

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 705**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12P 13/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2007 PCT/KR2007/006933**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2008 WO08082179**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007 E 07860723 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2115121**

54 Título: **Escherichia coli recombinante modificada por ingeniería genética productora de L-triptófano que tiene originalmente productividad de L-fenilalanina, y método para producir L-triptófano usando el microorganismo**

30 Prioridad:

**29.12.2006 KR 20060137650**

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

**27.03.2017**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
500 NAMDAEMUNRO 5-GA  
JUNG-GU, SEOUL 100-095, KR**

72 Inventor/es:

**JU, JAE-YEONG;  
CHOI, HYANG;  
KOH, EUN-SUNG;  
LEE, JI-SUN;  
LEE, JIN-HO;  
KIM, SO-YOUNG;  
JIN, CHANG-HYUN y  
PARK, YOUNG-HOON**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 606 705 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

*Escherichia coli* recombinante modificada por ingeniería genética productora de L-triptófano que tiene originalmente productividad de L-fenilalanina, y método para producir L-triptófano usando el microorganismo

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un microorganismo que tiene productividad de L-triptófano y a un método para producir L-triptófano usando el mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a una *E. coli* recombinante que tiene productividad de triptófano producida por ingeniería genética a través de la pérdida de su auxotrofia para triptófano, bloqueando la biosíntesis de L-fenilalanina y aumentando el gen implicado en la biosíntesis de triptófano a partir de la *E. coli* mutante KFCC 10066 que tiene productividad de L-fenilalanina, y a un método para producir L-triptófano usando el mismo.

10

15 Antecedentes de la técnica

El L-triptófano es uno de los aminoácidos esenciales, el cual se ha usado como aditivo alimenticio o como materia prima para medicinas incluyendo inyecciones y alimentos saludables debido a su efecto hipnótico o efecto tranquilizante. El L-triptófano se ha producido por síntesis química, reacción enzimática y fermentación por microorganismo.

20

Para la síntesis química, se requiere reacción a alta temperatura y alta presión y tanto el tipo D como el tipo L están incluidos en el producto de reacción, lo cual hace difícil el proceso de purificación. La reacción enzimática tiene problemas de alto precio del indol y la serina usados como sustratos y de inestabilidad de la enzima, como se muestra en la descripción de patente de Mitsui Toatsu (Publicación de Patente Coreana N° 90-005773).

25

Por lo tanto, la producción de L-triptófano en gran parte ha dependido de la fermentación directa usando un microorganismo. La producción de L-triptófano según la fermentación por microorganismo convencional en su mayoría se ha llevado a cabo en auxótrofo y mutante con mutación de región control de diversos microorganismos incluyendo *E. coli* y *Corynebacterium*. Con el asombroso avance de las técnicas de ADN recombinante desde 1980, se han descrito la ruta del metabolismo y su mecanismo de regulación. Desde entonces, los investigadores han tenido éxito en el desarrollo de excelentes cepas recombinantes usando técnicas de manipulación génica, lo cual llevó a un notable incremento en la producción.

30

Algunas de las Patentes Coreanas en relación con la producción de triptófano mediante fermentación directa usando un microorganismo describen respectivamente la producción de triptófano mediante el uso de cepas mutantes que tienen resistencia análoga a triptófano o auxotrofia (Publicación de Patente Coreana N° 87-1813, 90-8251 y 92-7405) y la producción de triptófano mediante el uso de cepas recombinantes (Publicación de Patente Coreana N° 90-5772 y 91-5672). En el caso de usar una cepa resistente análoga a triptófano, era un objetivo muy importante superar la retroinhibición de enzimas en la biosíntesis de triptófano. En el caso de usar una cepa recombinante, era un objetivo muy importante la clonación de los genes implicados en la biosíntesis de triptófano. Y, los métodos anteriores, de hecho, registraron un gran éxito. Sin embargo, aunque el método convencional para producir L-triptófano que usa la *E. coli* mutante convencional tiene una ventaja de producción de L-triptófano por el uso de medio de cultivo económico, tiene una desventaja de baja productividad de L-triptófano. Los presentes inventores consideraron que la producción de L-triptófano mediante fermentación de *E. coli* CJ285 (KCCM-10534, PCT/KR2004/003030) que se desarrolló y conservó por la compañía de los presentes inventores también tiene un problema de baja productividad. Por tanto, los presentes inventores consideraron que era importante el desarrollo de cepa mutante excelente como cepa madre para maximizar la productividad de L-triptófano por técnicas de ADN recombinante.

35

40

45

50

Por otro lado, la cepa productora de L-fenilalanina (KFCC 10066, Publicación de Patente Coreana N° 1985-0001232) se había desarrollado y conservado por la compañía de los presentes inventores puesto que se pueden sintetizar aminoácidos aromáticos (L-triptófano, L-fenilalanina, L-tirosina) en una ruta de metabolismo común. Entonces, los presentes inventores consideraron que la manipulación apropiada de la cepa anterior por técnicas de ingeniería genética, podría incrementar la productividad de L-triptófano. Por lo tanto, los presentes inventores, usaron la cepa productora de L-fenilalanina (KFCC 10066, Publicación de Patente Coreana N° 1985-0001232) como cepa madre para una cepa recombinante de *E. coli* productora de L-triptófano con alto rendimiento a través de la pérdida de la auxotrofia del triptófano, bloqueando la biosíntesis de L-fenilalanina y aumentando el gen implicado en la biosíntesis de triptófano.

55

60

Descripción de la invención

Problema técnico

La presente invención proporciona una cepa productora de triptófano desarrollada a partir de la cepa madre de *E. coli* (KFCC 10066) que produce L-fenilalanina liberando la auxotrofia del triptófano en el cromosoma e inactivando

65

los genes *pheA*, *trpA*, *mtr*, y *tnaAB* y mutando los genes *aroG* y *trpE* en el cromosoma para bloquear la biosíntesis de L-fenilalanina e inducir la producción de triptófano.

5 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un método para producir L-triptófano a alta concentración cultivando la cepa recombinante de *E. coli* en medio de fermentación que contiene glucosa por fermentación directa.

Solución técnica

10 Los objetivos anteriores y otros objetivos de la presente invención se pueden alcanzar a través de las siguientes realizaciones de la presente invención.

La presente invención se describe con detalle a continuación.

15 El método para producir L-triptófano de la presente invención comprende las siguientes etapas: liberar la auxotrofia para triptófano de la cepa mutante de *E. coli* (KFCC 10066) que tiene productividad de L-fenilalanina en el cromosoma; bloquear la biosíntesis de L-fenilalanina, es decir, inactivar el gen *pheA* implicado en la biosíntesis de L-fenilalanina, el gen *trpR* implicado en la regulación de la biosíntesis de triptófano, el gen *mtr* implicado en la reentrada intracelular del triptófano producido, y el gen *tnaAB* implicado en la degradación del triptófano producido; aumentar el gen implicado en la biosíntesis de triptófano, es decir, mutar el gen *aroG* que codifica la enzima para la síntesis de 3-desoxiarabinosa-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) en el cromosoma y el *trpE* implicado en la biosíntesis de triptófano para liberar la retroinhibición; y confirmar la producción de L-triptófano a partir de la cepa recombinante de *E. coli* anteriormente obtenida en el medio de fermentación que contiene glucosa por fermentación directa.

25 La etapa de liberación de la auxotrofia para triptófano incluye el método de restablecimiento del gen del operón de triptófano en el cromosoma de una cepa productora de L-fenilalanina que tiene auxotrofia para triptófano a la forma de una cepa de tipo silvestre. El gen del operón de triptófano comprende la forma de *trpEDCBA* y está compuesto de genes requeridos para la conversión de corismato en triptófano, sugiriendo que es necesario para la cepa productora de triptófano. Entonces, el gen del operón de triptófano se seleccionó como un gen objetivo a restablecer.

30 La etapa de bloqueo de la biosíntesis de L-fenilalanina en esta invención incluye el método de inactivación de los genes implicados en la biosíntesis de L-fenilalanina. En el presente documento, "inactivación" indica la delección de los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* activos intracelulares o mutación de los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* para reducir los niveles de las proteínas codificadas por esos genes.

35 El gene *pheA* (gen ID de NCBI: 16130520) (SEQ. ID. NO: 33) es el gen que codifica la proteína necesaria para la biosíntesis de L-fenilalanina en *E. coli* y compite con la ruta de biosíntesis de triptófano en corismato. Por lo tanto, se seleccionó como un gen objetivo a inactivar para la producción de una cepa productora de triptófano.

40 El gen *trpR* (gen ID de NCBI: 16132210) (SEQ. ID. NO: 34) es el gen que codifica la proteína TrpR necesaria para la regulación de la biosíntesis del operón de triptófano (*trpEDCBA*) en *E. coli*, que se une a triptófano endógeno para funcionar como represor mediante la unión al promotor del operón de triptófano. Entonces, la inactivación de esta proteína da como resultado la sobreexpresión de ARNm de operón de triptófano, indicando el incremento de la concentración de triptófano. Por lo tanto, se seleccionó como gen objetivo a inactivar.

45 El gen *mtr* (gen ID de NCBI: 16131053) (SEQ. ID. NO: 35) es el gen que codifica la proteína necesaria para el influjo de triptófano desde el exterior de las células. Entonces, este gen se debería someter a delección de la cepa productora de triptófano, lo cual convierte al gen en objetivo a inactivar.

50 El gen *tnaAB* (gen ID de NCBI: 90111643, 16131577) (SEQ. ID. NO: 36 y NO: 37) está compuesto de *tnaA* que codifica la proteína necesaria para la degradación de triptófano intracelular y *tnaB* que codifica la proteína implicada en el influjo de triptófano extracelular. Se cree que este gen no es necesario para el cultivo productor de L-triptófano. Entonces, se seleccionó como gen objetivo a inactivar.

55 El microorganismo de la presente invención se prepara inactivando los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* que existen en el cromosoma de un microorganismo que tiene productividad de L-triptófano. Para inactivar esos genes, se induce mutación usando un rayo tal como UV o un producto químico. Y a partir de los mutantes, se selecciona una cepa que tenga genes inactivados codificadores de *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB*. La inactivación se puede realizar mediante técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, la inactivación se puede alcanzar insertando la secuencia de nucleótidos o el vector que contiene la secuencia de nucleótidos que tiene homología con los genes codificadores de *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* en un microorganismo objetivo para inducir recombinación homóloga. La secuencia de nucleótidos o el vector anterior puede incluir un marcador de selección dominante.

65 En esta invención, los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* o sus fragmentos de ADN contienen secuencia de polinucleótidos que tiene homología de secuencia con los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* del hospedador, pero estas secuencias de polinucleótidos tienen tal mutación como truncamiento, delección, sustitución, inserción e inversión para ser incapaces de expresar las proteínas codificadas por los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB*. La inserción de los

genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* inactivados o sus fragmentos de ADN en una célula hospedadora se puede alcanzar mediante transformación, conjugación, transducción o electroporación, pero no siempre limitado a los mismos.

5 Cuando los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* inactivados o sus fragmentos de ADN se introducen en una célula hospedadora por transformación, la inactivación se induce mezclando las secuencias de polinucleótidos con el cultivo de la cepa. A la vez, la cepa se puede transformar debido a que es naturalmente competente a la inserción del ADN, pero se prefiere hacer que la cepa sea competente para la inserción de ADN mediante el método apropiado de antemano (véase LeBlanc y col., *Plasmid* 28, 130-145, 1992; Pozzi y col., *J. Bacteriol.* 178, 6.087-6.090, 1996). A través de la recombinación homóloga, se inactiva la copia del cromosoma tipo silvestre de la  
10 secuencia mediante delección de una parte de los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* del ADN genómico o inserción de un fragmento de ADN extraño.

15 La etapa de aumentar el gen implicado en la biosíntesis de triptófano de la presente invención incluye el método de la mutación del gen implicado en la biosíntesis de triptófano. En el presente documento, "mutación" indica que la actividad de las proteínas que codifican los genes *aroG* y *trpE* está modificada para liberar la retroinhibición.

20 El *aroG* (gen ID de NCBI: 16128722) (SEQ. ID. NO: 38) es el gen que codifica la proteína necesaria para la síntesis de 7P-2-deshidro-3-desoxi-D-arabinoheptosa que es el punto de inicio de la ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, L-fenilalanina, tirosina). Se consideró que este gen necesariamente se muta para incrementar la productividad de triptófano.

25 El *trpE* (gen ID de NCBI: 16129225) (SEQ. ID. NO: 39) es el gen que codifica la proteína implicada en la síntesis de antranilato. Entre los genes que constituyen el operón de triptófano, el gen se inhibe por triptófano. Entonces, se consideró que este gen necesariamente se mutaba para prevenir la inhibición.

30 La presente invención también proporciona un método para producir el L-triptófano a alta concentración con alto rendimiento mediante el cultivo de la cepa recombinante de *E. coli* anteriormente preparada en el medio de fermentación que contenía glucosa por fermentación directa.

30 Mejor modo para llevar a cabo la invención

Las realizaciones prácticas y actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes Ejemplos.

35 Sin embargo, se apreciará que los expertos en la técnica, en consideración de esta divulgación, pueden hacer modificaciones y mejoramientos dentro del espíritu y el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Construcción de una cepa que ha perdido la propiedad de auxotrofia para triptófano

40 En este ejemplo, se restableció al tipo silvestre el gen del operón de triptófano que existe en el cromosoma de la cepa auxótrofa para triptófano que produce L-fenilalanina.

45 Para hacerlo, se usó el lisado celular de la *E. coli* de tipo silvestre infectada con fago P1. Precisamente, se inoculó un asa de platino de *E. coli* en medio líquido LB (Lurina-Bertani, referido más adelante como LB; 10 g/l de bacto triptona, 5 g/l de extracto de levadura bacto, 10 g/l de cloruro de sodio), seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. Se recuperaron las células cultivadas y se volvieron a poner en suspensión en medio líquido LB-GMC (glucosa al 0,2 %, sulfato de magnesio 1mM (MgSO<sub>4</sub>), cloruro de calcio 0,05 mM (CaCl<sub>2</sub>)), seguido de infección con 2  $\mu$ l de fago P1. Después de cultivar a 37 °C durante 30 minutos, el producto de cultivo se lavó dos veces con citrato de Na 0,1 M para eliminar el fago P1 restante. Las células se volvieron a poner en suspensión en 0,1 ml de citrato de Na, que se extendieron sobre el medio mínimo sólido M9 complementado con 20 mg/l de tirosina. Se confirmó que la colonia  
50 obtenida era capaz de crecer en un medio libre de triptófano, sugiriendo que las cepas han perdido la propiedad de auxotrofia para triptófano. La cepa construida se denominó "CJ001 (Trp<sup>+</sup>)".

Ejemplo 2: Construcción de una cepa recombinante productora de L-triptófano con gen *pheA* inactivado

55 En este ejemplo, se inactivó el gen *pheA* de *E. coli* mediante recombinación homóloga.

60 Para inactivar el gen *pheA*, se usó inactivación en una etapa, que es un método que usa recombinasa Red de lambda desarrollada por Datsenko KA y col. ("One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products", Datsenko KA, Wanner BL., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 6 de junio de 2000; 97(12):6.640-5). Para confirmar la inserción en el gen, se usó el gen resistente a cloranfenicol de pKD3 como marcador. Se realizó la reacción en cadena de la Polimerasa (referida, más adelante, como PCR) usando pKD3 como plantilla con el cebador 1 y el cebador 2 mostrados en la Tabla 1 que comprenden una parte del gen *pheA* y una parte de la secuencia del gen resistente a cloranfenicol de pKD3, dando como resultado la amplificación de un fragmento de  
65 gen de aproximadamente 1.100 pb [Sambrook y col., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual" (1989), Cold Spring Harbor Laboratories]. La solución de reacción usada en este ejemplo era el kit de premezcla de PCR HL (BIONEER,

Corea). Y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 1 minuto (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

5

Tabla 1

Cebador 1	5'- aggcaacactatgacatcgtgtaggctggagctgcttc -3' (SEQ. ID. NO: 1)
Cebador 2	5'- ggtcgccattaacaacgtggcatatgaatatcctccttag -3' (SEQ. ID. NO: 2)

10

Para obtener el fragmento de ADN 5' del gen *pheA* de *E. coli*, la PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli* tipo silvestre W3110 como plantilla con los cebadores 3 y 4 mostrados en la tabla 2, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 250 pb. La solución de reacción usada en el presente documento era el kit de premezcla de PCR HL y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 20 segundos (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 2

Cebador 3	5'- tattgagtgtatcgccaac -3' (SEQ. ID. NO: 3)
Cebador 4	5'- cgatgtcatagtgttggcc -3' (SEQ. ID. NO: 4)

15

Para obtener el fragmento de ADN 3' del gen *pheA* de *E. coli*, la PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli* tipo silvestre W3110 como plantilla con los cebadores 5 y 6 mostrados en la tabla 3, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 250 pb. La solución de reacción usada en el presente documento era el kit de premezcla de PCR HL y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 20 segundos (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

20

Tabla 3

Cebador 5	5'- ccacgttgtaatggcgacc -3' (SEQ. ID. NO: 5)
Cebador 6	5'- ttcattgaacgggtgatttc -3' (SEQ. ID. NO: 6)

25

En el presente documento, 18 pares de las secuencias de nucleótidos del cebador 1 y el cebador 4 eran complementarios, y 20 pares de las secuencias de nucleótidos del cebador 2 y el cebador 5 eran complementarios. Por tanto, el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 1 y 2, el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 3 y 4 y el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 5 y 6 podrían estar ligados como un fragmento. Los productos de PCR se amplificaron mediante cinco ciclos de PCR sin cebadores. El cebador 3 y el cebador 6 se añadieron a los mismos, seguido de 25 ciclos de PCR. Como resultado, se amplificó un fragmento de gen de aproximadamente 1.600 pb.

30

Se preparó la *E. coli* CJ001 transformada con pKD46 por el método de Datsenko KA y col. como una cepa competente, seguido de inducción del fragmento de gen de 1.600 pb de tamaño obtenido por PCR, las cepas se extendieron sobre el medio sólido LB complementado con 30 mg/ml de cloranfenicol. Se confirmó que la cepa obtenida tenía *pheA* inactivado por el fragmento de gen de 1.600 pb de tamaño obtenido por PCR usando el cebador 3 y el cebador 6. La cepa recombinante resultante se denominó "CJ100 (Trp<sup>+</sup>Δ*pheA*)".

35

### Ejemplo 3: Construcción de un microorganismo recombinante productor de L-triptófano con gen *trpR* inactivado

40

En este ejemplo, se inactivó el gen *trpR* de *E. coli* mediante recombinación homóloga.

La PCR se realizó usando pKD3 como plantilla con el cebador 7 y el cebador 8 mostrados en la Tabla 4 que comprenden una parte del gen *trpR* y una parte de la secuencia del gen resistente a cloranfenicol de pKD3, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 1.100 pb. La solución de reacción usada en este ejemplo era el kit de premezcla de PCR HL. Y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 1 minuto (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

50

Tabla 4

Cebador 7	5'- tccgcacggttatgatatgctatcgtactcttagcgagtacaaccgggggtgtaggctggagct gcttc-3' (SEQ. ID. NO: 7)
Cebador 8	5'- gccacgcttaicaggcctacaataatcgcctttcagcaacacctctcatatgaatatcctc cttag-3' (SEQ. ID. NO: 8)

5 Para obtener el fragmento de ADN 5' del gen *trpR* de *E. coli*, la PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli* tipo silvestre W3110 como platilla con los cebadores 9 y 10 mostrados en la Tabla 5, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 250 pb. La solución de reacción usada en el presente documento era el kit de premezcla de PCR HL y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 20 segundos (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 5

Cebador 9	5'- gcgccgggcggtatcgacgca -3' (SEQ. ID. NO: 9)
Cebador 10	5'- gcatatcataaacgtgcgga -3' (SEQ. ID. NO: 10)

10 Para obtener el fragmento de ADN 3' del gen *trpR* de *E. coli*, la PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli* tipo silvestre W3110 como platilla con los cebadores 11 y 12 mostrados en la Tabla 6, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 250 pb. La solución de reacción usada en el presente documento era el kit de premezcla de PCR HL y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 20 segundos (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 6

Cebador 11	5'- ttaggcctgataagacgtg -3' (SEQ. ID. NO: 11)
Cebador 12	5'-aagggcgatcggcggttt-3' (SEQ. ID. NO: 12)

20 En el presente documento, 20 pares de las secuencias de nucleótidos del cebador 7 y el cebador 10 eran complementarios, y 20 pares de las secuencias de nucleótidos del cebador 8 y el cebador 11 eran complementarios. Por tanto, el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 7 y 8, el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 9 y 10 y el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 11 y 12 podrían estar ligados como un fragmento. Los productos de PCR se amplificaron por cinco ciclos de PCR sin cebadores. El cebador 9 y el cebador 25 12 se añadieron a los mismos, seguido de 25 ciclos de PCR. Como resultado, se amplificó un fragmento de gen de aproximadamente 1.600 pb.

30 Se generó *E. coli* CJ100 transformada con pKD46 por el método de Datsenko KA y col. como cepa competente, seguido de inducción usando el fragmento de gen de 1.600 pb de tamaño obtenido por PCR. Las cepas se extendieron sobre el medio sólido LB que contenía cloranfenicol.

35 Se confirmó que la cepa obtenida tenía *trpR* inactivado por el fragmento de gen de 1.600 pb de tamaño obtenido por PCR usando el cebador 9 y el cebador 12. La cepa recombinante resultante se denominó "CJ200 (Trp<sup>+</sup> Δ*pheA*Δ*trpR*)".

Ejemplo 4: Construcción de una cepa recombinante productora de L-triptófano con gen *mtr* inactivado

En este ejemplo, se inactivó el gen *mtr* de *E. coli* mediante recombinación homóloga.

40 La PCR se realizó usando pKD3 como plantilla con el cebador 13 y el cebador 14 mostrados en la Tabla 7 que comprenden una parte del gen *mtr* y una parte de la secuencia del gen resistente a cloranfenicol de pKD3, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 1.100 pb. La solución de reacción usada en este ejemplo era el kit de premezcla de PCR HL. Y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 1 minuto (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 7

Cebador 13	5'- atggcaacactaaccaccacccaacgtaaccgtcgctgctggcggcggtgtgtaggctg gagctgcttc -3' (SEQ. ID. NO: 13)
Cebador 14	5'- ttactgatacaccggcagtaaattaaagctcgataaaatgaccaggigcatatgaatata ctccttag -3' (SEQ. ID. NO: 14)

50 Para obtener el fragmento de ADN 5' del gen *mtr* de *E. coli*, la PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli* tipo silvestre W3110 como platilla con los cebadores 15 y 16 mostrados en la Tabla 8, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 500 pb. La solución de reacción usada en el presente documento era el kit de premezcla de PCR HL y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 30 segundos (30 ciclos). El

## ES 2 606 705 T3

producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 8

Cebador 15	5'- gcagccgttacattggtaac -3' (SEQ. ID. NO: 15)
Cebador 16	5'- gtggtggttagtggtccat -3' (SEQ. ID. NO: 16)

5 Para obtener el fragmento de ADN 3' del gen *mtr* de *E. coli*, la PCR se realizó usando el cromosoma de *E. coli* tipo silvestre W3110 como platilla con los cebadores 17 y 18 mostrados en la Tabla 9, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 500 pb. La solución de reacción usada en el presente documento era el kit de premezcla de PCR HL y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 30 segundos (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 9

Cebador 17	5'- tactgccggtgtatcagtaa -3' (SEQ. ID. NO: 17)
Cebador 18	5'- tcaaaccgtcagcagcgctg -3' (SEQ. ID. NO: 18)

15 En el presente documento, 20 pares de las secuencias de nucleótidos del cebador 13 y el cebador 16 eran complementarios, y 20 pares de las secuencias de nucleótidos del cebador 14 y el cebador 17 eran complementarios. Por tanto, el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 13 y 14, el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 15 y 16 y el fragmento obtenido por PCR usando los cebadores 17 y 18 podrían estar ligados como un fragmento. Los productos de PCR se amplificaron mediante cinco ciclos de PCR sin cebadores. El cebador 15 y el cebador 18 se añadieron a los mismos, seguido de 25 ciclos de PCR. Como resultado, se amplificó un fragmento de gen de aproximadamente 2.100 pb.

20 Se preparó *E. coli* CJ200 transformada con pKD46 por el método de Datsenko KA y col. como cepa competente, seguido de inducción usando el fragmento de gen de 2.100 pb de tamaño obtenido por PCR. Las cepas se extendieron sobre el medio sólido LB que contenía cloranfenicol.

25 Se confirmó que la cepa obtenida tenía *mtr* inactivado por el fragmento de gen de 2.100 pb de tamaño obtenido por PCR usando el cebador 15 y el cebador 18. La cepa recombinante resultante se denominó "CJ300 (Trp<sup>+</sup> Δ*pheA*Δ*trpR*Δ*mtr*)".

### 30 Ejemplo 5: Construcción de una cepa recombinante productora de L-triptófano con gen *tnaAB* inactivado

En este ejemplo, se inactivó el gen *tnaAB* de *E. coli* mediante recombinación homóloga.

35 La PCR se realizó usando pKD3 como plantilla con el cebador 19 y el cebador 20 que comprenden una parte del gen *tnaAB* y una parte de la secuencia del gen resistente a cloranfenicol de pKD3 mostrados en la Tabla 10, dando como resultado la amplificación de un fragmento de gen de aproximadamente 1.100 pb. La solución de reacción usada en este ejemplo era el kit de premezcla de PCR HL. Y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 1 minuto (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 10

Cebador 19	5'- atgaaggattatgtaatggaactttaaacatctccctgaaccggtccggtgtaggctg gagctgcttc-3' (SEQ. ID. NO: 19)
Cebador 20	5'- ttagccaaatttaggtaacacggttaagacgttgccgaaccagcacaacacatgaa tctcctctag -3' (SEQ. ID. NO: 20)

45 Se preparó *E. coli* CJ300 transformada con pKD46 por el método de Datsenko KA y col. como cepa competente, seguido de inducción usando el fragmento de gen de 1.100 pb de tamaño obtenido por PCR. Las cepas se extendieron sobre medio sólido LB que contenía cloranfenicol. Se confirmó que la cepa tenía *tnaAB* inactivado por el fragmento de gen de 1.900 pb de tamaño obtenido por PCR usando el cebador 21 y el cebador 22. La cepa recombinante resultante se denominó "CJ400 (Trp<sup>+</sup> Δ*pheA*Δ*trpR*Δ*mtr*Δ*tnaAB*)".

Tabla 11

Cebador 21	5'- ttaagcgaatcaccggggaa -3' (SEQ. ID. NO: 21)
Cebador 22	5'- atgctccgagcactggcgc -3' (SEQ. ID. NO: 22)

50

Ejemplo 6: Construcción del vector pSKH que induce mutación génica específica

En este ejemplo, se construyó el vector que es capaz de inducir mutación génica específica en el cromosoma de *E. coli*.

5 Para hacerlo, se insertó el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* en el vector pKCG119 usado en la Publicación de Patente Coreana Nº 10-2006-0079297. Para seleccionar las cepas mutadas sin la inserción de un gen extraño, se usó el gen *sacB*.

10 El gen *sacB* (1,9 kb) se amplificó por PCR usando el cromosoma de *Bacillus subtilis* de tipo silvestre (Marburg 168) como plantilla con los cebadores 23 y 24 ("Molecular organization of intrinsic restriction and modification genes BsuM of *Bacillus subtilis* Marburg", Ohshima H., Matsuoka S., Asai K., Sadaie Y. *J Bacteriol.* enero de 2002; 184(2):381-9). La solución de reacción usada en este ejemplo era el kit de premezcla de PCR HL. Y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C  
15 durante 2 minutos (30 ciclos).

Tabla 12

Cebador 23	5'- tgctctagagatccttttaacctacacatat -3' (SEQ. ID. NO: 23)
Cebador 24	5'- cgcgatcctcgtgatggcagggtggcgctgcg -3' (SEQ. ID. NO: 24)

20 El producto de PCR se digirió con XbaI y BamHI, que se pasó al gel de agarosa al 0,8 %. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de 1,9 kb de tamaño. El fragmento obtenido se sometió a ligación con el vector pKCG119 digerido con XbaI y BamH (ligation kit NEB). *E. coli* Top 10 se transformó con la mezcla de ligación. Las células transformadas se extendieron sobre medio sólido LB que contenía kanamicina (50 mg/l) y se cultivaron a 37 °C durante la noche.

25 La colonia se obtuvo mediante palillo, el cual se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contenía kanamicina y se cultivó durante la noche. El ADN de plásmido se recuperó usando el kit de minipreparación de plásmido. La secuencia de nucleótidos del *sacB* insertado se identificó mediante secuenciación de ADN. El vector construido se denominó "pSKH".

30 Ejemplo 7: Construcción de una cepa recombinante productora de L-triptófano con gen *aroG* mutado

En este ejemplo, se mutó el gen *aroG* de *E. coli*.

35 El ADN cromosómico se extrajo de una cepa productora de triptófano usando el sistema Genomic-tip (QIAGEN). La PCR se realizó usando el ADN cromosómico como plantilla con los cebadores 25 y 26 mostrados en la Tabla 13, dando como resultado la amplificación de un fragmento de ADN de 660 pb que contenía ORF del gen *aroG*. La solución de reacción usada en este ejemplo era el kit de premezcla de PCR HL. Y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 30 segundos (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La  
40 banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 13

Cebador 25	5'- cgcgatcgcgaaaagcgatccataagatat -3' (SEQ. ID. NO: 25)
Cebador 26	5'- cgcgctcgactgctggcaggcctgcttgg -3' (SEQ. ID. NO: 26)

45 El fragmento del gen *aroG* obtenido por la anterior PCR se sometió a ligación con el vector pCR2.1-TOPO usando el kit TA cloning (Invitrogen). *E. coli* Top 10 se transformó con la mezcla de ligación. Las células transformadas se extendieron sobre medio sólido LB que contenía ampicilina (100 mg/l) y se cultivaron a 37 °C durante la noche. El vector construido se denominó "TOPO2.1-*aroG*".

50 La colonia se obtuvo mediante palillo, el cual se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contenía ampicilina y se cultivó durante la noche. Se recuperó el ADN de plásmido usando el kit de minipreparación de plásmido (QIAGEN) y se midió el tamaño de TOPO2.1-*aroG*. Para generar la forma mutante del gen *aroG*, se realizó mutación dirigida a sitio (Kit de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange, STRANTAGENE) usando el vector TOPO2.1-*aroG* como  
55 plantilla con los cebadores 27 y 28 mostrados en la Tabla 14. Las condiciones de reacción eran como sigue; desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 1 minuto, y elongación a 68 °C durante 6 min y 30 segundos (18 ciclos). Las células de *E. coli* Top10 se transformaron con 12 µl de cada solución de reacción, las cuales se extendieron sobre el medio sólido LB que contenía ampicilina, seguido de cultivar a 37 °C durante la noche. El vector construido se denominó "TOPO2.1-*maroG*".

Tabla 14

Cebador 27	5'-cgatatgatcaccctacaatatctcgctga -3' (SEQ. ID. NO: 27)
Cebador 28	5'-tcagcgagatattgtagggtgatcatatcg-3' (SEQ. ID. NO: 28)

La colonia se obtuvo mediante palillo, el cual se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contenía ampicilina y se cultivó durante la noche. Se recuperó el ADN de plásmido usando el kit de minipreparación de plásmido. Se identificó la secuencia de nucleótidos del gen *aroG* mutado mediante secuenciación de ADN. Se digirió TOPO2.1-*maroG* que contenía el gen *aroG* mutado con BamHI y Sall, que se pasó al gel de agarosa al 0,8 %. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de 660 pb de tamaño. El fragmento obtenido se sometió a ligación con el vector pSKH digerido con BamHI y Sall. Las células de *E. coli* Top 10 se transformaron con la mezcla de ligación. Las células transformadas se extendieron sobre medio sólido LB que contenía kanamicina y se cultivaron a 37 °C durante la noche. El vector construido se denominó "pSKH-*maroG*".

La colonia se obtuvo mediante palillo, el cual se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contenía kanamicina y se cultivó durante la noche. Se recuperó el ADN de plásmido usando el kit de minipreparación de plásmido (QIAGEN) y se midió el tamaño de pSKH-*maroG*. Se eliminó el origen de replicación del plásmido digiriendo con NheI y, a continuación, se sometió a ligación. El fragmento de ADN se introdujo en CJ400 que se preparó como una célula competente. El CJ400 se extendió sobre medio sólido LB que contenía kanamicina a 37 °C durante la noche. La PCR se realizó usando la colonia generada con los cebadores 25 y 26, y como resultado se confirmó la banda de 4,4 kb. A partir del resultado, se confirmó que el vector pSKH que contenía el gen *aroG* mutado se introdujo con éxito en el ADN cromosómico. Para eliminar el vector excepto la parte del gen *aroG* mutado del ADN cromosómico, la cepa se cultivó en medio de LB+sacarosa al 10 % durante 16 horas, y se extendió sobre medio de placa LB. Las colonias generadas se cultivaron sobre el medio sólido que contenía kanamicina y sobre el medio sólido libre de kanamicina. Se seleccionaron las colonias que crecían sobre el medio libre de antibiótico, seguido de secuenciación de ADN. A continuación, finalmente se seleccionó la cepa mutante con la sustitución del 150° aminoácido del gen *aroG* con leucina. La cepa mutante se denominó "CJ500 (Trp<sup>+</sup>  $\Delta$ pheA $\Delta$ trpR $\Delta$ mtr $\Delta$ tnaAB *aroG*<sup>m</sup>)".

Ejemplo 8: Construcción de una cepa recombinante productora de L-triptófano con gen *trpE* mutado

En este ejemplo, se mutó el gen *trpE* de *E. coli*.

Se extrajo ADN cromosómico de una cepa productora de triptófano usando el sistema Genomic-tip (QIAGEN). La PCR se realizó usando el ADN cromosómico como plantilla con los cebadores 29 y 30 mostrados en la Tabla 15, dando como resultado la amplificación de un fragmento de ADN de 600 pb que contenía una parte del ORF del gen *trpE*. La solución de reacción usada en este ejemplo era el kit de premezcla de PCR HL. Y la PCR se realizó como sigue; desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 30 segundos (30 ciclos). El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %. La banda objetivo se obtuvo por elución.

Tabla 15

Cebador 29	5'- cgcgatccaccgtggaaatttccacgccg -3' (SEQ. ID. NO: 29)
Cebador 30	5'- cgcgctcgacttccgctgacagttgcggtg -3' (SEQ. ID. NO: 30)

El fragmento del gen *trpE* obtenido por la anterior PCR se sometió a ligación con el vector pCR2.1-TOPO usando el kit TA Cloning (Invitrogen). *E. coli* Top 10 se transformó con la mezcla de ligación. Las células transformadas se extendieron sobre medio sólido LB que contenía ampicilina y se cultivaron a 37 °C durante la noche. El vector construido se denominó "TOPO2.1-*trpE*".

La colonia se obtuvo mediante palillo, el cual se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contenía ampicilina y se cultivó durante la noche. Se recuperó el ADN de plásmido usando el kit de minipreparación de plásmido (QIAGEN) y se midió el tamaño de TOPO2.1-*trpE*. Para generar la forma mutante del gen *trpE*, se realizó mutación dirigida a sitio usando el vector TOPO2.1-*trpE* como platilla con los cebadores 31 y 32 mostrados en la Tabla 16. Las condiciones de reacción eran las siguientes; desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, anillamiento a 55 °C durante 1 minuto, y elongación a 68 °C durante 6 minutos y 30 segundos (18 ciclos). Las células de *E. coli* Top10 se transformaron con 12 µl para cada solución de reacción, las cuales se extendieron sobre medio sólido LB que contenía ampicilina, seguido de cultivo a 37 °C durante la noche. El vector construido se denominó "TOPO2.1-*mtrpE*".

Tabla 16

Cebador 31	5'-gcttatcgcgacaatgccaccgcgctttttcac-3' (SEQ. ID. NO: 31)
Cebador 32	5'- gtgaaaaagcgcggtggcattgctcgcgataagc-3' (SEQ. ID. NO: 32)

La colonia se obtuvo mediante palillo, la cual se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contenía ampicilina y se cultivó durante la noche. Se recuperó el ADN de plásmido usando el kit de minipreparación de plásmido Se identificó la secuencia de nucleótidos de *trpE* mutado mediante secuenciación de ADN. Se digirió el plásmido TOPO2.1-*mtrpE* que contenía el gen *trpE* mutado con BamHI y Sall, que se pasó al gel de agarosa al 0,8 %. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de 660 pb de tamaño. El fragmento obtenido se sometió a ligación con el vector pSKH digerido con BamHI y Sall. Las células de *E. coli* Top 10 se transformaron con la mezcla de ligación. Las células

transformadas se extendieron sobre medio sólido LB que contenía kanamicina y se cultivaron a 37 °C durante la noche. El vector construido se denominó "pSKH-*mtrpE*".

5 La colonia se obtuvo mediante palillo, el cual se inoculó en 3 ml de medio líquido LB que contenía kanamicina y se cultivó durante la noche. Se recuperó el ADN de plásmido usando el kit de minipreparación de plásmido (QIAGEN) y se midió el tamaño de pSKH-*mtrpE*. Se eliminó el origen de replicación del plásmido digiriendo con NheI y, a continuación, se sometió a ligación. El fragmento de ADN se introdujo en CJ500, que se extendió sobre medio sólido LB que contenía kanamicina a 37 °C durante la noche. La PCR se realizó usando la colonia generada con los cebadores 29 y 30 y, como resultado, se confirmó la banda de 4,4 kb. A partir del resultado, se confirmó que el vector pSKH que contenía el gen *trpE* mutado se introdujo con éxito en el ADN cromosómico. Para eliminar el vector excepto la parte del gen *trpE* mutado a partir del ADN cromosómico, la cepa se cultivó en medio de LB+sacarosa al 10 % durante 16 horas, seguido de distribución sobre medio de placa LB. Las colonias generadas se cultivaron sobre el medio sólido que contenía kanamicina y sobre el medio sólido libre de kanamicina. Se seleccionaron las colonias que crecían sobre el medio libre de antibiótico, seguido de secuenciación de ADN. A continuación, finalmente se seleccionó la cepa mutante con la sustitución del 21º aminoácido del gen *trpE* con alanina. La cepa mutante se denominó "CJ600 (*Trp*<sup>+</sup>  $\Delta$ *pheA* $\Delta$ *trpR* $\Delta$ *mtr* $\Delta$ *tnaAB* *aroG*<sup>m</sup>*trpE*<sup>m</sup>)", y se depositó en KCCM (*Korean Culture Center of Microorganisms*; Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano) de KFCC (*Korean Federation of Culture Collection*; Federación Coreana de Colección de Cultivo), la Autoridad Internacional de Depósito (*International Depository Authority*) localizada en 361-221, Hongje-1-Dong, Seodaemungu-Gu, Seúl, Corea, el 8 de diciembre de 2006 (Número de acceso: KCCM 10812P).

#### Ejemplo 9: Comparación de la productividad de triptófano del microorganismo construido por recombinación genética

25 En este ejemplo, las colonias de las cepas recombinantes construidas en el Ejemplo 1 al Ejemplo 6, CJ001, CJ100, CJ200, CJ300, CJ400, CJ500 y CJ600 (KCCM 10812P) se extendieron sobre medio sólido LB por un asa de platino cada una, y se cultivaron durante la noche. Las cepas que crecieron se inocularon en medio de titulación en matraz que tenía la composición mostrada en la Tabla 17 mediante un asa de platino cada una. Después de la inoculación, las cepas se cultivaron a 37 °C, 200 rpm durante 48 horas. Se compararon los niveles de triptófano y L-fenilalanina obtenidos a partir del cultivo anterior y los niveles de triptófano y L-fenilalanina obtenidos a partir del cultivo de la *E. coli* mutante KFCC 10066 productora de L-fenilalanina. La densidad óptica (DO) y los niveles de L-triptófano y L-fenilalanina se representaron por el valor medio obtenido a partir de tres matraces.

Tabla 17

Composición	Concentración (g/l)
glucosa	60
extracto de levadura	2,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20
MgSO <sub>4</sub>	1
Citrato de Na	5
NaCl	1
L-tirosina	0,1
L-fenilalanina	0,15
CaCO <sub>3</sub>	40
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2

35 Como resultado, como se muestra en la Tabla 18, no se produjo L-triptófano en el mutante de *E. coli* KFCC 10066 productor de L-fenilalanina, mientras que se produjo 6,5 g/l de L-triptófano en *E. coli* CJ600 (KCCM 10812P) desarrollada en la presente invención

Tabla 18

Nombre cepa	OD Celular (562 nm)	L-triptófano (g/l)	L-fenilalanina (g/l)
KFCC 10066	15,2	0,0	9,1
CJ001	17,6	0,0	3,5
CJ100	16,1	0,1	0
CJ200	16,3	0,3	0
CJ300	16,8	0,3	0
CJ400	16,4	0,3	0
CJ500	16,3	0,4	0
CJ600	13,5	6,5	0

#### 40 Aplicabilidad industrial

Los presentes inventores desarrollaron la cepa recombinante de *E. coli* CJ600 productora de triptófano a alta concentración a partir de la *E. coli* productora de L-fenilalanina sin producir L-fenilalanina durante un rato liberando la auxotrofia del triptófano y la mutación o inactivación de genes. Particularmente, la cepa recombinante de *E. coli*

## ES 2 606 705 T3

CJ600 (KCCM 10812P) se preparó a partir de la *E. coli* mutante KFCC 10066 que tiene productividad de L-fenilalanina liberando la auxotrofia del triptófano, inactivando los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *trnAB* y mutando los genes *aroG* y *trpE* en el cromosoma. El L-triptófano se produjo a alta concentración cultivando la cepa recombinante anterior, indicando que la productividad de L-triptófano estaba incrementada.

5 <110> CJ Cor p.

<120> *Escherichia coli* recombinante modificada por ingeniería genética productora de L-triptófano que tiene originalmente productividad de L-fenilalanina, y método para producir L-triptófano usando el microorganismo

10 <130> PP07-0139

<160> 39

15 <170> Kopatent In 1.71

<210> 1  
<211> 38  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador 1

25 <400> 1  
aggcaacact atgacatcgt gtaggctgga gctgcttc 38

<210> 2  
<211> 40  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador 2

35 <400> 2  
ggt cgccatt aacaacgtgg catatgaata tcctccttag 40

<210> 3  
<211> 19  
40 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador 3

45 <400> 3  
tattgagtgt atcgccaac 19

50 <210> 4  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

55 <220>  
<223> Cebador 4

<400> 4  
60 cgatgtcata gtgttgcc 18

<210> 5  
<211> 20  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia Artificial

<220>

# ES 2 606 705 T3

	<223> Cebador 5	
5	<400> 5 ccacgtgtt aatggcgacc	20
10	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador 6	
15	<400> 6 tcattgaac ggggtattc	20
20	<210> 7 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador 7	
25	<400> 7 tcgcacgttatgatat gc tatcgctactc ttagcgcagt acaaccgggg gtgtaggctg gagctgcttc	60 70
30	<210> 8 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Cebador 8	
40	<400> 8 gccacgtt atcaggccta caaaatcaat cgctttcag caacacctct catatgaata tcctccttag	60 70
45	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador 9	
50	<400> 9 gcgccgggcg tatcgacgca	20
55	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador 10	
60	<400> 10 gcatatcata aacgtgcgga	20
65	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

# ES 2 606 705 T3

	<220>		
	<223> Cebador 11		
5	<400> 11		
	tgtaggcctg ataagacgtg		20
10	<210> 12		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 12		
15	<400> 12		
	aagggcgcat cggcgtgtt		20
20	<210> 13		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 13		
25	<400> 13		
	atggcaacac t aaccaccac ccaaacgtca ccgtcgtgc ttggcggcgt gtgtaggctg		60
	gagctgctc	70	
30	<210> 14		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador 14		
40	<400> 14		
	ttactgatac accggcagta aattaaagct cgataaaata tgcaccagtg catatgaata		60
	tctccttag	70	
45	<210> 15		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 15		
50	<400> 15		
	gcagccgta cattggaac		20
55	<210> 16		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador 16		
60	<400> 16		
	gtggtggtta gtgtgccaat		20
65	<210> 17		
	<211> 20		
	<212> ADN		

# ES 2 606 705 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador 17	
	<400> 17	
	tactgccggt gtatcagtaa	20
10	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador 18	
	<400> 18	
	tcaaaccgtc agcacggctg	20
20	<210> 19	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador 19	
	<400> 19	
30	atgaaggatt atgtaatgga aaacttaaa catctccctg aaccgttccg gtgtaggctg	60
	gagctgcttc	70
	<210> 20	
	<211> 70	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<400> 20	
40	t t agccaaat t t aggt aaca cgtaaagac gttgccgaac cagcacaaaa catatgaata	60
	tcctccttag	70
	<210> 21	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador 21	
	<400> 21	
	ttaagcgaaa tcaccggggaa	21
	<210> 22	
55	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador 22	
	<400> 22	
	atgtccgagc actggcgc	18
65	<210> 23	
	<211> 33	

# ES 2 606 705 T3

	<212> ADN <213> Secuencia Artificial	
5	<220> <223> Cebador 23	
	<400> 23 tgctctagag atcctttta acccatcacatat	33
10	<210> 24 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Cebador 24	
20	<400> 24 cgcgatcct cgtgatggca ggtggcgctgc	33
25	<210> 25 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Cebador 25	
35	<400> 25 cgcgatccg aaaagcgatc cataagatat	30
40	<210> 26 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Cebador 26	
50	<400> 26 cgcgctgact gctggcaggc ct gctttgt	30
55	<210> 27 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> Cebador 27	
65	<400> 27 cgatatgatc accct acaat atctcgctga	30
70	<210> 28 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
75	<220> <223> Cebador 28	
80	<400> 28 tcagcgagat attgtaggt gatcatatcg	30
85	<210> 29 <211> 30	

# ES 2 606 705 T3

	<212> ADN <213> Secuencia Artificial	
5	<220> <223> Cebador 29	
	<400> 29 cgcgatcca ccgtgaaat ttccacgccg	30
10	<210> 30 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Cebador 30	
	<400> 30 cgcgtcgact ttccgtgac agttgcgga	30
20	<210> 31 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Cebador 31	
	<400> 31 gct t at cgcg acaatgccac cgcgctttt cac	33
30	<210> 32 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Cebador 32	
	<400> 32 gtgaaaaagc gcggtggcat tgtcgcgata agc	33
40	<210> 33 <211> 1161 <212> ADN <213> <i>Escherichia coli</i>	
45	<400> 33	

ES 2 606 705 T3

at gacat cgg aaaaccogt t act ggcgct g cgagagaaaa t cagcgcgct ggat gaaaaa 60  
 t t at f agcgt t act ggcaga acggcgcgaa ct ggcgct cg aggt gggaaa agccaaact g 120  
 ct ct cgcac c gcccggt acg t gat at f gat cgt gaacgcg at t t gct gga aagat t aat t 180  
 acgct cggta aagegcacca t ct ggacgcc cattaacatta ct cgcctgt t ccagct cat c 240  
 at t gaagat t ccgt at t aac t cagcaggct t t gct ccaac aacat ct caa t aaaaat t aat 300  
 ccgcaact cag cacgcat cgc t t t t ct cggc cccaaaggt t ct t at t ccca t ct t gcgggc 360  
 cgccagt at g ct gcccgct ca ct t t gagcaa t t cal t gaaa gt ggc t ggc caaat t t gcc 420  
 gat at t t t t a at caggt gga aaccggccag gccgact at g ccgt cgt acc gat t gaaaat 480  
 accagct ccg gt gccat aaa cgacgt t t ac gat ct gct gc aacat accag ct t gt cgal t 540  
 gt t ggcgaga t gacgt t aac t at cgaccat t gt t t gt t gg t ct ccggcac t act gat t t a 600  
 t ccaccat ca at acggt ct a cagccat ccg cagccat t cc agcaat gcag caaat t cct t 660  
 aat cgt t at c cgcact ggaa gat t gaat at accgaaagt a cgt ct gcggc aat ggaaaag 720  
 gt t gcacagg caaaat cacc gcat gt t gct gcgt t gggaa gcgaagct gg cggcaact t t g 780  
 t acggt t t gc aggt act gga gcgt at t gaa gcaaat cagc gacaaaact t caccogt t t 840  
 gt ggt gt t gg cgcgt aaagc cat t aacgt g t ct gal cagg t t ccggcgaa aaccacgt t g 900  
 t t aal ggcga ccgggcaaca agccgg t gcg ct ggt t gaag cgt t gct ggt act ggcgaac 960  
 cacaat ct ga t t at gaccog t ct ggaat ca cgcccgat t c acggt aat cc at gggagag 1020  
 at gt t ct at c t ggal at t ca ggccaat ct t gaat cagcgg aat gcaaaa agcat t gaaa 1080  
 gagt t agggg aat caccog t t caat gaag gt at t gggct gt t acccaag t gagaacgt a 1140  
 gt gcct gt t g at ccaacct g a 1161

5 <210> 34  
 <211> 327  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

<400> 34

at ggcccaac aat caccct a t t cagcagcg at ggcagaac agcgt cacca ggagt ggt t a 60  
 cgt t t t gt cg acct gct t aa gaat gcct ac caaacgat c t ccat t t acc gt t gt t aaac 120  
 ct gat gct ga cgcagat ga ggcggaagcg t t ggggact c gcgt gcgt at t gt cgaagag 180  
 ct gt t ggcg gcgaaat gag ccagcgt gag t t aaaaaat g aact cggcgc aggcac cgcg 240  
 acgat t acgc gt ggal ct aa cagcct gaaa gccgcgcccg t cgagct gcg ccagt ggct g 300  
 gaagaggt gt t gct gaaaag cgat t ga 327

10 <210> 35  
 <211> 1245  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

<400> 35

ES 2 606 705 T3

at ggcaacac taaccaccac ccaaacgt ca ccgtcgctgc ttggcggcgt ggtgatfalc 60  
 ggcggcacca ttatlggcgc agggatgltt lctctgccag tggcatgtc cggggcgtgg 120  
 tttttctggt caatggcggc gctgatcttt acctggttct gtatgctgca ttcggcttg 180  
 atgattctgg aagctaacct gaattacaga atcggttcca gttttgacac catcaccaaa 240  
 gat ttgctgg gcaaaggctg gaacgtggtc aacggcatlt ccatlgcctt tgtgctctat 300  
 atcctgacct atgctat at ttctgccagt ggttcgatlc tgcacacac ctctgcagag 360  
 atgtcactaa acgtcccggc acgggcggcg ggttttgglt ttgcatlgct ggtagcgttt 420  
 gtggtgtgt tggagcaactaa agccctcagt cgcacgacag cgatgtgct gggggcgaaa 480  
 gtcattacct tcttctcac ctttggtagc ctgctggggc atgtgcagcc tgcgacatfg 540  
 tccaacgtcg ccgaaagcaa tgcctctat gcaccgtalc tgltgatgac cctgccgttc 600  
 tgtctggcat cgtttggtta tccggtaac gtgccaaagcc tgalgaagta ttaccgcaaaa 660  
 gatccgaaaa ccatcgtgaa atgtctggtg tacggtagc tgalggcgt ggcgctgtat 720  
 accatctggt tgcctggcgac gatgggtaac atcccgcgtc cggagtittat cggatitgca 780  
 gagaagggcg gtaalattga tgtgctggt a caggcgtlaa gcggcgtact gaacagccgt 840  
 agtctggatc tgcctgctggt cgtgttctca aactttgcgg tagcgagttc gttcctcggc 900  
 gtaacgctgg gtttgtttga ctatctggca gatctgtttg gtttcgacga ctcggtgtg 960  
 ggccgcttga aaacggcatt gctgaccttt gccccgccag ttgtgggggg gctgtgtttc 1020  
 ccgaacggat tctgtacgc catgggttat gctggtttag cggctaccat ctgggcggca 1080  
 atigtccgg cgtgttagc ccgtgcatcg cgtaacgct ttggcagccc gaaattccgc 1140  
 gctgggggtg gcaagccgat gatgctgctg atctggtgt ttggcgtcgg caacgcactg 1200  
  
 gtgcatattt tatcgagctt taatttactg ccggtgtalc agt'aa 1245

- <210> 36
- <211> 1416
- 5 <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
- <400> 36

ES 2 606 705 T3

at ggaaaact t taaacat ct ccoct gaaccg t tccgcat t c gt gt t at t ga gccagt aaaa 60  
 cgt accact c gcgct t at cg t gaagaggca at t at t aaat ccggt at gaa cccgt t cct g 120  
 ct ggat agcg aagat gt t t t at cgat t t a ct gaccgaca gcggcaccgg ggccgt gacg 180  
 cagagcat gc aggct gcgat gat gcgcggc gacgaagcct acagcggcag t cgt agct ac 240  
 t at gcgt t ag ccgagt cagt gaaaaat at c t t t gggt t at c aat acacat t ccgact cac 300  
 cagggccgt g gcgcagagca aat ct at at t ccggt act ga t t aaaaaacg cgagcaggaa 360  
 aaaggcct gg at cgcagcaa aat ggt ggcg t t ct ct aact at t t ct t t ga t accacgcag 420  
 ggccat agcc agat caacgg ct gt accgt g cgt aacgt ct at at caaaga agcct t cgat 480  
 acgggcgt gc gt t acgact t t aaaggcaac t t t gacct t g agggat t aga acgcggt at t 540  
 gaagaagt t g gt ccgaat aa cgt gccgt at at cgt t gcaa ccat caccag t aact ct gca 600  
 ggt ggt cagc cgggt t t cact ggcaaaact t a aaagcgat gt acagcat cgc gaagaaat ac 660  
 gat at t ccgg t ggt aat gga ct ccgcgcgc t t t gct gaaa acgcct at t t cat caagcag 720  
 cgt gaagcag aat acaaaga ct ggacat c gacgagat ca cccgcgaaac ct acaaat at 780  
 gccgat at gc t ggcgat gt c cgccaagaaa gat gcgat gg t gccgat ggg cggcct gct g 840  
 t gcat gaaag acgacagct t ct t t gat gt g t acaccgagt gcagaaccct t t gcgt ggt g 900  
 caggaaggct t cccgacat a t ggccggcct g gaaggcggcg cgat ggagcg t ct ggccgt a 960  
 ggt ct gt at g acggcat gaa t ct cgact gg ct ggct t at c gt at cgcgca ggt acagt at 1020  
 ct ggt cgat g gt ct ggaaga gat t ggct t gt ct gccagc aggcggggcg t caccgaggca 1080  
 t t cgt t gat g ccggt aaact gt t gccgcat at cccggcag accagt t ccc ggcacaggcg 1140  
 ct ggccct gcg agct gt at aa agt cgccggt at ccgt gcgg t agaaat t gg ct ct t t cct g 1200  
 t t aggcgcg at ccgaaaac cgggt aaacaa ct gccat gcc cgggt gaact gct gcgt t t a 1260  
 accat t ccgc gcgcaacat a t act caaaca cat at ggact t cat t at t ga agcct t t aaa 1320  
 cat gt gaaag agaacgcggc gaat at t aaa ggat t aacct t t acgt acga accgaaagt a 1380  
 t t gcgt cact t caccgcaaa act t aaagaa gt t t aa 1416

<210> 37  
 <211> 1248  
 <212> ADN  
 <213> *Escherichia coli*

5

<400> 37

at gact gat c aagct gaaaa aaagcact ct gcat t t t ggg gt gt t at ggt t at agcagg 60  
 acagt aat t g gt ggaggt at gt t t gct t t a cct gt t gat c t t gccggt gc ct ggt t t t c 120  
 t ggggt gcct t t at cct t at cat t gcct gg t t t t caat gc t t cat t ccgg gt t at t gt t a 180

10

ES 2 606 705 T3

tt agaagcaa attt aaatt a tcccgt cggc tccagtttta acaccatcac caaagattta 240  
 at cgggtaaca cctggaacat tatcagcggg attaccgttg ccttcggttct ctat atcctc 300  
 acttatgcct atatctctgc taatggggcg atcattagt gaaacgat atc aatgaatttg 360  
 ggttatcacg ct aatccacg tat tgtcggg atctgcacag ccat tttcgt t gcccagcgt a 420  
 ttgtggtt aa gttcgttagc cgccagtcgt attacctcat tgttcctcgg gctgaagatt 480  
 atctcctttg t gatcgtgtt tgggtctttt tcttccagg tgcattactc cat tctgcgc 540  
 gacgccacca gctccaactgc gggaaacgtct tacttcccgt atatctttat ggctttgccg 600  
 gtgtgtctgg cgtcatttgg tttccacggc aatattccca gctgat tat ttgctatgga 660  
 aaacgcaaag at aagttaat caaaagcgtg gtatttgggt cgctgctggc gctggtgat t 720  
 tatctcttct ggctctattg caccatgggg aatattccgc gagaaagctt taaggcgatt 780  
 atctcctcag gccgcaacgt t gat t cgtg gtgaaatcgt t cctcggcac caaacagcac 840  
 ggcat tatcg agttttgcct gctggtgttc tctaacttag ctgttgccag ttcgttcttt 900  
 ggtgtcacgc tggggttgtt cgattatctg gccggacctgt tt aagattga taactcccac 960  
 ggccggcgtt tcaaaaccgt gctgttaacc ttcctgccac ctgcgttgtt gtatctgatc 1020  
 tttcccgaacg gctttat tta cgggatcggc ggtgccgggc tgtgcgccac catctgggcg 1080  
 gtcattatc ccgcagtgct t gcaatcaaa gctcgcaaga agtttcccaa tcagatgttc 1140  
 acggtctggg gccgcaatct tatccggcg attgtcattc tctttgggat aaccgtgat t 1200  
 ttgtgctggt tccgcaacgt ct ttaacgtg ttacctaaat ttggctaa 1248

- 5 <210> 38
- <211> 1053
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
  
- 10 <220>
- <221> Mutación
- <222> (449)
- <223> 449 Nucleótido c -> t Mutación, P150L
  
- <400> 38

ES 2 606 705 T3

at gaat t at c agaacgacga t t t acgcat c aaagaaat ca aagagt t act t cct cct gt c 60  
 gcatt gct gg aaaaaa t ccc cgct act gaa aat gccgcga at acggt t gc ccat gcccca 120  
 aaagcgat cc at aagat cct gaaaggt aat gat gat cgcc t gt t ggt t gt gat t ggccca 180  
 t gct caat t c at gat cct gt cgcggcaaaa gagt at gcc a ct cgct t gct ggcgct gcgt 240  
 gaagagct ga aagat gagct ggaaat cgt a at gccgcgt ct at t t t gaaaa gccgcgt acc 300  
 acggt gggct ggaaaggct gat t aacgat ccgcat at gg at aat agct t ccagat caac 360  
 gacggt ct gc gt at agcccc t aaat t gct g ct t gat at t a acgacagcgg t ct gccagcg 420  
 gcaggt gagt t t ct cgat at gat caccct a caat at ct cg ct gacct gat gagct ggggc 480  
 gcaat t ggcg cacgt accac cgaat cgcag gt gcaccgcg aact ggcat c agggct t t ct 540  
 t gt ccggt cg gct t caaaaa t ggcaccgac ggt acgat t a aagt ggct at cgat gccat t 600  
  
 aat gccgcg gt gccgcgca ct gct t cct g t ccgt aacga aat gggggca t t cggcgat t 660  
 gt gaat acca gcggt aacgg cgat t gccat at cat t ct gc gccggcgg aa agagcct aac 720  
 t acagcgcga agcacgt t gc t gaagt gaaa gaagggct ga acaaagcagg cct gccagca 780  
 caggt gat ga t cgat t t cag ccat gct aac t cgl ccaaac aat t caaaaa gcagat ggat 840  
 gt t t gt gct g acgt t t gcc a gcagat t gcc ggt gccgaaa aggccat t at t ggcgt gat g 900  
 gt ggaaagcc at ct ggt gga aggcaat cag agcct cgaga gccggggagcc gct ggcct ac 960  
 ggt aagagca t caccgat gc ct gcat cggc t gggaagat a ccgat gct ct gt t acgt caa 1020  
 ct ggcgaat g cagt aaaagc gcgt cgcggg t aa 1053

- <210> 39
- <211> 1563
- <212> ADN
- <213> *Escherichia coli*
  
- <220>
- <221> Mutación
- <222> (61)
- <223> c - > t Mutación, P21S
  
- <400> 39

ES 2 606 705 T3

at gcaaacac aaaaaccgac t ct cgaact g ct aacct gcg aaggcgct t a t cgcgacaat	60
t ccaccgcgc t t t t t cacca gt t gt gt ggg gat cgt cgg caacgct gct gct ggaat cc	120
gcagat at cg acagcaaaga t gal t t aaaa agcct gct gc t ggt agacag t cgcct gcgc	180
at t acagct t t aggt gacac t gt cacaat c caggcaact t t ccggcaacgg cgaagccct c	240
ct ggcact ac t ggal aacgc cct gccct gcg ggt gt gaaa gt gaacaat c accaaact gc	300
cgt gt gct gc gct t ccccc t gt cagf cca ct gct ggal g aagacgcccg ct t at gct cc	360
ct t t cggf t t t t gacgct t t ccgt t t at t g cagaat ct gt t gaat gt acc gaaggaagaa	420
cgagaagcca t gt t ct t cgg cggcct gt t c t ct t at gacc t t gt ggcggg at t t gaagat	480
t t accgcaac t gt cagcgga aaat aact gc cct gal t t ct gt t t t at ct cgct gaaacg	540
ct gat ggt ga t t gaccat ca gaaaaaagc acccgt at t c aggcacgct gt t t gct ccg	600
aat gaagaag aaaaacaacg t ct cact gct cgcct gaacg aact acgt ca gcaact gacc	660
gaagccgcgc cgcgct gcc agt ggt t t cc gt gccgat a t gct t gt ga at gt aat cag	720
agcgal gaag agt t cggg gg cgt agt gcgt t t gt t gcaaa aagcgal t cg cgct ggagaa	780
at t t t ccagg t ggt gccat c t cgcgct t t c t ct ct gccct gccct cacc gct ggcggcc	840
t at t acgt gc t gaaaaagag t aat cccagc ccgt acat gt t t t t at gca ggat aat gat	900
t t caccct at t t ggcgct c gccgaaagc t cgt caagt at gat gccac cagccgccag	960
at t gagat ct acccgat t gc cggaacacgc ccacgcggt c gt cgcgccga t ggt t cact g	1020
gacagagat c t cgacagccg t at t gaact g gaaat gcgt a ccgat cat aa agagct gt ct	1080
gaacat ct ga t gct ggt t ga t ct cgcctgt aat gal ct gg cagcgal t t g ccccccggc	1140
agccgct acg t cgcgat ct caccaaagt t gaccgt t at t cct at gt gal gcacct cgt c	1200
t ct cgcgt ag t cggcgaact gcgt cagcat ct t gacgcc t gcacgct t a t cgcgcct gt	1260
at gaat at gg ggacgt t aag cggg cgcgcc aaagt acgcg ct at gcagt t aat t gccgag	1320
gcggaaggt c gt cgcgcgg cagct acggc ggcgcggt ag gt t at t t cac cgcgcat ggc	1380
gat ct cgaca cct gcat t gt gal ccgct cg gcgct ggt gg aaaacggt at cgcaccgt g	1440
caagcggg g ct ggt gt agt cct t gal t ct gt t cgcagt cggaagccga cgaaaccgt	1500
aacaaagccc gcgct gt act gcgcgct at t gccaccgcg at cat gcaca ggagact t t c	1560
t ga	1563

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una cepa recombinante de *E. coli* que tiene productividad de L-triptófano preparada a partir de la *E. coli* mutante KFCC 10066 que tiene productividad de L-fenilalanina, liberando la auxotrofia del triptófano en el cromosoma, inactivando los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* y mutando los genes *aroG* y *trpE* en el cromosoma para liberar su retroinhibición.
2. La cepa recombinante de *E. coli* de la reivindicación 1, en donde dicha cepa es CJ600 KCCM 10812P.
- 10 3. Un método para producir una cepa recombinante de *E. coli* que tiene productividad de L-triptófano a partir de la *E. coli* mutante KFCC 10066 que comprende las siguientes etapas:
  - 15 liberar la auxotrofia del triptófano en el cromosoma por manipulación génica en dicha *E. coli* mutante; bloquear la biosíntesis de L-fenilalanina inactivando los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB* en dicha *E. coli* mutante; y aumentar los genes implicados en la biosíntesis de L-triptófano mutando los genes *aroG* y *trpE* para liberar su retroinhibición en dicha *E. coli* mutante.
4. Un método para producir L-triptófano usando la *E. coli* recombinante de la reivindicación 1 o reivindicación 2.