc aaa gaa atc aaa gag tta
Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
1 5 10 15

48

ctt cct cct gtc gca ttg ctg gaa aaa ttc ccc gct act gaa aat gcc
Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
20 25 30

96

gcg aat acg gtt gcc cat gcc cga aaa gcg atc cat aag atc ctg aaa
Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
35 40 45

144

ggt aat gat gat cgc ctg ttg gtt gtg att ggc cca tgc tca att cat
Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
50 55 60

192

gat cct gtc gcg gca aaa gag tat gcc act cgc ttg ctg gcg ctg cgt
Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
65 70 75 80

240

gaa gag ctg aaa gat gag ctg gaa atc gta atg cgc gtc tat ttt gaa
Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
85 90 95

288

aag ccg cgt acc acg gtg ggc tgg aaa ggg ctg att aac gat ccg cat
Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
100 105 110

336

atg gat aat agc ttc cag atc aac gac ggt ctg cgt ata gcc cgt aaa
Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
115 120 125

384

ttg ctg ctt gat att aac gac agc ggt ctg cca gcg gca ggt gag ttt
Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
130 135 140

432

ctc gat atg atc acc cca caa tat ctc gct gac ctg atg agc tgg ggc
Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
145 150 155 160

480

ES 2 559 193 T3

gca att ggc gca cgt acc acc gaa tcg cag gtg cac cgc gaa ctg gca Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala 165 170 175	528
tca ggg ctt tct tgt ccg gtc ggc ttc aaa aat ggc acc gac ggt acg Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr 180 185 190	576
att aaa gtg gct atc gat gcc att aat gcc gcc ggt gcg ccg cac tgc Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys 195 200 205	624
ttc ctg tcc gta acg aaa tgg ggg cat tcg gcg att gtg aat acc agc Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser 210 215 220	672
ggt aac ggc gat tgc cat atc att ctg cgc ggc ggt aaa gag cct aac Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn 225 230 235 240	720
tac agc gcg aag cac gtt gct gaa gtg aaa gaa ggg ctg aac aaa gca Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala 245 250 255	768
ggc ctg cca gca cag gtg atg atc gat ttc agc cat gct aac tcg tcc Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser 260 265 270	816
aaa caa ttc aaa aag cag atg gat gtt tgt gct gac gtt tgc cag cag Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln 275 280 285	864
att gcc ggt ggc gaa aag gcc att att ggc gtg atg gtg gaa agc cat Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His 290 295 300	912
ctg gtg gaa ggc aat cag agc ctc gag agc ggg gag ccg ctg gcc tac Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr 305 310 315 320	960
ggt aag agc atc acc gat gcc tgc atc ggc tgg gaa gat acc gat gct Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala 325 330 335	1008
ctg tta cgt caa ctg gcg aat gca gta aaa gcg cgt cgc ggg taa Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly 340 345 350	1053

<210> 2

< 211> 350

< 212> PRT

< 213> Escherichia coli

5

<400> 2

Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu 1 5 10 15
--

Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala 20 25 30

Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys

ES 2 559 193 T3

35 40 45

Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
50 55 60

Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
85 90 95

Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
100 105 110

Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
115 120 125

Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
130 135 140

Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala
165 170 175

Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
180 185 190

Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
195 200 205

Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
210 215 220

Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
225 230 235 240

Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
245 250 255

Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
260 265 270

Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
275 280 285

Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
290 295 300

ES 2 559 193 T3

Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr
 305 310 315 320

Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala
 325 330 335

Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly
 340 345 350

<210> 3

< 211> 1053

< 212> DNA

5 < 213> *Salmonella typhimurium*

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(1053)

< 223> aroG región codificante

10 <400> 3

atg aat tat cag aac gac gat tta cgc att aaa gaa atc aac gag tta	48
Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Asn Glu Leu	
1 5 10 15	

tta cct ccg gtc gcg ctg ctg gaa aag ttt ccc gcc acg gaa aat gca	96
Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala	
20 25 30	

gca aat acc gtt gct cac gcg cgc aaa gcc atc cat aaa att ctc aaa	144
Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys	
35 40 45	

ggc aat gac gat cgt ctg ctg gtg atc ggt cct tgt tca att cat	192
Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His	
50 55 60	

gat ccg gca gcg gcg aaa gag tat gcc gcc cgt ttg ctg gcg cta cgc	240
Asp Pro Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Arg Leu Leu Ala Leu Arg	
65 70 75 80	

gat gag ctt caa ggc gag ctt gaa att gtc atg cgc gtc tat ttt gag	288
Asp Glu Leu Gln Gly Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu	
85 90 95	

aaa ccg cgt acc acc gtc ggc tgg aaa ggg ctg att aac gat ccg cac	336
Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His	
100 105 110	

atg gat aac agc ttc cag att aac gac ggt ctg cgt att gcg cgc aaa	384
Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys	
115 120 125	

ctg ctg ctg gat att aac gac agc ggc ctg cct gcc gcc ggc gaa ttc	432
Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe	
130 135 140	

ctc gat atg atc acg ccg caa tat ctg gcc gat ctg atg agc tgg ggc	480
Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly	
145 150 155 160	

ES 2 559 193 T3

gcc att ggc gcg cgg act act gaa tcc cag gtt cat cgc gaa ttg gcg Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala 165 170 175	528
tct ggc ctc tct tgt ccg gtc ggt ttt aaa aat ggt act gat ggc acg Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr 180 185 190	576
att aaa gtc gcc att gac gcc atc aac gcc ggc gcg ccg cat tgc Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys 195 200 205	624
ttc ctc tcc gtc act aaa tgg ggt cat tcg gcg att gtg aat acc agc Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser 210 215 220	672
ggc aac ggc gac tgc cat atc att ctg cgc ggc ggt aaa gcg cca aac Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Ala Pro Asn 225 230 235 240	720
tat agc gcg cag cat gtt gct gag gtg aaa gaa ggc ctc acc aaa gcg Tyr Ser Ala Gln His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Thr Lys Ala 245 250 255	768
gga ctg acg ccg cag gtc atg atc gat ttc agc cat gcc aac tcc tgt Gly Leu Thr Pro Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Cys 260 265 270	816
aag caa ttt caa aag cag atg gag gtt tgc gcc gat gtc tgc cag cag Lys Gln Phe Gln Lys Gln Met Glu Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln 275 280 285	864
ata gcg ggc ggt gaa aaa gcg att att ggc gtg atg gta gag agt cat Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His 290 295 300	912
ctg gta gaa gga aac cag agt ctg gaa agc ggt cag ccg ctg acc tac Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Gln Pro Leu Thr Tyr 305 310 315 320	960
ggt aaa agc att act gac gcc tgt att ggc tgg gaa gat acc gat gcg Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala 325 330 335	1008
ctg ctt cgt cag ttg tcg gca gcg gta aaa gcc cgt cgc ggc taa Leu Leu Arg Gln Leu Ser Ala Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly 340 345 350	1053

<210> 4
< 211> 350
5 < 212> PRT
< 213> *Salmonella typhimurium*

<400> 4
Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Asn Glu Leu
1 5 10 15
Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
20 25 30

ES 2 559 193 T3

Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
35 40 45

Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
50 55 60

Asp Pro Ala Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Arg Leu Leu Ala Leu Arg
65 70 75 80

Asp Glu Leu Gln Gly Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
85 90 95

Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
100 105 110

Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
115 120 125

Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
130 135 140

Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala
165 170 175

Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
180 185 190

Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
195 200 205

Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
210 215 220

Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Ala Pro Asn
225 230 235 240

Tyr Ser Ala Gln His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Thr Lys Ala
245 250 255

Gly Leu Thr Pro Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Cys
260 265 270

Lys Gln Phe Gln Lys Gln Met Glu Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
275 280 285

Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His

ES 2 559 193 T3

	290	295	300	
	Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Gln Pro Leu Thr Tyr			
	305	310	315	320
	Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala			
	325	330	335	
	Leu Leu Arg Gln Leu Ser Ala Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly			
	340	345	350	
5	<210> 5			
	< 211> 1053			
	< 212> DNA			
	< 213> Shigella flexneri			
	<220>			
	< 221> CDS			
	< 222> (1)..(1053)			
	< 223> aroG región codificante			
10	<400> 5			
	atg aat tat cag aac gac gat tta cgc atc aaa gaa atc aaa gag tta			48
	Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu			
	1	5	10	15
	ctt cct cct gtc gca ttg ctg gaa aaa ttc ccc gca act gaa aat gcc			96
	Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala			
	20	25	30	
	gcg aat acg gtt gcc cat gcc cga aaa gcg atc cat aag atc ctg aaa			144
	Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys			
	35	40	45	
	ggg aat gat gat cgc ctg ttg gtg att ggc ccg tgc tca att cat			192
	Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His			
	50	55	60	
	gat cct gtc gcg gct aaa gag tat gcc act cgc ttg ctg gcg ctg cgt			240
	Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg			
	65	70	75	80
	gaa gag ctg aaa gat gag ctg gaa atc gta atg cgc gtc tat ttt gaa			288
	Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu			
	85	90	95	
	aag ccg cgt acc acg gtg ggc tgg aaa ggg ttg att aac gat ccg cat			336
	Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His			
	100	105	110	
	atg gat aac acg ttc cag atc aac gac ggt ctg cgt ata gcc cgt aaa			384
	Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys			
	115	120	125	
	ttg ctg ctt gat att aac gac agc ggt ctg cca gcg gcg ggt gag ttt			432
	Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe			
	130	135	140	
	ctc gat atg atc act cct cag tat ctc gct gac ctg atg agc tgg ggc			480
	Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly			

ES 2 559 193 T3

145	150	155	160	
gca att ggt gca cgt acc acg gaa tcg cag gtg cac cgc gaa ctg gcg Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala 165 170 175				528
tct ggt ctt tct tgt ccg gta ggt ttt aaa aat ggc aca gac ggt acg Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr 180 185 190				576
att aaa gtg gct atc gat gcc att aat gcc gcc ggt gcg ccg cac tgc Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys 195 200 205				624
ttc ctg tcc gta act aaa tgg ggg cat tcg gcg att gtg aat acc agt Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser 210 215 220				672
ggg aac ggc gat tgc cat atc att ctg cgc ggc ggt aaa gag cct aac Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn 225 230 235 240				720
tac agc gcg aag cac gtt gct gaa gtg aaa gaa ggg ctg aac aaa gca Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala 245 250 255				768
ggg ctg cca gct cag gtg atg atc gat ttc agc cat gct aat tcg tcc Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser 260 265 270				816
aaa caa ttc aaa aag cag atg gat gtt tgt gct gac gtt tgc cag cag Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln 275 280 285				864
att gcc ggt ggc gaa aag gcc att att ggc gtg atg gtg gaa agc cat Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His 290 295 300				912
ctg gtg gaa ggc aat cag agc ctc gat agc ggg gag ccg ctg gcc tac Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Asp Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr 305 310 315 320				960
ggg aag agc atc acc gat gcc tgc att ggc tgg gaa gat acc gat gct Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala 325 330 335				1008
ctg tta cgt caa ctg gtg aat gca gta aaa ggc cgt cgc ggg taa Leu Leu Arg Gln Leu Val Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly 340 345 350				1053

5

<210> 6
<211> 350
<212> PRT
<213> Shigella flexneri

<400> 6
Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
1 5 10 15
Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
20 25 30

ES 2 559 193 T3

Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
35 40 45

Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
50 55 60

Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
85 90 95

Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
100 105 110

Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
115 120 125

Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
130 135 140

Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala
165 170 175

Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
180 185 190

Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
195 200 205

Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
210 215 220

Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
225 230 235 240

Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
245 250 255

Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
260 265 270

Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
275 280 285

ES 2 559 193 T3

Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
 290 295 300

Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Asp Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr
 305 310 315 320

Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala
 325 330 335

Leu Leu Arg Gln Leu Val Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly
 340 345 350

<210> 7

< 211> 1053

< 212> DNA

5 < 213> Escherichia coli

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(1053)

< 223> aroG región codificante

10 <220>

< 221> mutación

< 222> (98)..(98)

< 223> c -> t transición

15 <220>

< 221> mutación

< 222> (632)..(632)

< 223> c -> t transición

<400> 7

atg	aat	tat	cag	aac	gac	gat	tta	cgc	atc	aaa	gaa	atc	aaa	gag	tta	
Met	Asn	Tyr	Gln	Asn	Asp	Asp	Leu	Arg	Ile	Lys	Glu	Ile	Lys	Glu	Leu	
1									10						15	

48

ctt	cct	cct	gtc	gca	ttg	ctg	gaa	aaa	ttc	ccc	gct	act	gaa	aat	gcc	
Leu	Pro	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	Glu	Lys	Phe	Pro	Ala	Thr	Glu	Asn	Ala	
20									25						30	

96

gtg	aat	acg	gtt	gcc	cat	gcc	cga	aaa	gcg	atc	cat	aag	atc	ctg	aaa	
Val	Asn	Thr	Val	Ala	His	Ala	Arg	Lys	Ala	Ile	His	Lys	Ile	Leu	Lys	
35									40						45	

144

ggt	aat	gat	gtc	ctg	ttg	gtt	gtg	att	ggc	cca	tgc	tca	att	cat		
Gly	Asn	Asp	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Ile	Gly	Pro	Cys	Ser	Ile	His		
50									55						60	

192

gat	cct	gtc	gcf	gca	aaa	gag	tat	gcc	act	cgc	ttg	ctg	gcf	ctg	cgt	
Asp	Pro	Val	Ala	Ala	Lys	Glu	Tyr	Ala	Thr	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Arg	
65									70						80	

240

gaa	gag	ctg	aaa	gat	gag	ctg	gaa	atc	gta	atg	cgc	gtc	tat	ttt	gaa	
Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	Glu	Leu	Glu	Ile	Val	Met	Arg	Val	Tyr	Phe	Glu	
85									90						95	

288

aag	ccg	cgt	acc	acg	gtg	ggc	tgg	aaa	ggg	ctg	att	aac	gat	ccg	cat	
Lys	Pro	Arg	Thr	Thr	Val	Gly	Trp	Lys	Gly	Leu	Ile	Asn	Asp	Pro	His	
100									105						110	

336

ES 2 559 193 T3

atg gat aat agc ttc cag atc aac gac ggt ctg cgt ata gcc cgt aaa Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys 115 120 125	384
ttg ctg ctt gat att aac gac agc ggt ctg cca gcg gca ggt gag ttt Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe 130 135 140	432
ctc gat atg atc acc cca caa tat ctc gct gac ctg atg agc tgg ggc Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly 145 150 155 160	480
gca att ggc gca cgt acc acc gaa tcg cag gtg cac cgc gaa ctg gca Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala 165 170 175	528
tca ggg ctt tct tgt ccg gtc ggc ttc aaa aat ggc acc gac ggt acg Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr 180 185 190	576
att aaa gtg gct atc gat gcc att aat gcc gcc ggt gcg ccg cac tgc Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys 195 200 205	624
ttc ctg ttc gta acg aaa tgg ggg cat tcg gcg att gtg aat acc agc Phe Leu Phe Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser 210 215 220	672
ggt aac ggc gat tgc cat atc att ctg cgc ggc ggt aaa gag cct aac Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn 225 230 235 240	720
tac agc gcg aag cac gtt gct gaa gtg aaa gaa ggg ctg aac aaa gca Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala 245 250 255	768
ggc ctg cca gca cag gtg atg atc gat ttc agc cat gct aac tcg tcc Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser 260 265 270	816
aaa caa ttc aaa aag cag atg gat gtt tgt gct gac gtt tgc cag cag Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln 275 280 285	864
att gcc ggt ggc gaa aag gcc att att ggc gtg atg gtg gaa agc cat Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His 290 295 300	912
ctg gtg gaa ggc aat cag agc ctc gag agc ggg gag ccg ctg gcc tac Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr 305 310 315 320	960
ggt aag agc atc acc gat gcc tgc atc ggc tgg gaa gat acc gat gct Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala 325 330 335	1008
ctg tta cgt caa ctg gcg aat gca gta aaa gcg cgt cgc ggg taa Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly 340 345 350	1053

<210> 8
 < 211> 350
 < 212> PRT
 < 213> Escherichia coli

ES 2 559 193 T3

<400> 8

Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
1 5 10 15

Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
20 25 30

Val Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys
35 40 45

Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His
50 55 60

Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu
85 90 95

Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
100 105 110

Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
115 120 125

Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
130 135 140

Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala
165 170 175

Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
180 185 190

Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
195 200 205

Phe Leu Phe Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
210 215 220

Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
225 230 235 240

Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala

ES 2 559 193 T3

	245	250	255
	Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser		
	260	265	270
	Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln		
	275	280	285
	Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His		
	290	295	300
	Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr		
	305	310	315
	320		
	Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala		
	325	330	335
	Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly		
	340	345	350
5	<210> 9		
	< 211> 2054		
	< 212> DNA		
	< 213> Escherichia coli		
10	<220>		
	< 221> CDS		
	< 222> (501)..(1553)		
	< 223> aroG región codificante		
	<400> 9		
	ccgttattgt cgacgttatt tggcgcgaca tttcacggg cgtcaggggc tacctggccc 60		
	gcacatcagctg cggcggttgc ctggccgtta tttagttgcg ctccgcatac ggcagccagt 120		
	gcggcaccgc tggcaaggct tagagtggca gtcagaaata atgtggccag ttttgtcatt 180		
	ttcataggat gctcctgtta tggtcgttat gtcggataac ctcttccaac agtgcatttg 240		
	cagggtgaata taaggcattt gtttaagatt tcagccaggt tatgaaaacgc agcagagaat 300		
	cttggaaataa ttaacaaaca aaggagttac agttagaaat tgttaggagag atctcgtttt 360		
	tcgcgacaat ctggcgaaaa tcttgctaatt tccaggatta atccgttcat agtgtaaaac 420		
	cccgtttaca cattctgacg gaagatatac atttggaaactt ttgcattcac taagataagt 480		
	atggcaaacac tggaaacagac atg aat tat cag aac gac gat tta cgc atc aaa 533		
	1	5	10
	Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys		
	Glu Ile Lys Glu Leu Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro 581		
	15	20	25
	gct act gaa aat gcc gcg aat acg gtt gcc cat gcc cga aaa gcg atc 629		
	Ala Thr Glu Asn Ala Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile		

ES 2 559 193 T3

30	35	40	
cat aag atc ctg aaa ggt aat gat gat cgc ctg ttg gtt gtg att ggc His Lys Ile Leu Lys Gly Asn Asp Asp Arg Ile Leu Val Val Ile Gly	45	50	677
cca tgc tca att cat gat cct gtc gcg gca aaa gag tat gcc act cgc Pro Cys Ser Ile His Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg	60	65	725
ttg ctg gcg ctg cgt gaa gag ctg aaa gat gag ctg gaa atc gta atg Leu Leu Ala Leu Arg Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met	80	85	773
cgc gtc tat ttt gaa aag ccg cgt acc acg gtc ggc tgg aaa ggg ctg Arg Val Tyr Phe Glu Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu	95	100	821
att aac gat ccg cat atg gat aat agc ttc cag atc aac gac ggt ctg Ile Asn Asp Pro His Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu	110	115	869
cgt ata gcc cgt aaa ttg ctg ctt gat att aac gac agc ggt ctg cca Arg Ile Ala Arg Lys Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro	125	130	917
gcg gca ggt gag ttt ctc gat atg atc acc cca caa tat ctc gct gac Ala Ala Gly Glu Phe Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp	140	145	965
ctg atg agc tgg ggc gca att ggc gca cgt acc acc gaa tcg cag gtg Leu Met Ser Trp Gly Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val	160	165	1013
cac cgc gaa ctg gca tca ggg ctt tct tgt ccg gtc ggc ttc aaa aat His Arg Glu Leu Ala Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn	175	180	1061
ggc acc gac ggt acg att aaa gtc gct atc gat gcc att aat gcc gcc Gly Thr Asp Gly Thr Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala	190	195	1109
ggt gcg ccg cac tgc ttc ctg tcc gta acg aaa tgg ggg cat tcg gcg Gly Ala Pro His Cys Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala	205	210	1157
att gtc aat acc agc ggt aac ggc gat tgc cat atc att ctg cgc ggc Ile Val Asn Thr Ser Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly	220	225	1205
ggt aaa gag cct aac tac agc gcg aag cac gtt gct gaa gtc aaa gaa Gly Lys Glu Pro Asn Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu	240	245	1253
ggg ctg aac aaa gca ggc ctg cca gca cag gtc atg atc gat ttc agc Gly Leu Asn Lys Ala Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser	255	260	1301
cat gct aac tcg tcc aaa caa ttc aaa aag cag atg gat gtt tgt gct His Ala Asn Ser Ser Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala	270	275	1349
gac gtt tgc cag cag att gcc ggt ggc gaa aag gcc att att ggc gtc Asp Val Cys Gln Gln Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val	285	290	1397
		295	

ES 2 559 193 T3

atg gtg gaa agc cat ctg gtg gaa ggc aat cag agc ctc gag agc ggg Met Val Glu Ser His Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly 300 305 310 315	1445
gag ccg ctg gcc tac ggt aag agc atc acc gat gcc tgc atc ggc tgg Glu Pro Leu Ala Tyr Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp 320 325 330	1493
gaa gat acc gat gct ctg tta cgt caa ctg gcg aat gca gta aaa gcg Glu Asp Thr Asp Ala Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala 335 340 345	1541
cgt cgc ggg taa ggtttaattt tcggatgcgc cgtcagagtgc gcgtatccga Arg Arg Gly 350	1593
tgaatcacca caggcctgat aagtgcgcgc gcgtcgcatc aggcaatgtt ctccatttt agcaacaaaa aagccgactc acttgcagtc ggctttctca tttaaacga atgacgttta cttcgcttta ccctggtttgc caaccgcgc tgcttcgcgc gcatctcgat cagcattacc cagataatag cgtttcagcg gtttggaaatt ctcgtcaac tcatacacca gggcacgcc agtcgggata ttaagctcaa gaatctcttc ttgcgtcatg ttatcaagat atttcaccag cgcacgtaaa gagttaccgt gtgcagcgat gatcacgcgc tcaccgcgt tcatacgcgg cagaatagtt tcattccagt aaggatcac gcggtcaatg gtcagcgcca ggcttccgt cagcggcagt tcttcgc tcagttcgc gtaacgcggaa t	1653 1713 1773 1833 1893 1953 2013 2054

<210> 10
 < 211> 350
 < 212> PRT
 < 213> Escherichia coli

5

<400> 10
Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu 1 5 10 15
Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala 20 25 30
Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys 35 40 45
Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His 50 55 60
Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg 65 70 75 80
Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu 85 90 95

ES 2 559 193 T3

Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His
100 105 110

Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys
115 120 125

Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe
130 135 140

Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly
145 150 155 160

Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala
165 170 175

Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr
180 185 190

Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys
195 200 205

Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser
210 215 220

Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn
225 230 235 240

Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala
245 250 255

Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser
260 265 270

Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln
275 280 285

Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His
290 295 300

Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr
305 310 315 320

Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala
325 330 335

Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly
340 345 350

REIVINDICACIONES

1.- Secuencia de nucleótidos (ADN) que codifica para variantes resistentes a retroalimentación del enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosonat-7-fosfato-sintasa (DAHP-sintasa), caracterizados porque su secuencia de aminoácidos presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, incluyendo delección y/o inserción de 1 a 20 aminoácidos, y comprende esencialmente una longitud de 350 aminoácidos, y contiene en las correspondientes secuencias de aminoácidos los intercambios de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 seleccionados a partir del grupo

- 5 a) intercambio de L-alanina en posición 33 por L-valina,
- 10 b) intercambio de L-alanina en posición 33 por L-valina, e intercambio de L-serina en posición 211 por L-fenilalanina,

y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 contiene, en caso dado, adicionalmente uno o varios de los intercambios seleccionados a partir del grupo

- c) intercambio de L-lisina en posición 14 por un aminoácido seleccionado a partir del grupo L-asparagina y L-glutamina, preferentemente L-asparagina,
- 15 d) intercambio de L-valina en posición 67 por un aminoácido seleccionado a partir del grupo L-alanina, L-lisina, L-arginina y L-histidina, preferentemente L-alanina,
- e) intercambio de L-treonina en posición 74 por un aminoácido seleccionado a partir del grupo L-alanina, L-lisina, L-arginina y L-histidina, preferentemente L-alanina,
- 20 f) intercambio de ácido L-glutámico en posición 81 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo ácido L-aspártico, L-serina, L-alanina y L-treonina, preferentemente ácido L-aspártico,
- g) intercambio de L-lisina en posición 84 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-glutamina, L-serina, L-treonina, ácido L-glutámico, ácido L-aspártico y L-asparagina, preferentemente L-glutamina,
- 25 h) intercambio de ácido L-aspártico en posición 85 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-alanina y glicina, preferentemente glicina,
- i) intercambio de ácido L-glutámico en posición 238 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo ácido L-aspártico, L-serina, L-alanina y L-treonina, preferentemente L-alanina,
- j) intercambio de L-lisina en posición 244 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-glutamina, ácido L-glutámico, ácido L-aspártico, L-serina, L-treonina y L-asparagina, preferentemente L-glutamina,
- 30 k) intercambio de L-asparagina en posición 254 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-treonina, L-serina, ácido L-glutámico y ácido L-aspártico, preferentemente L-treonina,
- l) intercambio de L-prolina en posición 259 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-serina, L-treonina, preferentemente L-treonina,
- m) intercambio de L-alanina en posición 260 por L-prolina,
- 35 n) intercambio de L-serina en posición 272 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-cisteina y L-metionina, preferentemente L-cisteina,
- o) intercambio de L-lisina en posición 276 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-glutamina, ácido L-glutámico, ácido L-aspártico, L-serina, L-treonina y L-asparagina, preferentemente L-glutamina,
- p) intercambio de ácido L-aspártico en posición 280 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-serina, L-alanina, ácido L-glutámico y L-treonina, preferentemente ácido L-glutámico,
- 40 q) intercambio de ácido L-glutámico en posición 313 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-serina, L-alanina, ácido L-aspártico y L-treonina, preferentemente ácido L-aspártico,

- r) intercambio de ácido L-glutámico en posición 316 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-glutamina, L-serina, L-treonina, ácido L-aspártico y L-asparagina, preferentemente L-glutamina,
 - s) intercambio de L-alanina en posición 319 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-treonina, L-valina y L-serina, preferentemente L-treonina,
 - 5 t) intercambio de L-alanina en posición 342 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo L-serina, L-valina y L-treonina, preferentemente L-serina o L-valina,
 - u) intercambio de L-asparagina en posición 343 por un aminoácido, seleccionado a partir del grupo ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-serina, L-alanina y L-treonina, preferentemente L-alanina.
- 10 2.- Secuencia de nucleótidos (ADN) según la reivindicación 1, caracterizada porque éstos proceden de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae.
- 3.- Vectores, caracterizados porque contienen las secuencias de nucleótidos según las reivindicaciones 1 o 2, y en caso dado replican microorganismos de la familia Enterobacteriaceae.
- 4.- Microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, caracterizados porque
- 15 a) contienen las secuencias de nucleótidos según las reivindicaciones 1 o 2, y en los que las secuencias de nucleótidos que codifican para la DAHP-sintasa se presentan exprimidas.
- 5.- Microorganismos según la reivindicación 4, caracterizados porque mediante la delección o inserción de 1 a 20 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 la concentración o actividad del producto génico aroG (proteína) no están modificadas, respecto a la actividad o concentración del producto génico sin delección o inserción de 1 a 20 aminoácidos.
- 20 6.- Microorganismos según las reivindicaciones 4 a 5, caracterizados porque se obtienen mediante transformación, transducción, conjugación o una combinación de estos métodos, con un vector que contiene al menos una de las citadas secuencias de nucleótidos replicables, que codifican para el enzima DAHP-sintasa, o sus alelos o partes de los mismos y/o un promotor.
- 25 7.- Microorganismos según la reivindicación 6, caracterizado porque el número de copias de al menos una de las citadas secuencia de nucleótidos replicables, que codifican para el enzima DAHP-sintasa, o de alelos de las mismas se presenta aumentado en al menos 1.
- 30 8.- Microorganismos según la reivindicación 7, caracterizados porque el número de copias del gen aroG o de alelos se presenta aumentado en un máximo de 8, preferentemente un máximo de 4, o caracterizados porque el número de copias, aumentado en al menos 1, se alcanza mediante integración del gen o de los alelos en el cromosoma de los microorganismos, o mediante un vector replicante por vía extracromosómica.
- 9.- Microorganismos según las reivindicaciones 4 a 8, caracterizados porque
- a) se muta la región de promotor y regulación o el punto de unión de ribosomas en línea de entrada del gen aroG, o
 - b) se incorporan cassettes de expresión o promotores en línea de entrada del gen aroG.
- 35 10.- Microorganismos según las reivindicaciones 4 a 9, caracterizados porque la expresión del gen aroG o del alelo se encuentra bajo el control de un promotor que amplifica la expresión del gen.
- 40 11.- Microorganismos según las reivindicaciones 4 a 10, caracterizados porque, mediante la amplificación del gen aroG, la concentración o actividad del producto génico aroG (proteína) se aumentan en al menos un 10 %, respecto a la actividad o concentración del producto génico en el microorganismo no recombinante para el gen aroG o la cepa madre.
- 12.- Microorganismos según las reivindicaciones 4 a 11, caracterizados porque los microorganismos son seleccionados a partir de las especies Escherichia, Erwinia, Providencia y Serratia.

- 13.- Microorganismos según las reivindicaciones 4 a 12, caracterizados porque producen compuestos químicos orgánicos del grupo de compuestos de la vía metabólica del shikimato, preferentemente L-triptófano o L-fenilalanina.
- 14.- Procedimiento para la obtención de compuestos químicos orgánicos seleccionados a partir del grupo de compuestos de la vía metabólica del shikimato, preferentemente de L-aminoácidos aromáticos, o de aditivos para piensos que contienen los citados compuestos, mediante fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, caracterizado porque
- 5 a) los microorganismos que producen compuestos químicos orgánicos según las reivindicaciones 4 a 13 se cultivan en un medio bajo condiciones en las que los compuestos químicos orgánicos se concentran en el medio o en las células, y
- 10 b) los compuestos químicos orgánicos se aíslan del caldo de fermentación, permaneciendo o eliminándose completamente, en caso dado, otros componentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad, o en fracciones (≥ 0 a 100 %) en el producto aislado.
- 15 15.- Procedimiento para la obtención de L-triptófano o aditivos para piensos que contienen L-triptófano mediante fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae según la reivindicación 4, caracterizado porque
- 15 a) los microorganismos que producen L-triptófano según las reivindicaciones 4 a 13 se cultivan en un medio bajo condiciones en las que L-triptófano se concentra en el medio o en las células, y
- 15 b) L-triptófano o el aditivo para piensos que contiene L-triptófano se aísla del caldo de fermentación, permaneciendo o eliminándose completamente, en caso dado, otros componentes del caldo de fermentación y/o la biomasa en su totalidad, o en fracciones (≥ 0 a 100 %) en el producto aislado.
- 20 16.- Procedimiento según las reivindicaciones 14 y 15, caracterizado porque para la obtención de L-triptófano se fermenta microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en los que, adicionalmente de manera simultánea, se amplifica, en especial se sobreexpresó uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:
- 25 • al menos un gen del operón triptófano que codifica para antranilato-sintasa, antranilato-fosforibosiltransferasa, fosforibosilantranilato-isomerasa, indol-3-glicerinfosfato-sintasa y triptófano-sintasa,
- 25 • el gen serA que codifica para 3-fosfoglicerato-dehidrogenasa,
- 25 • el gen serB que codifica para fosfoserinfosfataza,
- 25 • el gen serC que codifica para fosfoserinaminotransferasa,
- 25 • el gen aroF que codifica para DHAP-sintasa sensible a L-tirosina,
- 25 • el gen aroH que codifica para DHAP-sintasa sensible a L-triptófano,
- 30 • el gen pps que codifica para fosfoenolpiruvato-sintasa,
- 30 • el gen pckA que codifica para fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa,
- 30 • el gen tktA que codifica para transcetolasa A,
- 30 • el gen tktB que codifica para transcetolasa B,
- 30 • el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yddG de Escherichia coli.
- 35 17.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 14 a 16, caracterizado porque para la obtención de L-triptófano se fermenta microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en los que, adicionalmente de manera simultánea, se debilita, en caso dado se elimina, o se reduce la expresión de uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:

- el gen tnaA que codifica para triptofanasa,
 - el gen trpR que codifica para el represor del operón trp,
 - el gen tyrA que codifica para corismato-mutasa T y prefenato-dehidrogenasa,
 - el gen pheA que codifica para corismato-mutasa P y prefenato-dehidrogenasa,
- 5 • el gen mtr que codifica para la proteína de transporte específica de triptófano,
- el gen tnaB que codifica para triptófano-permeasa,
 - el gen aroP que codifica para el transportador de aminoácidos aromáticos,
 - el gen sdaA que codifica para L-serin-deaminasa,
 - el gen pgi que codifica para glucosa-6-fosfato-isomerasa,
- 10 • el gen tyrB que codifica para tirosin-aminotransferasa,
- el gen glpR que codifica para el represor del regulón glp,

Estas medidas se llevan a cabo en caso dado adicionalmente a, o bien en combinación apropiada con las medidas indicadas de amplificación de genes para el aumento de la producción de triptófano.

15 18.- Procedimiento según las reivindicaciones 14-17, caracterizado porque los microorganismos se cultivan en un procedimiento discontinuo, un procedimiento discontinuo de alimentación, un procedimiento discontinuo de alimentación reiterada, o un procedimiento continuo, y/o porque la concentración de compuestos químicos orgánicos seleccionados a partir del grupo de compuestos de la vía metabólica del shikimato se determina en uno o varios momentos en el transcurso de la fermentación.