

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 015**

51 Int. Cl.:

C12N 15/61 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.08.2008 E 08162381 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2036979**

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

30 Prioridad:

15.09.2007 DE 102007044134

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

04.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RIEPING, MECHTHILD, DR. y
KREUTZER, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 611 015 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-aminoácidos bajo empleo de cepas mejoradas de la familia Enterobacteriaceae

5 Esta invención se refiere a un procedimiento para la obtención fermentativa de los L-aminoácidos L-treonina y L-triptófano, bajo empleo de microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae, en los que el gen *tig*, que codifica para el factor desencadenante TF, se sobreexpone, y a estos microorganismos.

Estado de la técnica

10 L-aminoácidos, en especial L-treonina, L-triptófano, L-lisina, L-valina, L-isoleucina y L-homoserina, se aplican en la medicina humana y en la industria farmacéutica, en la industria de productos alimenticios y en la alimentación animal.

Es sabido que los L-aminoácidos se obtienen mediante fermentación de cepas de Enterobacteriaceae, en especial *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Serratia marcescens*.

15 En el documento EP1013765A se da a conocer un procedimiento para la obtención de los aminoácidos L-treonina y L-homoserina mediante fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en el que se sobreexpone los genes *rhtB* y *rhtC*.

En el documento EP1715055A se da a conocer un procedimiento para la obtención de los aminoácidos L-treonina y L-triptófano mediante fermentación de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en el que se sobreexpone al menos uno de los genes del metabolismo de glicerina.

20 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 nutrientes, 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 iónico, o las propiedades de rendimiento intrínsecas del propio microorganismo.

25 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.

30 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 auxótrofo, y L-aminoácidos, como por ejemplo L-treonina. Por ejemplo una cepa que produce L-triptófano está caracterizada por 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*, 2ª edición, ASM Press, Washington, D.C. USA, (1996). Un resumen sobre el metabolismo y la producción de L-treonina es publicada por Debabov (*Advances in Biochemical Engineering* vol. 79, 113-136 (2003)).

45 El producto génico del gen *tig*, el factor desencadenante (TF; proteína enlazante FK506 tipo (FKBP) peptidil-prolil cis-trans isomerasa), es una de las tres chaperonas más importantes (junto con DnaK y GroEL), que cooperan en el ámbito de la división celular en el plegado y la oligomerización de proteínas citosólicas recientemente sintetizadas (Gragerov et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(21):10341-4 (1992); Hartl y Hayer-Hartl, *Science* 295:1852-8 (2002)). TF actúa sobre una gran parte de los polipéptidos producidos, principalmente de cadena corta, en el ribosoma (Teter et al., *Cell* 97(6):755-65 (1999); Deuerling et al., *Nature* 400(6745):693-699 (1999); Tomic et al., *FEBS Letters* 580(1):72-76 (2006)), en el que se enlaza a las proteínas L23/L29 en la salida del polipéptido (Kramer et al., *Nature* 419(6903):171-4 (2002); Maier et al., *Current Opinion in Structural Biology* 15(2):204-12 (2005)), y en las mismas, a través de los dominios C-terminales, ejerce funciones de chaperona independientes de ATP (Merz et al., *Journal of Biological Chemistry* 281(42):31963-71 (2006); Scholz et al., *EMBO Journal* 16(1):54-8 (1997)), mientras que la actividad de cis/trans isomerasa, mediada

por los dominios centrales, no es esencial para el correcto plegado de polipéptidos (Kramer et al., Journal of Biological Chemistry 279 (14):14165-70 (2004)).

5 La secuencia de nucleótidos de la forma salvaje del gen que codifica para el factor de desencadenamiento TF de Escherichia coli se determinó por Guthrie y Wickner (Journal of Bacteriology, 172(10), 5555-5562 (1990)), y se encuentra disponible generalmente en el banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA) bajo los números de acceso (accession number) M34066 y U00096 (región: 454357-455655).

Tarea de la invención

10 Los inventores se han planteado la tarea de poner a disposición nuevas medidas para la obtención de cantidades elevadas de los L-aminoácidos L-treonina y L-triptófano.

Descripción de la invención

15 Son objeto de la invención microorganismos recombinantes que producen L-treonina o L-triptófano de la familia Enterobacteriaceae, que contienen un gen *tig* sobreexpresado, que codifica para el factor desencadenante TF, poseyendo ya las cepas madre empleadas para las medidas de la sobreexpresión del gen *tig* la capacidad de enriquecer al menos 0,25 g/l de L-treonina o L-triptófano en un máximo de 120 horas en la célula y/o en el medio nutriente, o bien el caldo de fermentación,

- a) obteniéndose los microorganismos mediante transformación, transducción, conjugación, o una combinación de estos métodos, con un vector que contiene el gen *tig*, un alelo de este gen, o partes del mismo, que presentan la actividad del factor desencadenante TF, y en caso dado un promotor; y/o
- 20 b) presentándose el número de copias del gen *tig* o de los alelos en los microorganismos aumentado en al menos 1, en comparación con los microorganismos no recombinantes para el gen *tig*; y/o
- c) mutando, para la consecución de la intensificación, la región de promotor y de regulación, o el punto de enlace de ribosomas, en línea de entrada del gen *tig*, o incorporándose cassettes de expresión o promotores en línea de entrada del gen *tig*.

25 A estos microorganismos pertenecen en especial microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, en los que se refuerza un polinucleótido que codifica para un polipéptido, cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos un 70 % o en al menos un 80 %, o al menos un 90 %, en especial en al menos un 95 %, preferentemente en al menos un 98 % o al menos un 99 %, de modo especialmente preferente en al menos un 99,6 %, y de modo muy especialmente preferente en un 100 %, a la secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 6, preferentemente SEQ ID No. 2, poseyendo el polipéptido la actividad del factor desencadenante TF.

30

Los citados microorganismos contienen polinucleótidos aislados, seleccionados a partir del grupo

- a) polinucleótido con una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5 y las secuencias de nucleótido complementarias a la misma;
- 35 b) polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que corresponde a SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5 en el ámbito de la degeneración del código genético;
- c) secuencia de polinucleótido con una secuencia que se hibrida con la secuencia complementaria a SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5 bajo condiciones restrictivas, alcanzándose las condiciones restrictivas preferentemente mediante un paso de lavado, en el que la temperatura se extiende a un intervalo de 64°C a 68°C y la concentración de sales del tampón a un intervalo de 2xSSC a 0,1xSSC;
- 40 d) polinucleótido con una secuencia SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5, que contiene mutantes de sentido de función neutra,

codificando los polinucleótidos para el factor desencadenante TF.

45 En este caso, como microorganismos que producen L-aminoácido ante la amplificación o la sobreexpresión según la invención cuentan las cepas de tipo salvaje y cepas de laboratorio utilizadas frecuentemente, tales como, entre otras, DH5 α , DH5amcr, W3110, MG1655, MC4100, Y1089, H560 y MM152.

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 de L-treonina y L-triptófano.

5 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)).

10 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.

15 El número de copias del gen *tig* 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 *lacI^Q* (Glascock y Weickert, *Gene* 223, 221-231 (1998)) sin inducción mediante adición de IPTG, que conduce a una expresión muy débil del gen *tig* clonado sin promotor propio. El inicio de transcripción del gen *aroG* se localizó 139 pares de bases antes del codón iniciador ATG (Aldea et al., *EMBO Journal* 8(12): 3923-3931 (1989)), y se transfirió al plásmido no junto con la secuencia de nucleótidos que codifica para el factor desencadenante.

20 La concentración de proteína se puede determinar a través de separación de gel proteico mono- y bidimensional, y 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*, 2ª 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: 32-29; Lottspeich, *Angewandte Chemie* 38: 2630-2647 (1999)).

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.

Los conceptos polipéptido y proteína son intercambiables entre sí.

35 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.

40 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.

Es igualmente objeto de la presente invención un procedimiento para la obtención de los L-aminoácidos L-treonina o L-triptófano mediante fermentación de microorganismos recombinantes de la familia Enterobacteriaceae según la invención, caracterizado por que

45 a) los microorganismos que producen L-treonina o L-triptófano, que contienen un gen *tig* sobreexpresado, que codifica para el factor desencadenante TF, se cultivan en un medio bajo condiciones en las cuales el L-aminoácido deseado L-treonina o L-triptófano se enriquece en el medio o en las células, y

b) el L-aminoácido deseado L-treonina o L-triptófano se aísla, permaneciendo en el producto aislado, 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 %).

50 Los microorganismos recombinantes recombinantes con un gen *tig* sobreexpresado, que son objeto de la presente invención, pueden producir L-aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, en caso

5 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.

10 En una forma de ejecución preferente, los microorganismos recombinantes se generan mediante transformación, transducción o conjugación, o una combinación de estos métodos, con un vector, que contiene el gen *tig*, un alelo de este gen o parte del mismo, que presentan la actividad del factor desencadenante TF, y contiene, en caso dado, un promotor. En el caso de este promotor se puede tratar de un promotor que procede, mediante mutación amplificada, de la propia secuencia reguladora que se encuentra en línea de entrada del gen u ORFs, o se fusionó un promotor eficiente con el gen u ORF.

15 Para la obtención de las cepas de la familia Enterobacteriaceae enriquecidas en L-aminoácido, que contienen un gen *tig* reforzado, se emplean 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 L-aminoácido deseado. A tal efecto se puede emplear 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-aminoácido en \leq (máximo) 120 horas, \leq 96 horas, \leq 48 horas, \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.

20 Las citadas cepas que eliminan L-aminoácidos producen uno o varios, de modo preferente o esencialmente un aminoácido seleccionado a partir del grupo L-treonina y L-triptófano. El concepto L-aminoácido o aminoácido comprende también sus sales.

25 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 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.

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

- Escherichia coli H4581 (EP 0 301 572)
- Escherichia coli KY10935 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61(11):1877-1882 (1997))
- Escherichia coli VNIIGenetika MG442 (US-A-4278,765)
- Escherichia coli VNIIGenetika M1 (US-A-4,321,325)
- 35 • Escherichia coli VNIIGenetika 472T23 (US-A-5,631,157)
- Escherichia coli TH 14.97 (WO 02/26993)
- Escherichia coli TH 21.97 (WO 02/26993)
- Escherichia coli BKIIM B-3996 (US-A-5,175,107)
- Escherichia coli BKIIM B-3996 Δ tdh Δ pckA/pVIC40 (WO 02/29080)
- 40 • Escherichia coli kat 13 (WO 98/04715)
- Escherichia coli Kat 69.9 (WO 02/26993)
- Escherichia coli KCCM-10132 (WO 00/09660)
- Escherichia coli KCCM-10168 (WO 01/14525)

- *Escherichia coli* KCCM-10133 (WO 00/09661)

Como cepas de la especie *Serratia*, en especial del tipo *Serratia marcescens*, apropiadas como cepa madre, que producen, o bien eliminan L-treonina, se deben citar, a modo de ejemplo:

- *Serratia marcescens* HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))
- 5 • *Serratia marcescens* TLr156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))
- *Serratia marcescens* T-2000 (AppliedBiochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992))

Las cepas de la familia de Enterobacteriaceae que producen o eliminan L-treonina poseen preferentemente, entre otras, una o varias de las características genéticas, o bien fenotípicas del grupo: resistencia contra ácido α -amino- β -hidroxivalérico, resistencia contra tialisina, resistencia contra etionina, resistencia contra α -metilserina, resistencia
10 contra ácido diamino succínico, resistencia contra ácido α -aminobutírico, resistencia contra borrelidina, resistencia contra ácido ciclopentano-carboxílico, resistencia contra rifampicina, resistencia contra análogos de valina, como por ejemplo hidroxamato de valina, resistencia contra análogos de purina, como por ejemplo 6-dimetilaminopurina, necesidad de L-metionina, necesidad, en caso dado parcial y compensable, de L-isoleucina, necesidad de ácido meso-diaminopimelínico, auxotropía respecto a dipéptidos que contienen treonina, resistencia contra L-treonina,
15 resistencia contra refinado de treonina, resistencia contra L-homoserina, resistencia contra L-lisina, resistencia contra L-metionina, resistencia contra ácido L-glutámico, resistencia contra L-aspartato, resistencia contra L-leucina, resistencia contra L-fenilalanina, resistencia contra L-serina, resistencia contra L-cisteína, resistencia contra L-valina, sensibilidad frente a piruvato de flúor, treonina-dehidrogenasa en defecto, en caso dado capacidad para la utilización de sacarosa, amplificación del operón de treonina, amplificación de homoserina-dehidrogenasa l-aspartato quinasa I, preferentemente de la forma resistente a retroalimentación, amplificación de homoserinaquinasa, amplificación de treoninasintasa, amplificación de aspartatoquinasa, en caso dado de la forma resistente a retroalimentación, amplificación de aspartatosemialdehído-dehidrogenasa, amplificación de fosfoenolpiruvato-carboxilasa, en caso dado de la forma resistente a retroalimentación, amplificación de fosfoenolpiruvato-sintasa, amplificación de transhidrogenasa, amplificación del producto génico RhtB, amplificación del producto génico RhtC, refuerzo del
20 producto génico YfiK, amplificación de una piruvato-carboxilasa, y atenuación de la formación de ácido acético.

Como cepas de la especie *Escherichia*, en especial del 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)
- *Escherichia coli* JP6015/pMU91 (US5,756,345)
- 30 • *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)
- *Escherichia coli* ATCC 31743 (CA1182409)
- 35 • *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-treonina 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
40 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.

5 En los trabajos que motivan la invención se descubrió que los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae, tras expresión o sobreexpresión del gen *tig*, o sus alelos, producen y concentran en la célula o en el medio de manera acrecentada los L-aminoácidos L-treonina y L-triptófano.

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 (metionina-aminopeptidasa) se puede disociar el aminoácido N-terminal metionina.

10 A partir de *Salmonella enterica* y *Erwinia carotovora*, igualmente pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, es igualmente conocida la secuencia de nucleótidos para el gen *tig* (nº de acceso: NC_003198 (REGIÓN: 493813-495111) y nº de acceso NC_004547 (REGIÓN: (1299536-1300840)). Otras secuencias de nucleótidos para el gen *tig* se encuentran a partir de las siguientes Enterobacteriaceae: *Shigella flexneri* (nº de acceso: CP000266, AE005674, AE014073); *Shigella boydii* (nº de acceso: CP000036); *Shigella dysenteriae* (nº de acceso: CP000034); *Shigella sonnei* (nº de acceso: CP000038); *Salmonella typhimurium* (nº de acceso: AE008716); *Sodalis glossinidius* (nº de acceso: AP008232); *Photobacterium luminescens* (nº de acceso: BX571872).

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

Denominación: factor desencadenante

20 Función: chaperona, implicada en la exportación proteica mediante estabilización de proteínas en una forma de translocación, peptidil-prolil cis/trans isomerasa

Referencia: Crooke E. y Wickner W.; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 84(15): 5216-5220 (1987)

Lee HC. y Bernstein HD.; The Journal of biological chemistry 277(45): 43527-43535 (2002)

Genevaux P. et al.; EMBO reports 5(2): 195-200 (2004)

25 Kramer et al.; The Journal of biological chemistry 279(14): 14165-14170 (2004)

Nº de acceso: U00096 (región: (454357-455655))

El polipéptido codificado posee una longitud de 432 aminoácidos.

Nombre de gen alternativo: b0436, EG11003

30 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).

35 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 *tig* de *Salmonella enterica* y *Erwinia carotovora* 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.

40 Los genes o marcos de lectura abiertos descritos en pasajes de texto 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.

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

Entre los alelos del gen *tig*, 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.

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.

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

Entre los alelos apropiados cuentan además aquellos que son accesibles mediante hibridación, en especial bajo condiciones restrictivas, bajo empleo de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No.5, o partes de los mismos, en especial de las regiones codificantes, o bien de las secuencias complementarias a las mismas.

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).

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 n° 1, SEQ ID n° 3 o SEQ ID n° 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 n° 1603558).

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-treonina 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 plásmidos, como por ejemplo los descritos en el documento US 5 538 873. 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 en línea de entrada de treoninoperona cromosómica, se pudo conseguir un aumento de la expresión. Del mismo modo se pueden emplear los promotores del fago T7, los promotores gear-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 lacI^o 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 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 (delecciones). El intercambio del promotor por un promotor, determinado por ejemplo en análisis de expresión 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 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 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)).

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 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.

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 gen tig, o secuencias de nucleótidos o alelos que codifican para su producto génico.

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

Para la generación de alelos tig, que se emplean en los microorganismos utilizados para el procedimiento según la invención, se pueden emplear, entre otros, métodos de 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: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984), o de Newton y Graham (PCR, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1994). 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)).

Para la construcción de mutaciones puntuales en el gen tig 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 tig 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.

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

10 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 Martínez-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 trasladar los alelos *tig* generados a diversas cepas mediante conjugación o transducción.

Las mutaciones de *tig* se pueden llevar a cabo igualmente en plásmidos de expresión, de modo que las proteínas resultantes se pueden sobreproducir.

15 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, 4ª ed., editorial Springer, New York (USA), 2000) o el método de Berg, Tymoczko and Stryer (Biochemistry, 5ª 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).

25 Además, para la producción de L-aminoácidos, en especial L-treonina, con cepas de la familia Enterobacteriaceae, adicionalmente a la intensificación del gen *tig* puede ser ventajoso amplificar uno o varios enzimas de la vía biosintética de treonina 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.

Para la producción de L-triptófano con cepas de la familia Enterobacteriaceae puede ser igualmente ventajoso, adicionalmente a la intensificación del gen *tig*, intensificar uno o varios enzimas de la vía de biosintética de triptófano conocida, o enzimas de la biosíntesis de serina o enzimas para la producción de 3-desoxi-D-arabino-heptulosa-7-fosfato (DHAP) y corismato. El empleo de genes endógenos es preferente en general.

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

A modo de ejemplo, para la producción de L-treonina se pueden sobreexpresar simultáneamente uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:

- al menos un gen del operon *thrABC* que codifica para la aspartatoquinasa, la homoserina-dehidrogenasa, la homoserinquinasa, y la treoninsintasa (US-A-4,278,765),
- 40 • el gen *pyc* de *Corynebacterium glutamicum* que codifica para la piruvato-carboxilasa (WO 99/18228),
- el gen *pps* que codifica para la fosfoenolpiruvato-sintasa (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992); WO 97/08333),
- el gen *ppc* que codifica para la fosfoenolpiruvato-carboxilasa (WO 02/064808),
- 45 • los genes *pntA* y *pntB* que codifican para las subunidades de piridina-transhidrogenasa (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986); WO 95/11985),
- el gen *rhtC* que codifica para la proteína que media la resistencia de treonina (EP-A-1 013 765),

ES 2 611 015 T3

- el gen thrE de *Corynebacterium glutamicum* que codifica para la proteína de exportación de treonina (WO 01/92545),
- el gen gdhA que codifica para la glutamato-dehidrogenasa (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983); DE19907347),
- 5 • el gen ptsH del operón ptsHIcrr que codifica para la fosfohistidina-proteína-hexosa-fosfotransferasa del sistema de fosfotransferasa PTS (WO 03/004674),
- el gen ptsI del operón ptsHIcrr que codifica para el enzima I del sistema de fosfotransferasa PTS (WO 03/004674),
- 10 • el gen crr del operón ptsHIcrr que codifica para el componente específico de glucosa IIA del sistema de fosfotransferasa PTS (WO 03/004674),
- el gen ptsG que codifica para el componente específico de glucosa IIBC (WO 03/004670),
- el gen cysK que codifica para la cisteína-sintasa A (WO 03/006666),
- el gen cysB que codifica para el regulador del regulón cys (WO 03/006666),
- el gen cysJ del operón cysJIH que codifica para la flavoproteína de NADPH-sulfito-reductasa (WO 03/006666),
- 15 • el gen cysI del operón cysJIH que codifica para la hemoproteína de NADPH-sulfito-reductasa (WO 03/006666),
- el gen cysH del operón cysJIH que codifica para la adenililsulfato-reductasa (WO 03/006666),
- el gen sucA del operón sucABCD que codifica para la subunidad decarboxilasa de 2-cetoglutarato-dehidrogenasa (WO 03/008614),
- 20 • el gen sucB del operón sucABCD que codifica para la subunidad dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-cetoglutarato-dehidrogenasa (WO 03/008614),
- el gen sucC del operón sucABCD que codifica para la subunidad β de succinil-CoA-sintetasa (WO 03/008615),
- el gen sucD del operón sucABCD que codifica para la subunidad α de succinil-CoA-sintetasa (WO 03/008615),
- el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yjcG de *Escherichia coli* (número de acceso NC000913 (región 4281276-4282925) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
- 25 • el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yibD de *Escherichia coli* (número de acceso NC000913 (región 3787070-3788104) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
- el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) yaaU de *Escherichia coli* (número de acceso NC000913 (región 45807-47138) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)), que es conocido también bajo la denominación yaaU-ORF,
- 30 • el gen secB que codifica para exportación de proteína chaperona SecB del complejo de secreción de proteína Sec (número de acceso U00096.2 (región 3781684-3782151 (complementario) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
- el gen mopB que codifica para el chaperón GroES, regulador de Hsp60 (WO 03/004669),
- el gen dnaK que codifica para la chaperona Hsp70 (DnaK) (número de acceso U00096.2 (región 12163-14079)),
- 35 • el gen dnaJ que codifica para la chaperona DnaJ, chaperona acompañante de DnaK (número de acceso U00096.2 (región 14168-15298))

ES 2 611 015 T3

- el gen mopA que codifica para la chaperona Hsp60 (GroEL) (número de acceso U00096.2 (región 4369048-4370694)),
 - el gen ftsZ que codifica para la proteína de división celular enlazante de GTP esencial (número de acceso U00096.2 (región 105305-106456)),
- 5
- el gen htpG que codifica para la chaperona Hsp90 (HtpG) (número de acceso U00096.2 (región 494344-496218)).
- Por lo demás, a modo de ejemplo para la producción de L-triptófano se pueden sobreexpresar simultáneamente uno o varios genes, seleccionados a partir del grupo
- 10
- al menos un gen del operón de triptófano que codifica para la antranilato-sintasa, la antranilato-fosforibosiltransferasa, la fosforibosilantranilato-isomerasa, la indol-3-glicerinfosfato-sintasa y la triptófano-sintasa (Applied and Environmental Microbiology 38(2): 181-190 (1979)),
 - el gen serA que codifica para la 3-fosfoglicerato-dehidrogenasa (WO87/01130)
 - el gen ser B que codifica para la fosfoserinfosfatasa (WO87/01130)
 - el gen serC que codifica para la fosfoserinaminotransferasa (WO87/01130)
- 15
- el gen aroF que codifica para la DHAP-sintasa sensible a L-tirosina (WO87/01130; EP1270721)
 - el gen aroG que codifica para la DHAP-sintasa sensible a L-fenilalanina (WO87/01130; EP1270721)
 - el gen aroH que codifica para la DHAP-sintasa sensible a L-triptófano (WO87/01130; EP1270721)
 - el gen pps que codifica para la fosfoenolpiruvato-sintasa (WO96/08567)
 - el gen pckA que codifica para la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (WO2004/090125),
- 20
- el gen tktA que codifica para la transcetolasa A (US5, 168, 056),
 - el gen tktB que codifica para la transcetolasa B (US5, 168, 056),
 - 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)),
- 25
- el gen secB que codifica para la exportación de proteína chaperona SecB del complejo de secreción de proteína Sec (número de acceso U00096.2 (región 3781684-3782151 (complementario) del National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA)),
 - el gen mopB que codifica para la chaperona GroES, regulador de Hsp60 (WO 03/004669),
 - el gen dnaK que codifica para la chaperona Hsp70 (DnaK) (número de acceso U00096.2 (región 12163-14079)),
- 30
- el gen dnaJ que codifica para la chaperona DnaJ, chaperona acompañante de DnaK (número de acceso U00096.2 (región 14168-15298))
 - el gen mopA que codifica para la chaperona Hsp60 (GroEL) (número de acceso U00096.2 (región 4369048-4370694)),
 - el gen ftsZ que codifica para la proteína de división celular FtsZ enlazante de GTP esencial (número de acceso U00096.2 (región 105305-106456)),
- 35
- el gen htpG que codifica para la chaperona Hsp90 (HtpG) (número de acceso U00096.2 (región 494344-496218)).

Los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae que producen L-treonina poseen típicamente una aspartatoquinasa l/homoserinina-dehidrogenasa I resistente, o bien desensibilizada a "retroalimentación". Se entiende por aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa resistente a "retroalimentación" enzimas de aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa (codificadas por thrA, EC:2.7.2.4/EC:1.1.1.3), que presentan, en comparación con la forma salvaje, una menor sensibilidad frente a la inhibición debida a treonina o mezclas de treonina y el análogo de treonina ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV) o AHV por separado. Los genes, o bien alelos que codifican para estos enzimas desensibilizados se denominan también alelos thrA^{FBR}. En el estado de la técnica se describen alelos thrA^{FBR}, que codifican para variantes de aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa que poseen sustituciones de aminoácidos en comparación con la proteína de tipo salvaje. La región codificante del gen thrA de tipo salvaje de Escherichia coli correspondiente al número de acceso U00096.2 del banco de datos NCBI (Bethesda, MD, USA) se representa en SEQ ID NO:7, y el polipéptido codificado por este gen se representa en SEQ ID NO:8.

También la secuencia de nucleótidos del gen thrA de Serratia marcescens es conocida y se encuentra disponible bajo el número de acceso X60821 en NCBI. La región codificante del gen thrA de tipo salvaje de Serratia marcescens se representa en SEQ ID NO:9, y el polipéptido codificado por este gen se representa en SEQ ID NO:10.

Los microorganismos de la familia Enterobacteriaceae que producen L-treonina, empleados para las medidas de la invención, disponen preferentemente de un alelo thrA, que codifica para una variante de aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa que posee la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10, seleccionándose ésta, o varias de las sustituciones de aminoácidos, a partir del grupo

ThrA E253K (sustitución de ácido L-glutámico en la posición 253 del enzima codificado aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa según SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 por L-lisina; véase Research Disclosure 505, 537 (2006)),

ThrA G330D (sustitución de glicina en la posición 330 del enzima codificado aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa según SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 por ácido L-aspartico; véase Omori et al. (Journal of Bacteriology 175(3), 785-794 (1993)),

ThrA S345F (sustitución de L-serina an la posición 345 del enzima codificado aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa según SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 por L-fenilalanina; véase Lee et al., Journal of Bacteriology 185 (18) : 5442-5451 (2003)),

ThrA S352, sustitución de L-serina an la posición 352 del enzima codificado aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa según SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 por L-fenilalanina, L-tirosina, L-asparagina, L-valina, L-arginina, L-glutamina, ácido L-glutámico, L-histidina, L-leucina, L-metionina, L-triptófano o L-valina, preferentemente por L-fenilalanina; véase Omori et al. (Journal of Bacteriology 175(3), 785-794 (1993) y Omori et al. (Journal of Bacteriology 175(4), 959-965 (1993)),

ThrA A479T (sustitución de L-Alanin an la posición 479 del enzima codificado aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa según SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:10 por L-Threonin; véase Omori et al. (Journal of Bacteriology 175(3), 785-794 (1993)).

Es preferente uno de los alelos thrA^{FBR} thrA E253K (sustitución de ácido L-glutámico en la posición 253 del enzima codificado aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa por L-lisina) o S345F (sustitución de L-serina en la posición 345 del enzima codificado aspartatoquinasa/homoserina-dehidrogenasa por L-fenilalanina) según SEQ ID NO:8.

Los alelos thrA^{FBR} aquí descritos, que codifican para un enzima aspartatoquinasa/homoserin-dehidrogenasa, se pueden sobreexpresar con las medidas descritas anteriormente.

Además, para la producción de L-treonina y L-triptófano puede ser ventajoso excluir reacciones secundarias no deseadas, adicionalmente a la amplificación del gen tig (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

A modo de ejemplo, para la producción de L-treonina se pueden excluir simultáneamente uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo

- el gen thd que codifica para la treonina-dehidrogenasa (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),

ES 2 611 015 T3

- el gen mdh que codifica para la malato-dehidrogenasa (E.C. 1.1.1.37) (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- el gen pckA que codifica para el enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (WO 02/29080),
- el gen poxB que codifica para la piruvato-oxidasa (WO 02/36797),
- 5 • el gen dgsA que codifica para el regulador DgsA del sistema fosfotransferasa (WO 02/081721), que es conocido también bajo la denominación gen mlc,
- el gen fruR que codifica para el represor de fructosa (WO 02/081698), que es conocido también bajo la denominación gen cra,
- 10 • el gen rpoS que codifica para el factor Sigma³⁸ (WO 01/05939), que es conocido también bajo la denominación gen katF,
- el gen aspA que codifica para la aspartato amonio-liasa (WO 03/008603),
- el gen ompF que codifica para la porina F de membrana exterior (número de acceso U00096.2 (región 985117-986205 (complementaria)),

15 o se puede reducir la expresión. Estas medidas se llevan a cabo, en caso dado, adicionalmente a, o bien en combinación apropiada con las medidas indicadas de sobreexpresión de genes para el aumento de la producción de treonina.

Además, para la producción de L-triptófano puede ser ventajoso, adicionalmente a la sobreexpresión del gen tig, excluir uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo

- el gen tnaA que codifica para la triptofanasa (US4, 371, 614),
- 20 • el gen trpR que codifica para el represor del operón trp (US4, 371, 614),
- el gen tyrA que codifica para la corismato-mutasa T y la pefenato-dehidrogenasa (US4,371,614),
- el gen pheA que codifica para la corismato-mutasa P y la pefenato-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 la triptófano-permeasa (US5,756,345),
- 25 • el gen aroP que codifica para el transportador para aminoácidos aromáticos (US5,756,345),
- el gen sdaA que codifica para la L-serin-deaminasa (EP0149539),
- el gen pgi que codifica para la glucosa-6-fosfato-isomerasa (WO87/01130),
- el gen tyrB que codifica para la tirosina-aminotransferasa (WO87/01130),
- 30 • el gen ompF que codifica para la porina F de membrana exterior (número de acceso U00096.2 (región 985117-986205 (complementaria)),

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

35 Mediante las medidas de reducción de la expresión se reduce la actividad o concentración de la correspondiente proteína generalmente 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 la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o bien de la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo o cepa madre no recombinante para el enzima, o bien para la proteína correspondiente. Se

entiende por microorganismo o cepa madre (parent strain) no recombinante el microorganismo en el que se lleva a cabo la reducción de la expresión o exclusión según la invención.

5 La reducción de la expresión génica se puede efectuar mediante control de cultivo apropiado, mediante modificación genética (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica, o también mediante técnica de ARN antisentido. Las estructuras de señales de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes
 10 activadores, operadores, promotores, atenuadores, puntos de enlace ribosómicos, el codón iniciador y terminadores. El especialista encuentra datos a tal efecto, entre otros, por 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 conocidos de genética y biología molecular, como por ejemplo el método de Knippers ("Molekulare Genetik", 6ª edición, editorial Georg Thieme, Stuttgart, Alemania, 1995) o el de Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990).

15 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.

20 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)).

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

30 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 sustancia de empleo esencial para la obtención del producto, en caso dado también varias sustancias 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.

35 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.

40 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 sustancias 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.

45 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.

50 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 sustancias se pueden emplear aisladas o como mezcla.

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 nitrato amónico. Las fuentes de nitrógeno se pueden emplear aisladas o como mezcla.

- 5 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 sustancias de crecimiento esenciales, como aminoácidos y vitaminas, adicionalmente a las sustancias citadas anteriormente. Al medio de cultivo se pueden añadir además precursores apropiados. Las citadas sustancias 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 sustancias 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 sustancias 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 aísla 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 $\geq 90\%$ en peso, $\geq 95\%$ en peso, $\geq 96\%$ en peso, $\geq 97\%$ en peso, $\geq 98\%$ en peso o $\geq 99\%$ 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 %, $\geq 60\%$, $\geq 70\%$, $\geq 80\%$, $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$, o también completamente (100 %).

45 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.

50 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 granulaci3n apropiados. En este caso se elimina el agua en total en m1s 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.

5 El an1lisis de L-amino1cidos se puede efectuar mediante cromatograf1a de intercambio ani3nico con subsiguiente derivatizaci3n de ninhidrina, as1 como se describe en Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)), o se puede efectuar mediante HPLC en fase inversa, as1 como se describe en Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

La presente invenci3n se explica m1s detalladamente a continuaci3n por medio de ejemplos de realizaci3n.

10 Se describen medios m1nimos (M9) y completos (LB) para Escherichia coli por J.H. Miller (A Short Course in Bacterial Genetics (1992), Cold Spring Harbor Laboratory Press). El aislamiento de ADN plasm1dico a partir de Escherichia coli, as1 como todas las t1cnicas para la restricci3n, ligaci3n, tratamiento de Klenow y tratamiento con fosfatasa alcalino, se llevan a cabo seg1n Sambrook et al. (Molecular Cloning - A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). La transformaci3n de Escherichia coli, si no se describe lo contrario, se lleva a cabo seg1n Chung et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 2172-2175 (1989)).

La temperatura de incubaci3n en la obtenci3n de cepas y transformantes es 37°C.

Ejemplo 1

Construcci3n del pl1smido de expresi3n pTrc99Atig

20 El gen tig de E. coli K12 se amplifica bajo aplicaci3n de la reacci3n en cadena de polimerasa (PCR), as1 como oligonucle3tidos sint1ticos. Partiendo de la secuencia de nucle3tidos del gen tig en E. coli K12 MG1655 (n1mero de acceso U00096 (regi3n: (454357-455655)), Blattner et al. (Science 277: 1453-1474 (1997))) se sintetizan cebadores de PCR (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania). Las secuencias de cebador se modifican de modo que se producen puntos de identificaci3n para enzimas de restricci3n. Para el cebador tig-1 se selecciona la secuencia de identificaci3n para XbaI y para el cebador tig-2 se selecciona la secuencia de identificaci3n para HindIII, que est1n marcadas mediante subrayado en la secuencia de nucle3tidos representada a continuaci3n:

tig-1:

5' - GCTCTAGA AAGAGTTGAC CGAGCACTGT- 3' (SEQ ID No. 11)

tig-2:

5' - GCAAGCTT ATTACGCCTG CTGGTTCATC- 3' (SEQ ID No. 12)

30 El ADN de E. coli K12 MG1655 DNA cromos3mico empleado para la PCR se aisla seg1n datos del fabricante con "Qiagen Genomic-tips 100/G" (QIAGEN, Hilden, Alemania). Un fragmento de ADN de 1350 bp de tama1o se puede amplificar con los cebadores espec1ficos bajo condiciones de PCR est1ndar (Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press) mit der Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Alemania) (SEQ ID No. 13).

35 El fragmento tig amplificado se liga con el vector pCR-Blunt II-TOPO (Zero TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Groningen, Holanda) correspondientemente a los datos del fabricante, y se transforma en la cepa de E. coli TOP10. La selecci3n de c1lulas que portan pl1smido se efect1a en agar LB, que se ha mezclado con 50 µg/ml de canamicina. Tras el aislamiento de ADN plasm1dico se disocia el vector con el enzima EcoRI gespalten, y tras verificaci3n de la disociaci3n se marca con pCRBlunttig en gel de agarosa al 0,8 %.

40 La secuencia de nucle3tidos del fragmento de ADN amplificado, o bien del producto de PCR, se verifica seg1n el m1todo de interrupci3n de cadenas didesoxi de Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 74:5463-5467 (1977)) con el aparato de secuenciaci3n "ABI Prism 377" de la firma PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Alemania). La secuencia del producto de PCR corresponde a las posiciones 1-1299 de la secuencia representada en SEQ ID No. 1. La secuencia de amino1cidos de la correspondiente prote1na Tig se representa en

45 SEQ ID No. 14.

A continuaci3n se disocia el vector pCRBlunttig con los enzimas HindIII y XbaI, y el fragmento tig de aproximadamente 1350bp tig se aisla del gel tras separaci3n en gel de agarosa al 0,8 % (QIAquick Gel Extraction

Kit, QIAGEN, Hilden, Alemania) y se liga con el vector pTrc99A (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), que se ha digerido con los enzimas HindIII y XbaI. La cepa de E. coli DH5α (Grant et al.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) se transforma con la carga de ligación, y las células que portan plásmido se seleccionan en agar LB, que se ha mezclado con 50 µg/ml de ampicilina.

- 5 La clonación exitosa se puede identificar, tras el aislamiento de ADN plasmídico, mediante la disociación de control con los enzimas EcoRI, o bien PstI.

El plásmido se caracteriza como pTrc99Atig (figura 1).

Ejemplo 2

- 10 Obtención de L-treonina con la cepa MG442/pTrc99Atig. La cepa de E. coli MG442 que produce L-treonina se describe en la solicitud de patente US-A- 4,278,765, y está depositada en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos Industriales (VKPM, Moskau, Rusia) como CMIM B-1628.

- 15 La cepa MG442 se transforma con el plásmido de expresión pTrc99Atig descrito en el ejemplo 1 y con el vector pTrc99A, y se selecciona en agar LB con 50 µg/ml de células que portan plásmido de ampicilina. De este modo se producen las cepas MG442/pTrc99Atig y MG442/pTrc99A. A continuación, colonias aisladas seleccionadas se propagan ulteriormente en medio mínimo con la siguiente composición: 3,5 g/l de Na₂HPO₄*2H₂O, 1,5 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de NH₄Cl, 0,1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 2 g/l de glucosa, 20 g/l de agar, 50 mg/l de ampicilina. La formación de L-treonina se verifica en cultivos en discontinuo de 10 ml, que están contenidos en matraces Erlenmeyer de 100 ml. A tal efecto se inoculan 10 ml de medio de cultivo previo de la siguiente composición: 2 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de (NH₄)₂SO₄, 1 g/l de KH₂PO₄, 0,5 g/l de MgSO₄*7H₂O, 15 g/l de CaCO₃, 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina, y se incubó durante 16 horas a 37°C y 180 rpm en un incubador ESR de la firma Kühner AG (Birsfelden, Suiza). Cada 250 µl de este cultivo previo se sobreinoculan en 10 ml de medio de producción (25 g/l de (NH₄)₂SO₄, 2 g/l de KH₂PO₄, 1 g/l de MgSO₄*7H₂O, 0,03 g/l de FeSO₄*7H₂O, 0,018 g/l de MnSO₄*1H₂O, 30 g/l de CaCO₃, 20 g/l de glucosa, 50 mg/l de ampicilina), y se incuban durante 48 horas a 37°C. Tras la incubación se determina la densidad óptica (OD) de la suspensión de cultivo con un fotómetro LP2W de la firma Dr. Lange (Düsseldorf, Alemania) a una longitud de onda de medida de 660 nm.
- 20
- 25

A continuación se determina la concentración de L-treonina formada en el exceso de cultivo filtrado en medio estéril con un analizador de aminoácidos de la firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Alemania) mediante cromatografía de intercambio iónico y reacción en columna subsiguiente con detención de ninhidrina.

En la tabla 1 se representa el resultado del ensayo.

- 30 Tabla 1

| Cepa | OD (660 nm) | L-treonina g/l |
|------------------|-------------|----------------|
| MG442/pTrc99A | 3,0 | 1,3 |
| MG442/pTrc99Atig | 5,1 | 1,9 |

Breve descripción de las figuras:

Figura 1: mapa del plásmido pTrc99Atig que contiene el gen tig

- 35 Los datos de longitudes se deben comprender como datos aproximados. Las abreviaturas y denominaciones empleadas tienen el siguiente significado:

- Amp: gen que codifica para la resistencia a ampicilina
- lacI: gen para la proteína represora del promotor trc
- Ptrc: región promotora trc, IPTG-inducible

- tig: región codificante del gen tig
- 5S: región de rARN 5S
- rrnBT: región de terminación de rARN

Las abreviaturas para los enzimas de restricción tienen el siguiente significado:

- 5
- XbaI: endonucleasa de restricción de Xanthomonas badrii
 - HindIII: endonucleasa de restricción de Haemophilus influenzae
 - EcoRI: endonucleasa de restricción de Escherichia coli
 - PstI: endonucleasa de restricción de Providencia stuartii

PROTOCOLO DE SECUENCIA

- 10 <110> Evonik Degussa GmbH
- <120> Procedimiento para la obtención de L-aminoácidos bajo empleo de cepas mejoradas de la familia Enterobacteriaceae
- <130> 200700616 AL
- <160> 14
- 15 <170> Patent In version 3.3
- <210> 1
- < 211> 1299
- < 212> DNA
- < 213> Escherichia coli
- 20 <220>
- < 221> CDS
- < 222> (1)..(1299)
- < 223> Región codificante tig
- <400> 1

ES 2 611 015 T3

```

UUC GAA GGC GGT AAA GCG LCL GAT UUC GLA CLG GCG ALG GGC CAG GGL      576
Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly
180                               185                               190

CGU ALG ALC CCG GGC UUU GAA GAC GGU ALC AAA GGC CAC AAA GCU GGC      624
Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly
195                               200                               205

GAA GAG UUC ACC ALC GAC GLG ACC UUC CCG GAA GAA UAC CAC GCA GAA      672
Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu
210                               215                               220

AAC CTG AAA GGT AAA GCA GCG AAA TTC GCU ATC AAC CTG AAG AAA GUT      720
Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val
225                               230                               235                               240

GAA GAG CGU GAA CTG CCG GAA CTG ACT GCA GAA TTC ATC AAA CGT TTC      768
Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe
245                               250                               255

GGC GLL GAA GAT GGT CCC GTA GAA GGU CLG CCG GCU GAA GLG CGL AAA      816
Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys
260                               265                               270

AAC ALG GAG CCG GAG CLG AAG AGC GCC ALC CGL AAC CCG GLL AAG LCL      864
Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser
275                               280                               285

CAG GCG ALC GAA GGT CLG GLA AAA GCU AAC GAC ALC GAC GTA CCG GCL      912
Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala
290                               295                               300

GGC CTG ATC GAC AGC GAA ATC GAC GTT CTG CGT CCG CAG GCT GCA CAG      960
Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln
305                               310                               315                               320

CGU TTC GGU GGC AAC GAA AAA CAA GCT CTG GAA CTG CCG CCG GAA CTG      1008
Arg Phe Gly Gly Asp Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu
325                               330                               335

UUC GAA GAA CAG GCU AAA CCG CCG GTA GLL GLL GGC CLG CLG CLG GGC      1056
Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly
340                               345                               350

GAA GLL ALC CCG ACC AAC GAG CLG AAA GCU GAC GAA GAG CCG GLG AAA      1104
Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys
355                               360                               365

GGC CLG ALC GAA GAG ALG GCU LCU GCG UAC GAA GAT CCG AAA GAA GUL      1152
Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val
370                               375                               380

ATC GAG TTC UAC AGC AAA AAC AAA GAA CTG ATG GAC AAC ATG CCG AAT      1200
Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn
385                               390                               395                               400

GTT GCT CTG GAA GAA CAG GCT GTT GAA GCT GTA CTG GCG AAA GCG AAA      1248
Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys
405                               410                               415

GTG ACT GAA AAA GAA ACC ACT TTC AAC GAG CTG ATG AAC CAG CAG GCG      1296
Val Thr Glu Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala
420                               425                               430

Laa                                                                 1299

```

<210> 2

< 211> 432

5

< 212> PRT

< 213> Escherichia coli

<400> 2

ES 2 611 015 T3

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
 1 5 10 15
 Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu
 20 25 30
 Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys
 35 40 45
 Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln
 50 55 60
 Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile
 65 70 75 80
 Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu
 85 90 95
 Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr
 100 105 110
 Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro
 115 120 125
 Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu
 130 135 140
 Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala
 145 150 155 160
 Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu
 165 170 175
 Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly
 180 185 190
 Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly
 195 200 205
 Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu
 210 215 220
 Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe
 245 250 255

ES 2 611 015 T3

| Val | Pro | Met | Asn | Ile | Val | Ala | Gln | Arg | Tyr | Gly | Ala | Ser | Val | Arg | Gln | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| gac | gag | ctg | ggc | gat | ctg | atg | agc | cgc | aac | ttc | ggt | gac | gcg | alc | alc | 240 |
| Asp | Val | Leu | Gly | Asp | Leu | Met | Ser | Arg | Asn | Phe | Val | Asp | Ala | Ile | Ile | |
| 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | |
| aaa | gaa | aaa | att | aac | ccg | gca | ggc | gcg | ccg | aac | lal | ggt | ccg | ggc | gaa | 288 |
| Lys | Glu | Lys | Ile | Asn | Pro | Ala | Gly | Ala | Pro | Asn | Tyr | Val | Pro | Gly | Glu | |
| | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| tac | aaa | gag | ggt | gaa | gac | ttc | acc | tac | tcc | gtc | gaq | ttt | gaa | gtc | tac | 336 |
| Tyr | Lys | Val | Gly | Glu | Asp | Phe | Thr | Tyr | Ser | Val | Glu | Phe | Glu | Val | Tyr | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| ccg | gaa | ggt | gag | ctg | acc | ggc | ctc | gaa | tcc | atc | gaa | ggt | gaa | aag | ccg | 384 |
| Pro | Glu | Val | Glu | Leu | Thr | Gly | Leu | Glu | Ser | Ile | Glu | Val | Glu | Lys | Pro | |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | 125 | | | |
| ggt | ggt | gaa | gtc | acc | gac | gct | gac | gtt | gat | gtg | atg | ctg | gac | acc | ctg | 432 |
| Val | Val | Glu | Val | Thr | Asp | Ala | Asp | Val | Asp | Val | Met | Leu | Asp | Thr | Leu | |
| | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| cgt | aag | cag | cag | ggc | acc | tgg | aaa | gaa | aaa | gac | ggc | gct | gcg | gat | ggc | 480 |
| Arg | Lys | Gln | Gln | Ala | Thr | Trp | Lys | Glu | Lys | Asp | Gly | Ala | Ala | Asp | Ala | |
| 145 | | | | 150 | | | | | | 155 | | | | 160 | | |
| gaa | gac | cgc | gtg | acc | atc | gat | ttc | acc | ggc | tct | gta | gac | ggc | gaa | gag | 528 |
| Glu | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Asp | Phe | Thr | Gly | Ser | Val | Asp | Gly | Glu | Glu | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| ttc | gaa | ggc | ggc | aaa | ggc | acc | gat | ttc | ggt | ctg | ggc | atg | ggc | cag | ggt | 576 |
| Phe | Glu | Gly | Gly | Lys | Ala | Thr | Asp | Phe | Val | Leu | Ala | Met | Gly | Gln | Gly | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| cgt | atg | att | ccg | ggc | ttt | gaa | gac | ggc | ggt | aaa | ggc | cac | aaa | gct | ggc | 624 |
| Arg | Met | Ile | Pro | Gly | Phe | Glu | Asp | Gly | Val | Lys | Gly | His | Lys | Ala | Gly | |
| | | 195 | | | | 200 | | | | | | 205 | | | | |
| gaa | gag | ttc | act | atc | gat | gtg | acc | ttc | ccg | gaa | gag | lac | cac | gct | gaa | 672 |
| Glu | Glu | Phe | Thr | Ile | Asp | Val | Thr | Phe | Pro | Glu | Glu | Tyr | His | Ala | Glu | |
| | | 210 | | | | 215 | | | | | | 220 | | | | |
| aac | ctg | aaa | ggt | aaa | ggc | gct | aag | ttc | ggt | atc | aac | ctg | aag | aaa | ggt | 720 |
| Asn | Leu | Lys | Gly | Lys | Ala | Ala | Lys | Phe | Val | Ile | Asn | Leu | Lys | Lys | Val | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | 240 | | |
| gaa | gaa | cgc | gaa | ctg | ccg | gaa | ctg | acc | gaa | gaa | ttc | atc | aaa | cgt | ttc | 768 |
| Glu | Glu | Arg | Glu | Leu | Pro | Glu | Leu | Thr | Glu | Glu | Phe | Ile | Lys | Arg | Phe | |
| | | | 245 | | | | | 250 | | | | | | 255 | | |
| ggc | ggt | gaa | gat | ggt | tcc | gta | gcc | ggt | ctg | cgc | gct | gaa | gta | cgt | aaa | 816 |
| Gly | Val | Glu | Asp | Gly | Ser | Val | Ala | Gly | Leu | Arg | Ala | Glu | Val | Arg | Lys | |
| | | | 260 | | | | 265 | | | | | | 270 | | | |
| aac | atg | gaa | cgc | gaq | ctg | aaa | ggc | gcg | gtg | cgt | aac | cgc | glt | aag | ttc | 864 |
| Asn | Met | Glu | Arg | Glu | Leu | Lys | Gly | Ala | Val | Arg | Asn | Arg | Val | Lys | Ser | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| caq | gcg | atc | gaa | ggt | ctg | gta | aaa | gct | aac | gac | atc | gac | gta | ccg | ttc | 912 |
| Gln | Ala | Ile | Glu | Gly | Leu | Val | Lys | Ala | Asn | Asp | Ile | Asp | Val | Pro | Ser | |
| | | 290 | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| gcg | ctg | atc | gac | acc | gaa | atc | gac | gtt | ctg | cgt | cgt | caq | gct | gcg | caq | 960 |
| Ala | Leu | Ile | Asp | Ser | Glu | Ile | Asp | Val | Leu | Arg | Arg | Gln | Ala | Ala | Gln | |
| 305 | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | 320 | | |
| cgt | ttt | ggt | ggt | aac | gaq | aaa | caq | gct | ctg | gaq | ctg | ccg | cgc | gaa | ctg | 1008 |
| Arg | Phe | Gly | Gly | Asn | Glu | Lys | Gln | Ala | Leu | Glu | Leu | Pro | Arg | Glu | Leu | |

ES 2 611 015 T3

| | | | | |
|---|---|-----|-----|------|
| | 325 | 330 | 335 | |
| Ile Gaa Gaa Cag Gcl Aaa Cgl Cgl Gln Gll Gln Gcl Cgl Cgl Clc Ggc | Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly | | | 1056 |
| | 340 | 345 | 350 | |
| Gaa Gtc Aaa Cgt Acc Aac Gaa Ctg Aaa Gcg Gac Gaa Gaa Cgc Gtt Aaa | Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys | | | 1104 |
| | 355 | 360 | 365 | |
| Ggc Ctg Aac Gaa Gag Atg Gcc Tct Gct Tac Gaa Gat Ccg Aaa Gaa Gtg | Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val | | | 1152 |
| | 370 | 375 | 380 | |
| Ala Gag Ile Tac Agc Aaa Aal Aaa Gag Ctg Alg Gac Aal Alg Cgl Aac | Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn | | | 1200 |
| | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Glc Gcl Ctg Gaa Gaa Cag Gcl Gll Gaa Gcg Gll Ctg Gca Aaa Gcg Aaa | Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys | | | 1248 |
| | 405 | 410 | 415 | |
| Glg Lcl Gaa Aaa Gcc Act Lcc Llc Aal Gag Ctg Alg Aac Cag Cag Gcg | Val Ser Glu Lys Ala Thr Ser Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala | | | 1296 |
| | 420 | 425 | 430 | |
| Laa | | | | 1299 |

<210> 4

< 211> 432

< 212> PRT

5 < 213> Salmonella enterica

<400> 4

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gln | Val | Ser | Val | Glu | Thr | Thr | Gln | Gly | Leu | Gly | Arg | Arg | Val | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ile | Thr | Ile | Ala | Ala | Asp | Ser | Ile | Glu | Thr | Ala | Val | Lys | Ser | Glu | Leu |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Val | Asn | Val | Ala | Lys | Lys | Val | Arg | Ile | Asp | Gly | Phe | Arg | Lys | Gly | Lys |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Val | Pro | Met | Asn | Ile | Val | Ala | Gln | Arg | Tyr | Gly | Ala | Ser | Val | Arg | Gln |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Asp | Val | Leu | Gly | Asp | Leu | Met | Ser | Arg | Asn | Phe | Val | Asp | Ala | Ile | Ile |
| 65 | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| Lys | Glu | Lys | Ile | Asn | Pro | Ala | Gly | Ala | Pro | Asn | Tyr | Val | Pro | Gly | Glu |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Tyr | Lys | Val | Gly | Glu | Asp | Phe | Thr | Tyr | Ser | Val | Glu | Phe | Glu | Val | Tyr |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Pro | Glu | Val | Glu | Leu | Thr | Gly | Leu | Glu | Ser | Ile | Glu | Val | Glu | Lys | Pro |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | | 125 | | |
| Val | Val | Glu | Val | Thr | Asp | Ala | Asp | Val | Asp | Val | Met | Leu | Asp | Thr | Leu |

ES 2 611 015 T3

| | | |
|--|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
| Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Ala Asp Ala 145 150 155 160 | | |
| Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu 165 170 175 | | |
| Phe Glu Gly Gly Lys Ala Thr Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly 180 185 190 | | |
| Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Val Lys Gly His Lys Ala Gly 195 200 205 | | |
| Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu 210 215 220 | | |
| Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Val Ile Asn Leu Lys Lys Val 225 230 235 240 | | |
| Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe 245 250 255 | | |
| Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Ala Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys 260 265 270 | | |
| Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Gly Ala Val Arg Asn Arg Val Lys Ser 275 280 285 | | |
| Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ser 290 295 300 | | |
| Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln 305 310 315 320 | | |
| Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu 325 330 335 | | |
| Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly 340 345 350 | | |
| Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys 355 360 365 | | |
| Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val 370 375 380 | | |
| Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn 385 390 395 400 | | |
| Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys 405 410 415 | | |
| Val Ser Glu Lys Ala Thr Ser Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala 420 425 430 | | |

<210> 5

5

< 211> 1305

< 212> DNA

ES 2 611 015 T3

< 213> Erwinia carotovora

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(1305)

5

< 223> Región codificante tig

<400> 5

```

atg caa gll lca gll gaa acc act caa ggl ctg gga cgl cgc gta acc      48
Met Glu Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
-
att acc gtt gct gct gac atc att gag agt cgg gtg aag agc gag ctg      96
Ile Thr Val Ala Ala Asp Ile Ile Glu Ser Ala Val Lys Ser Glu Leu
20 25 30
gtc aac cgc gcc aaa aaa gta cgt att gac ggt ttt cgt aaa gcc aaa      144
Val Asn Ala Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys
35 40 45
gtg ccg atg aat gtt gtt gct cag cgt caa ggt gcc tct gtg cgt cag      192
Val Pro Met Asn Val Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln
50 55 60
gac gta ttg gct gac ctg atg cag cgc aac ttt gtt gac gct acc atc      240
Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Gln Arg Asn Phe Val Asp Ala Ile Ile
65 70 75 80
aaa gaa aaa att aat ccg gtt gcc ccg cct aac lat acc ccc gcc gaa      288
Lys Glu Lys Ile Asn Pro Val Gly Ala Pro Asn Tyr Thr Pro Gly Glu
85 90 95
lat gcc gta ggl gcc gac llc act lac act gta gag lll gac glg lac      336
Tyr Ala Val Gly Gly Asp Phe Thr Tyr Thr Val Glu Phe Asp Val Tyr
100 105 110
ccg gaa gtc gaa ctg aaa ggt ctg gaa gca atc gaa gtt gaa aaa ccg      384
Pro Glu Val Glu Leu Lys Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro
115 120 125
gtt gtt gaa gtg act gat gct gac gtt gat acc atg ctg gat acc ctg      432
Val Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Thr Met Leu Asp Thr Leu
130 135 140
cgl aag caa caq ccg act lgg aaa gaa act gac cgl gcl ccg aca gcc      480
Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Thr Asp Arg Ala Ala Thr Ala
145 150 155 160
gaa gal cgl gca acg atc gat llc act gcc lcl atc gac ggl gaa gtc      528
Glu Asp Arg Ala Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Ile Asp Gly Glu Val
165 170 175
ttc gaa gcc gga aaa ccg tcc gac ttc gtt ctg gca atg gcc cag agc      576
Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Ser
180 185 190
cgc atg atc cca ggt ttt gaa gat ggt atc gtt ggg cac aaa gcc ggt      624
Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Val Gly His Lys Ala Gly
195 200 205

```

ES 2 611 015 T3

| | |
|---|------|
| gaa gaa ttc act atc aac qtg aal ttc cca gaa qac lac cac gct gaa | 672 |
| Glu Glu Phe Thr Ile Asn Val Asn Phe Pro Glu Asp Tyr His Ala Glu | |
| 210 215 220 | |
| | |
| aat ctg aaa gga aaa gcg gcl cag ttc gtl atc gtc ctg aag aaa gtl | 720 |
| Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Gln Phe Val Ile Val Leu Lys Lys Val | |
| 225 230 235 240 | |
| | |
| gaa gag cgt gag ctg cct gaa ctg act gaa gaa ttc atc aaa cgt ttc | 768 |
| Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe | |
| 245 250 255 | |
| | |
| ggc qtg gct gal gcl tct cag gaa gcl ctg cgl gcl gaa gtc cgl aaa | 816 |
| Gly Val Ala Asp Gly Ser Gln Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys | |
| 260 265 270 | |
| | |
| aat atg gaa cgt gag ctg aaa ggc gcg gtg cgt aac cgt gtg aaa act | 864 |
| Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Gly Ala Val Arg Asn Arg Val Lys Thr | |
| 275 280 285 | |
| | |
| cag gtl ctg gal gca ctg atc aac gcc aac qac atc gaa qtg cca gtl | 912 |
| Gln Val Leu Asp Gly Leu Ile Asn Ala Asn Asp Ile Glu Val Pro Val | |
| 290 295 300 | |
| | |
| gca ctg atc gat gcc gaa atc gat gtt ctg cgc cgt cag gct gca cag | 960 |
| Ala Leu Ile Asp Gly Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln | |
| 305 310 315 320 | |
| | |
| cgt lll ggt gcc aac gag aag caa gcg ctg gaa lla ccg cgl gaa ctg | 1008 |
| Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu | |
| 325 330 335 | |
| | |
| ttc gaa gag caa gct aaa cgc cgc gtt gtt atc ggt tta ttg ctg gcc | 1056 |
| Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Ile Gly Leu Leu Leu Gly | |
| 340 345 350 | |
| | |
| gaa qtg atc aqc aqc aac gag ctg aaa gcl qac gaa gca cgc gtl aal | 1104 |
| Glu Val Ile Ser Ser Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Ala Arg Val Asn | |
| 355 360 365 | |
| | |
| gta ctg atc gaa gag atg gct tct gct tac gaa gat ccg cag gaa gtt | 1152 |
| Val Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Gln Glu Val | |
| 370 375 380 | |
| | |
| atc gag ttc tac aqc aag aat aaa gag ctg ctg aac aac atg cgt aac | 1200 |
| Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Leu Asn Asn Met Arg Asn | |
| 385 390 395 400 | |
| | |
| gtc gca ctg gaa gag caa gcg gtl gaa act qtg cll gcl aaa ccg aaa | 1248 |
| Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Thr Val Leu Ala Lys Ala Lys | |
| 405 410 415 | |
| | |
| gtc gtt gag aaa tca gta aqc ttc aac gaa ctg atg aat caa acg act | 1296 |
| Val Val Glu Lys Ser Val Ser Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Thr Thr | |
| 420 425 430 | |
| | |
| acg gcg laa | 1305 |
| Thr Ala | |

<210> 6

< 211> 434

5

< 212> PRT

< 213> Erwinia carotovora

<400> 6

ES 2 611 015 T3

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
 1 5 10 15
 Ile Thr Val Ala Ala Asp Ile Ile Glu Ser Ala Val Lys Ser Glu Leu
 20 25 30
 Val Asn Ala Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys
 35 40 45
 Val Pro Met Asn Val Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln
 50 55 60
 Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Gln Arg Asn Phe Val Asp Ala Ile Ile
 65 70 75 80
 Lys Glu Lys Ile Asn Pro Val Gly Ala Pro Asn Tyr Thr Pro Gly Glu
 85 90 95
 Tyr Ala Val Gly Gly Asp Phe Thr Tyr Thr Val Glu Phe Asp Val Tyr
 100 105 110
 Pro Glu Val Glu Leu Lys Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro
 115 120 125
 Val Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Thr Met Leu Asp Thr Leu
 130 135 140
 Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Thr Asp Arg Ala Ala Thr Ala
 145 150 155 160
 Glu Asp Arg Ala Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Ile Asp Gly Glu Val
 165 170 175
 Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Ser
 180 185 190
 Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Val Gly His Lys Ala Gly
 195 200 205
 Glu Glu Phe Thr Ile Asn Val Asn Phe Pro Glu Asp Tyr His Ala Glu
 210 215 220
 Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Gln Phe Val Ile Val Leu Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Glu Glu Phe Ile Lys Arg Phe
 245 250 255
 Gly Val Ala Asp Gly Ser Gln Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys
 260 265 270
 Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Gly Ala Val Arg Asn Arg Val Lys Thr
 275 280 285
 Gln Val Leu Asp Gly Leu Ile Asn Ala Asn Asp Ile Glu Val Pro Val
 290 295 300
 Ala Leu Ile Asp Gly Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln
 305 310 315 320

ES 2 611 015 T3

Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu
 325 330 335

Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Ile Gly Leu Leu Leu Gly
 340 345 350

Glu Val Ile Ser Ser Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Ala Arg Val Asn
 355 360 365

Val Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Gln Glu Val
 370 375 380

Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Leu Asn Asn Met Arg Asn
 385 390 395 400

Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Thr Val Leu Ala Lys Ala Lys
 405 410 415

Val Val Glu Lys Ser Val Ser Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Thr Thr
 420 425 430

Thr Ala

<210> 7

< 211> 2463

< 212> DNA

5 < 213> Escherichia coli

<220>

< 221> CDS

< 222> (1)..(2463)

< 223> Región codificante thrA

10 <400> 7

| | | |
|--|---|-----|
| | atg cga gtg ttg aag ttc ggc ggt aca tca ggg gca aat gca gaa cgt Met Arg Val Leu Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Ala Glu Arg 1 5 10 15 | 48 |
| | ttt ctg cgt gtt gcc gat att ctg gaa agc aat gcc agg cag ggg cag Phe Leu Arg Val Ala Asp Ile Leu Glu Ser Asn Ala Arg Gln Gly Gln 20 25 30 | 96 |
| | ggg gcc acc gtc ctg tct gcc ccc gcc aaa atc acc aac cac ctg ggg Val Ala Thr Val Leu Ser Ala Pro Ala Lys Ile Thr Asn His Leu Val 35 40 45 | 144 |
| | gcg atg att gaa aaa acc att aqc ggc cag gat gct tta ccc aat atc Ala Met Ile Glu Lys Thr Ile Ser Gly Gln Asp Ala Leu Pro Asn Ile 50 55 60 | 192 |

ES 2 611 015 T3

| | |
|---|------|
| agc gat gcc gaa cgt att tta gcc gaa ctt ttg acg gga ctc gcc gcc Ser Asp Ala Glu Arg Ile Phe Ala Glu Leu Leu Thr Gly Leu Ala Ala 65 70 75 80 | 240 |
| gcc cag ccg ggg ttc ccg ctg gcg caa ttg aaa act ttc gtc gat cag Ala Gln Pro Gly Phe Pro Leu Ala Gln Leu Lys Thr Phe Val Asp Gln 85 90 95 | 288 |
| gaa ttt gcc caa ata aaa caa gtc ctg cat gcc att agt ttg ttg ggg Glu Phe Ala Gln Ile Lys His Val Leu His Gly Ile Ser Leu Leu Gly 100 105 110 | 336 |
| cag tgc ccg gat agc atc aac gct gcg ctg att tgc cgt gcc gag aaa Gln Cys Pro Asp Ser Ile Asn Ala Ala Leu Ile Cys Arg Gly Glu Lys 115 120 125 | 384 |
| atg tcc atc gcc att atg gcc gcg gta tta gaa gcg cgc ggt cac aac Met Ser Ile Ala Ile Met Ala Gly Val Leu Glu Ala Arg Gly His Asn 130 135 140 | 432 |
| ggt act ggt atc gat ccg gtc gaa aaa ctg ctg gca gtc ggg cat tac Val Thr Val Ile Asp Pro Val Glu Lys Leu Leu Ala Val Gly His Tyr 145 150 155 160 | 480 |
| ctc gaa tct acc gtc gat att gct gag tcc acc cgc cgt att gcc gca Leu Glu Ser Thr Val Asp Ile Ala Glu Ser Thr Arg Arg Ile Ala Ala 165 170 175 | 528 |
| agc cgc att ccg gct gat cac atg gtg ctg atg gca ggt ttc acc gcc Ser Arg Ile Pro Ala Asp His Met Val Leu Met Ala Gly Phe Thr Ala 180 185 190 | 576 |
| ggt aal qaa aaa cgc gaa ctg qlg qlg cll gga cgc aac ggt tcc qac Gly Asn Glu Lys Gly Glu Leu Val Val Leu Gly Arg Asn Gly Ser Asp 195 200 205 | 624 |
| tac tct gct ccg glg ctg gct gcc tgt tta cgc gcc gat tct tgc gag Tyr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ala Asp Cys Cys Glu 210 215 220 | 672 |
| att tgg acg qac gtt qac ggg qlc tal acc tcc qac ccg cgt caq qlg Ile Trp Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Thr Cys Asp Pro Arg Gln Val 225 230 235 240 | 720 |
| ccc qal ccg acg tlg tlg aag tcc atg tcc tac caq qaa ccg atg gag Pro Asp Ala Arg Leu Leu Lys Ser Met Ser Tyr Gln Glu Ala Met Glu 245 250 255 | 768 |
| ctt tcc tac ttc gcc gct aaa gtt ctt cac ccc cgc acc att acc ccc Leu Ser Tyr Phe Gly Ala Lys Val Leu His Pro Arg Thr Ile Thr Pro 260 265 270 | 816 |
| atc gcc cag ttc caq atc cct tgc ctg att aaa aal acc gga aal cct Ile Ala Gln Phe Gln Ile Pro Cys Leu Ile Lys Asn Thr Gly Asn Pro 275 280 285 | 864 |
| caa gca cca ggt acg ctc att ggt gcc agc cgt gat gaa qac gaa tta Gln Ala Pro Gly Thr Leu Ile Gly Ala Ser Arg Asp Glu Asp Glu Leu 290 295 300 | 912 |
| ccg gtc aag gcc att tcc aat ctg aat aac atg gca atg ttc aqc gtt Pro Val Lys Gly Ile Ser Asn Leu Asn Asn Met Ala Met Phe Ser Val 305 310 315 320 | 960 |
| tct ggt ccg ggg atg aaa ggg atg gtc gcc atg gcg gcg cgc gtc ttt Ser Gly Pro Gly Met Lys Gly Met Val Gly Met Ala Ala Arg Val Phe 325 330 335 | 1008 |
| gca gcg atg tca cgc gcc cgt att tcc gtg gtc ctg att acg caa tca | 1056 |

ES 2 611 015 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|--|
| Ala | Ala | Met | Ser | Arg | Ala | Arg | Ile | Ser | Val | Val | Leu | Ile | Thr | Gln | Ser | | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| Ucl | Ucc | qaa | lac | aqc | alc | aqi | Ulc | Ugc | qUc | cca | caa | aqc | qac | Ugt | glg | 1104 | |
| Ser | Ser | Glu | Tyr | Ser | Ile | Ser | Phe | Cys | Val | Pro | Gln | Ser | Asp | Cys | Val | | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | | |
| cga | gcl | gaa | cgg | gca | alg | cag | gaa | gag | Ulc | lac | clg | gaa | clg | aaa | gaa | 1152 | |
| Arg | Ala | Glu | Arg | Ala | Met | Gln | Glu | Glu | Phe | Tyr | Leu | Glu | Leu | Lys | Glu | | |
| | | 370 | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | | |
| ggc | tta | ctg | gag | ccg | ctg | gca | gtg | acg | gaa | cgg | ctg | gcc | att | atc | ccg | 1200 | |
| Gly | Leu | Leu | Glu | Pro | | Ala | Val | Thr | Glu | Arg | Leu | Ala | Ile | Ile | Ser | | |
| | | 385 | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | | |
| gug | gaa | ggc | gal | ggc | alg | cgc | acc | Ulg | cgl | ggg | alc | Ucg | cgg | aaa | Ulc | 1248 | |
| Val | Val | Gly | Asp | Gly | Met | Arg | Thr | Leu | Arg | Gly | Ile | Ser | Ala | Lys | Phe | | |
| | | | 405 | | | | | 410 | | | | | | 415 | | | |
| ttt | gcc | gca | ctg | gcc | cgc | gcc | aat | atc | aac | att | gtc | gcc | att | gct | cag | 1296 | |
| Phe | Ala | Ala | Leu | Ala | Arg | Ala | Asn | Ile | Asn | Ile | Val | Ala | Ile | Ala | Gln | | |
| | | | 420 | | | | 425 | | | | | 430 | | | | | |
| gga | tct | tct | gaa | cgc | tca | atc | tct | gtc | gtg | gta | aat | aac | gat | gat | cgc | 1344 | |
| Gly | Ser | Ser | Glu | Arg | Ser | Ile | Ser | Val | Val | Val | Asn | Asn | Asp | Asp | Ala | | |
| | | | 435 | | | | 440 | | | | | 445 | | | | | |
| acc | act | ggc | gtg | cgc | gtc | act | cat | cag | atg | ctg | ttc | aat | acc | gat | cag | 1392 | |
| Thr | Thr | Gly | Val | Arg | Val | Thr | His | Gln | Met | Leu | Phe | Asn | Thr | Asp | Gln | | |
| | | 450 | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | | |
| gtt | atc | gaa | gtg | ttc | gtg | att | ggc | gtc | ggt | ggc | gtt | ggc | ggc | gcg | ctg | 1440 | |
| Val | Ile | Glu | Val | Phe | Val | Ile | Gly | Val | Gly | Gly | Val | Gly | Gly | Ala | Leu | | |
| | | 465 | | | 470 | | | | 475 | | | | | | 480 | | |
| ctg | gag | caa | ctg | aag | cgt | cag | caa | agc | tgg | ctg | aag | aat | aaa | cat | atc | 1488 | |
| Leu | Glu | Gln | Leu | Lys | Arg | Gln | Gln | Ser | Trp | Leu | Lys | Asn | Lys | His | Ile | | |
| | | | 485 | | | | | 490 | | | | | | 495 | | | |
| gac | tta | cgt | gic | Ugc | ggc | gUc | gcc | aac | Ucg | aag | gcl | ctg | clc | acc | aat | 1536 | |
| Asp | Leu | Arg | Val | Cys | Gly | Val | Ala | Asn | Ser | Lys | Ala | Leu | Leu | Thr | Asn | | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | | |
| gta | cat | ggc | ctt | aat | ctg | gaa | aac | Ugg | cag | gaa | gaa | ctg | cgc | caa | gcc | 1584 | |
| Val | His | Gly | Leu | Asn | Leu | Glu | Asn | Trp | Gln | Glu | Glu | Leu | Ala | Gln | Ala | | |
| | | | 515 | | | | 520 | | | | | 525 | | | | | |
| aaa | qag | ccg | Ull | aat | clc | ggg | cgc | Uta | all | cgc | clc | gtg | aaa | gaa | Uat | 1632 | |
| Lys | Glu | Pro | Phe | Asn | Leu | Gly | Arg | Leu | Ile | Arg | Leu | Val | Lys | Glu | Tyr | | |
| | | 530 | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | | |
| cal | ctg | ctg | aac | ccg | gUc | all | gUc | gac | Ugc | act | Ucc | agc | cag | gca | glg | 1680 | |
| His | Leu | Leu | Asn | Pro | Val | Ile | Val | Asp | Cys | Thr | Ser | Ser | Gln | Ala | Val | | |
| | | | 545 | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | | |
| gcq | gal | caa | Uat | gcc | qac | Ulc | clg | cgc | gaa | gcl | Ulc | caac | gUc | gUc | acg | 1728 | |
| Ala | Asp | Gln | Tyr | Ala | Asp | Phe | Leu | Arg | Glu | Gly | Phe | His | Val | Val | Thr | | |
| | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | | | |
| ccq | aac | aaa | aag | gcc | aac | acc | Ucg | Ucg | alg | gal | lac | lac | cat | cag | Ulg | 1776 | |
| Pro | Asn | Lys | Lys | Ala | Asn | Thr | Ser | Ser | Met | Asp | Tyr | Tyr | His | Gln | Leu | | |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | | |
| cgt | tat | gcg | gcg | gaa | aaa | Ucg | cgc | cgt | aaa | tUc | ctc | tat | qac | acc | aac | 1824 | |
| Arg | Tyr | Ala | Ala | Glu | Lys | Ser | Arg | Arg | Lys | Phe | Leu | Tyr | Asp | Thr | Asn | | |
| | | 595 | | | | 600 | | | | | | 605 | | | | | |
| gUc | ggg | gcl | gga | Uta | ccg | gUc | all | gag | aac | clg | caa | aal | clg | clc | aal | 1872 | |
| Val | Gly | Ala | Gly | Leu | Pro | Val | Ile | Glu | Asn | Leu | Gln | Asn | Leu | Leu | Asn | | |

ES 2 611 015 T3

```

        610                615                620
gca ggt gat gaa ttg atg aag ttc tcc ggc att ctt tct ggt tgg ctt    1920
Ala Gly Asp Glu Leu Met Lys Phe Ser Gly Ile Leu Ser Gly Ser Leu
625                630                635                640

ccg lal alc ltc gcc aag lla gac gaa gcc atg aql ltc lcc gaq gcc    1968
Ser Tyr Ile Phe Gly Lys Leu Asp Glu Gly Met Ser Phe Ser Glu Ala
645                650                655

acc acg ctg gcg cgg gaa atg ggt tat acc gaa ccg gac ccg cga gat    2016
Thr Thr Leu Ala Arg Glu Met Gly Tyr Thr Glu Pro Asp Pro Arg Asp
660                665                670

gat cll lcl gcl atg gat glg gcc cgl aaa cta llg all ctc gcl cgl    2064
Asp Leu Ser Gly Met Asp Val Ala Arg Lys Leu Leu Ile Leu Ala Arg
675                680                685

gaa acg gga cgt gaa ctg gag ctg gcc gat att gaa att gaa cct gtg    2112
Glu Thr Gly Arg Glu Leu Glu Leu Ala Asp Ile Glu Ile Glu Pro Val
690                695                700

ctg ccc gca gag lcl aac gcc gag gcl gal gll gcc gcl lcl atg gcc    2160
Leu Pro Ala Glu Phe Asn Ala Glu Gly Asp Val Ala Ala Phe Met Ala
705                710                715                720

aat ctg tca caa ctc gac gat ctc ttt gcc gcg ccg gcg gcg aag gcc    2208
Asn Leu Ser Gln Leu Asp Asp Leu Phe Ala Ala Arg Val Ala Lys Ala
725                730                735

cgt gat gaa gga aaa gtc ttg cgc tat gtt gcc aat att gat gaa gat    2256
Arg Asp Glu Gly Lys Val Leu Arg Tyr Val Gly Asn Ile Asp Glu Asp
740                745                750

ggc gtc tgc ccg gtg aag att gcc gaa gtg gat ggt aat gat ccg ctg    2304
Gly Val Cys Arg Val Lys Ile Ala Glu Val Asp Gly Asn Asp Pro Leu
755                760                765

ttc aaa gtg aaa aat gcc gaa aac gcc ctg gcc ttc tat agc cac tat    2352
Phe Lys Val Lys Asn Gly Glu Asn Ala Leu Ala Phe Tyr Ser His Tyr
770                775                780

tat cag ccg ctg ccg ttg gta ctg ccg gga tat ggt gcg gcc aat gac    2400
Tyr Gln Pro Leu Pro Leu Val Leu Arg Gly Tyr Gly Ala Gly Asn Asp
785                790                795                800

glt aca gcl gcc gcl glc lll gcl gal ctg cta cgl acc ctc tca tgg    2448
Val Thr Ala Ala Gly Val Phe Ala Asp Leu Leu Arg Thr Leu Ser Trp
805                810                815

aag tta gga gtc tga
Lys Leu Gly Val
820

```

<210> 8

< 211> 820

< 212> PRT

5

< 213> Escherichia coli

<400> 8

```

Met Arg Val Leu Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Ala Glu Arg
1                5                10                15

Phe Leu Arg Val Ala Asp Ile Leu Glu Ser Asn Ala Arg Gln Gly Gln
20                25                30

```

ES 2 611 015 T3

Val Ala Thr Val Leu Ser Ala Pro Ala Lys Ile Thr Asn His Leu Val
 35 40 45

Ala Met Ile Glu Lys Thr Ile Ser Gly Gln Asp Ala Leu Pro Asn Ile
 50 55 60

Ser Asp Ala Glu Arg Ile Phe Ala Glu Leu Leu Thr Gly Leu Ala Ala
 65 70 75 80

Ala Gln Pro Gly Phe Pro Leu Ala Gln Leu Lys Thr Phe Val Asp Gln
 85 90 95

Glu Phe Ala Gln Ile Lys His Val Leu His Gly Ile Ser Leu Leu Gly
 100 105 110

Gln Cys Pro Asp Ser Ile Asn Ala Ala Leu Ile Cys Arg Gly Glu Lys
 115 120 125

Met Ser Ile Ala Ile Met Ala Gly Val Leu Glu Ala Arg Gly His Asn
 130 135 140

Val Thr Val Ile Asp Pro Val Glu Lys Leu Leu Ala Val Gly His Tyr
 145 150 155 160

Leu Glu Ser Thr Val Asp Ile Ala Glu Ser Thr Arg Arg Ile Ala Ala
 165 170 175

Ser Arg Ile Pro Ala Asp His Met Val Leu Met Ala Gly Phe Thr Ala
 180 185 190

Gly Asn Glu Lys Gly Glu Leu Val Val Leu Gly Arg Asn Gly Ser Asp
 195 200 205

Tyr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ala Asp Cys Cys Glu
 210 215 220

Ile Trp Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Cys Asp Pro Arg Gln Val
 225 230 235 240

Pro Asp Ala Arg Leu Leu Lys Ser Met Ser Tyr Gln Glu Ala Met Glu
 245 250 255

Leu Ser Tyr Phe Gly Ala Lys Val Leu His Pro Arg Tar Ile Thr Pro
 260 265 270

Ile Ala Gln Phe Gln Ile Pro Cys Leu Ile Lys Asn Thr Gly Asn Pro
 275 280 285

Gln Ala Pro Gly Thr Leu Ile Gly Ala Ser Arg Asp Glu Asp Glu Leu
 290 295 300

ES 2 611 015 T3

Pro Val Lys Gly Ile Ser Asn Leu Asn Asn Met Ala Met Phe Ser Val
 305 310 315 320

Ser Gly Pro Gly Met Lys Gly Met Val Gly Met Ala Ala Arg Val Phe
 325 330 335

Ala Ala Met Ser Arg Ala Arg Ile Ser Val Val Leu Ile Thr Gln Ser
 340 345 350

Ser Ser Glu Tyr Ser Ile Ser Phe Cys Val Pro Gln Ser Asp Cys Val
 355 360 365

Arg Ala Glu Arg Ala Met Gln Glu Glu Phe Tyr Leu Glu Leu Lys Glu
 370 375 380

Gly Leu Leu Glu Pro Leu Ala Val Thr Glu Arg Leu Ala Ile Ile Ser
 385 390 395 400

Val Val Gly Asp Gly Met Arg Thr Leu Arg Gly Ile Ser Ala Lys Phe
 405 410 415

Phe Ala Ala Leu Ala Arg Ala Asn Ile Asn Ile Val Ala Ile Ala Gln
 420 425 430

Gly Ser Ser Glu Arg Ser Ile Ser Val Val Val Asn Asn Asp Asp Ala
 435 440 445

Thr Thr Gly Val Arg Val Thr His Gln Met Leu Phe Asn Thr Asp Gln
 450 455 460

Val Ile Glu Val Phe Val Ile Gly Val Gly Gly Val Gly Gly Ala Leu
 465 470 475 480

Leu Glu Gln Leu Lys Arg Gln Gln Ser Trp Leu Lys Asn Lys His Ile
 485 490 495

Asp Leu Arg Val Cys Gly Val Ala Asn Ser Lys Ala Leu Leu Thr Asn
 500 505 510

Val His Gly Leu Asn Leu Glu Asn Trp Gln Glu Glu Leu Ala Gln Ala
 515 520 525

Lys Glu Pro Phe Asn Leu Gly Arg Leu Ile Arg Leu Val Lys Glu Tyr
 530 535 540

His Leu Leu Asn Pro Val Ile Val Asp Cys Thr Ser Ser Gln Ala Val
 545 550 555 560

Ala Asp Gln Tyr Ala Asp Phe Leu Arg Glu Gly Phe His Val Val Thr
 565 570 575

Pro Asn Lys Lys Ala Asn Thr Ser Ser Met Asp Tyr Tyr His Gln Leu

ES 2 611 015 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| cct | ccc | cat | ctc | ggc | gcc | aaa | glg | tla | cac | ccc | cgc | acc | alc | acc | ccg | 816 |
| Leu | Ser | Tyr | Phe | Gly | Ala | Lys | Val | Leu | His | Pro | Arg | Thr | Ile | Thr | Pro | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| att | gcc | cag | ctt | caa | alc | ccl | lgc | clg | all | aaa | aac | acc | lcc | aac | ccg | 864 |
| Ile | Ala | Gln | Phe | Gln | Ile | Pro | Cys | Leu | Ile | Lys | Asn | Thr | Ser | Asn | Pro | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cag | gcc | ccc | ggc | acg | clg | alc | ggc | aaa | gac | agc | acc | gat | gcc | gal | atg | 912 |
| Gln | Ala | Pro | Gly | Thr | Leu | Ile | Gly | Lys | Asp | Ser | Thr | Asp | Ala | Asp | Met | |
| | 290 | | | | 295 | | | | | | 300 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ccg | gtg | aag | ggc | atc | acc | aac | ctg | aac | aac | atg | ggg | atg | atc | aac | gtc | 960 |
| Pro | Val | Lys | Gly | Ile | Thr | Asn | Leu | Asn | Asn | Met | Ala | Met | Ile | Asn | Val | |
| 305 | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ccc | ggc | ccg | ggc | atg | aaa | ggc | atg | gtc | ggc | atg | ggc | gca | ccg | gtc | ttc | 1008 |
| Ser | Gly | Pro | Gly | Met | Lys | Gly | Met | Val | Gly | Met | Ala | Ala | Arg | Val | Phe | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gcc | gtg | atg | ccg | ggc | ggc | att | ccg | gtg | gtg | ctg | atc | acc | caa | ttc | 1056 | |
| Ala | Val | Met | Ser | Arg | Ala | Gly | Ile | Ser | Val | Val | Leu | Ile | Thr | Gln | Ser | |
| | | | 340 | | | | 345 | | | | | 350 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ccc | ccc | gaa | tac | agc | atc | agc | ttc | ccg | gtg | ccg | cag | ggc | gaa | ctg | cag | 1104 |
| Ser | Ser | Glu | Tyr | Ser | Ile | Ser | Phe | Cys | Val | Pro | Gln | Gly | Glu | Leu | Gln | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| cgc | gcc | ccg | cgc | ggg | ctg | gaa | gag | gag | ttc | tat | ctg | gag | ctg | aaa | gac | 1152 |
| Arg | Ala | Arg | Arg | Ala | Leu | Glu | Glu | Glu | Phe | Tyr | Leu | Glu | Leu | Lys | Asp | |
| | 370 | | | 375 | | | | | | | 380 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ggc | glg | clg | gal | ccg | clg | gac | glg | alg | gaa | cgc | clg | ggg | atc | atc | lcc | 1200 |
| Gly | Val | Leu | Asp | Pro | Leu | Asp | Val | Met | Glu | Arg | Leu | Ala | Ile | Ile | Ser | |
| 385 | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | | 400 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gtg | ggt | ggc | gac | ggc | atg | ggc | acc | ctg | cgc | ggc | att | ccc | gca | cgc | ttc | 1248 |
| Val | Val | Gly | Asp | Gly | Met | Arg | Thr | Leu | Arg | Gly | Ile | Ser | Ala | Arg | Phe | |
| | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ttc | ccc | ccg | ctg | ggg | cgc | ggc | aac | atc | aac | atc | gtc | ggc | atc | ggc | caa | 1296 |
| Phe | Ser | Ala | Leu | Ala | Arg | Ala | Asn | Ile | Asn | Ile | Val | Ala | Ile | Ala | Gln | |
| | | | 420 | | | | 425 | | | | | 430 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ggg | lcl | lcc | gaa | cgt | lcc | all | lcc | glg | glg | glc | agc | aat | gat | lcc | ggc | 1344 |
| Gly | Ser | Ser | Glu | Arg | Ser | Ile | Ser | Val | Val | Val | Ser | Asn | Asp | Ser | Ala | |
| | | 435 | | | | 440 | | | | | | 445 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| acc | acc | ggc | gtg | cgc | gtc | agc | cac | cag | atg | ctg | ttc | aac | acc | gat | cag | 1392 |
| Thr | Thr | Gly | Val | Arg | Val | Ser | His | Gln | Met | Leu | Phe | Asn | Thr | Asp | Gln | |
| | 450 | | | | 455 | | | | | | 460 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gtg | atc | gaa | gtg | ttc | gtc | atc | ggc | gtc | ggc | ggc | gtc | ggc | ggg | ggg | ctg | 1440 |
| Val | Ile | Glu | Val | Phe | Val | Ile | Gly | Val | Gly | Gly | Val | Gly | Gly | Ala | Leu | |
| 465 | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | | 480 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| atc | gag | cag | atc | tat | cgc | cag | cag | ccg | ccg | ctg | aaq | caa | aaa | cat | atc | 1488 |
| Ile | Glu | Gln | Ile | Tyr | Arg | Gln | Gln | Pro | Trp | Leu | Lys | Gln | Lys | His | Ile | |
| | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gat | ctg | cgg | gtg | tgc | ggc | atc | ggc | aac | ccg | cgc | gtg | atg | ctg | acc | aat | 1536 |
| Asp | Leu | Arg | Val | Cys | Gly | Ile | Ala | Asn | Ser | Arg | Val | Met | Leu | Thr | Asn | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| gtg | cac | ggc | atc | ggg | ctg | gac | agc | ccg | cgc | gac | ggg | ctg | ggc | ggc | ggg | 1584 |
| Val | His | Gly | Ile | Ala | Leu | Asp | Ser | Trp | Arg | Asp | Ala | Leu | Ala | Gly | Ala | |
| | | 515 | | | | 520 | | | | | | 525 | | | | |

ES 2 611 015 T3

cag gag ccg ttc aat ctc ggc cgt ctg atc cgg ctg gtg aag gaa tat 1632
 Gln Glu Pro Phe Asn Leu Gly Arg Leu Ile Arg Leu Val Lys Glu Tyr
 530 535 540

cac ctg ctg aac ccg gtg atc gtc gac tgt acc tcc agt cag gcg gcg 1680
 His Leu Leu Asn Pro Val Ile Val Asp Cys Thr Ser Ser Gln Ala Val
 545 550 555 560

gcc gat cag tac gtg gac ttc ctg gcg gac gcc ttc cat gtg gtg acg 1728
 Ala Asp Gln Tyr Val Asp Phe Leu Ala Asp Gly Phe His Val Val Thr
 565 570 575

ccg aac aaa aag gcc aac acc tcc tcc atg aac tat tat cag caa ctg 1776
 Pro Asn Lys Lys Ala Asn Thr Ser Ser Met Asn Tyr Tyr Gln Gln Leu
 580 585 590

cgc gcg gcc gcc gcc ggt tcc cat cgc aag ttc ctg tac gac acc aac 1824
 Arg Ala Ala Ala Ala Gly Ser His Arg Lys Phe Leu Tyr Asp Thr Asn
 595 600 605

gtc ggt gcc ggt ctg ccg gtg att gag aac ctg caa aac ctg ctg aac 1872
 Val Gly Ala Gly Leu Pro Val Ile Glu Asn Leu Gln Asn Leu Leu Asn
 610 615 620

gcc ggt gal gaa ctg gla cgt ttc tcc ggt atc ctg tcc gcc tcc ctg 1920
 Ala Gly Asp Glu Leu Val Arg Phe Ser Gly Ile Leu Ser Ser Gly Ser Leu
 625 630 635 640

tcc ttt atc ttc gcc aag ctg gac gaa ggg ctg tcc ctg tcc gcc gcg 1968
 Ser Phe Ile Phe Gly Lys Leu Asp Glu Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ala
 645 650 655

acc ctg cag gcc ccg gcc aac gcc lac acc gag ccg gal ccg cgc gac 2016
 Thr Leu Gln Ala Arg Ala Asn Gly Tyr Thr Glu Pro Asp Pro Arg Asp
 660 665 670

gal ctg tcc ggg alg gal glg gcg cgt aag ctg ctg atc ctg gcg cgc 2064
 Asp Leu Ser Gly Met Asp Val Ala Arg Lys Leu Leu Ile Leu Ala Arg
 675 680 685

gag gcc ggt lac aaa ctg gaa ctg agc gal atc gag glc gag ccg glg 2112
 Glu Ala Gly Tyr Lys Leu Glu Leu Ser Asp Ile Glu Val Glu Pro Val
 690 695 700

ctg ccg ccg tcc ttc gac gcg tcc gcc gac glg gac acc ttc ctg ccg 2160
 Leu Pro Pro Ser Phe Asp Ala Ser Gly Asp Val Asp Thr Phe Leu Ala
 705 710 715 720

ccg ttg ccg gag ctg gat aaa gag ttc ccg cgc aac gtg gct aac gcc 2208
 Arg Leu Pro Glu Leu Asp Lys Glu Phe Ala Arg Asn Val Ala Asn Ala
 725 730 735

gcc gag caa gcc aag glc ctg cgc tal glc gcc ctg atc gac gaa gcg 2256
 Ala Glu Gln Gly Lys Val Leu Arg Tyr Val Gly Leu Ile Asp Glu Gly
 740 745 750

cgc tgc aag gtc cgc att gag gcg gtg gac gcc aac gat ccg tcc tat 2304
 Arg Cys Lys Val Arg Ile Glu Ala Val Asp Gly Asn Asp Pro Leu Tyr
 755 760 765

aaa gtc aag aac gcc gag aac gcg ctg gcc ttc lac agc cgc tac tal 2352
 Lys Val Lys Asn Gly Glu Asn Ala Leu Ala Phe Tyr Ser Arg Tyr Tyr
 770 775 780

cag ccg ttg ccg ctg gtg ctg ccg gcc tac gcc gcc ggt aac gat gtc 2400
 Gln Pro Leu Pro Leu Val Leu Arg Gly Tyr Gly Ala Gly Asn Asp Val
 785 790 795 800

act gca gcg gcc eta ttc gcc gat ctg ctg cgc aca ctg tca tcc aag 2448
 Thr Ala Ala Gly Val Phe Ala Asp Leu Leu Arg Thr Leu Ser Trp Lys
 805 810 815

ttg gga gct taa 2460
 Leu Gly Val

<210> 10

5

<211> 819

ES 2 611 015 T3

< 212> PRT

< 213> *Serratia marcescens*

<400> 10

```

Met Arg Val Leu Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Ala Glu Arg
1          5          10          15

Phe Leu Arg Val Ala Asp Ile Met Glu Ser Asn Ala Arg Gln Gly Gln
20          25          30

Val Ala Thr Val Leu Ser Ala Pro Ala Lys Ile Thr Asn His Leu Val
35          40          45

Ala Met Ile Asp Lys Thr Val Ala Gly Gln Asp Ile Leu Pro Asn Met
50          55          60

Ser Asp Ala Glu Arg Ile Phe Ala Asp Leu Leu Ser Gly Leu Ala Gln
65          70          75          80

Ala Leu Pro Gly Phe Glu Tyr Asp Arg Leu Lys Gly Val Val Asp Gln
85          90          95

Glu Phe Ala Gln Leu Lys Gln Val Leu His Gly Val Ser Leu Leu Gly
100         105         110

Gln Cys Pro Asp Ser Val Asn Ala Ala Ile Ile Cys Arg Gly Glu Lys
115         120         125

Leu Ser Ile Ala Ile Met Glu Gly Val Phe Arg Ala Lys Gly Tyr Pro
130         135         140

Val Thr Val Ile Asn Pro Val Glu Lys Leu Leu Ala Gln Gly His Tyr
145         150         155         160

Leu Glu Ser Thr Val Asp Ile Ala Glu Ser Thr Leu Arg Ile Ala Ala
165         170         175

Ala Ala Ile Pro Ala Asp His Ile Val Leu Met Ala Gly Phe Thr Ala
180         185         190

Gly Asn Asp Lys Gly Glu Leu Val Val Leu Gly Arg Asn Gly Ser Asp
195         200         205

Tyr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Cys Leu Arg Ala Asp Cys Cys Glu
210         215         220

```

5

ES 2 611 015 T3

Ile Trp Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Cys Asp Pro Arg Thr Val
 225 230 235 240

Pro Asp Ala Arg Leu Leu Lys Ser Met Ser Tyr Gln Glu Ala Met Glu
 245 250 255

Leu Ser Tyr Phe Gly Ala Lys Val Leu His Pro Arg Thr Ile Thr Pro
 260 265 270

Ile Ala Gln Phe Gln Ile Pro Cys Leu Ile Lys Asn Thr Ser Asn Pro
 275 280 285

Gln Ala Pro Gly Thr Leu Ile Gly Lys Asp Ser Thr Asp Ala Asp Met
 290 295 300

Pro Val Lys Gly Ile Thr Asn Leu Asn Asn Met Ala Met Ile Asn Val
 305 310 315 320

Ser Gly Pro Gly Met Lys Gly Met Val Gly Met Ala Ala Arg Val Phe
 325 330 335

Ala Val Met Ser Arg Ala Gly Ile Ser Val Val Leu Ile Thr Gln Ser
 340 345 350

Ser Ser Glu Tyr Ser Ile Ser Phe Cys Val Pro Gln Gly Glu Leu Gln
 355 360 365

Arg Ala Arg Arg Ala Leu Glu Glu Glu Phe Tyr Leu Glu Leu Lys Asp
 370 375 380

Gly Val Leu Asp Pro Leu Asp Val Met Glu Arg Leu Ala Ile Ile Ser
 385 390 395 400

Val Val Gly Asp Gly Met Arg Thr Leu Arg Gly Ile Ser Ala Arg Phe
 405 410 415

Phe Ser Ala Leu Ala Arg Ala Asn Ile Asn Ile Val Ala Ile Ala Gln
 420 425 430

Gly Ser Ser Glu Arg Ser Ile Ser Val Val Val Ser Asn Asp Ser Ala
 435 440 445

Thr Thr Gly Val Arg Val Ser His Gln Met Leu Phe Asn Thr Asp Gln
 450 455 460

Val Ile Glu Val Phe Val Ile Gly Val Gly Val Gly Gly Ala Leu
 465 470 475 480

Ile Glu Gln Ile Tyr Arg Gln Gln Pro Trp Leu Lys Gln Lys His Ile
 485 490 495

ES 2 611 015 T3

Asp Leu Arg Val Cys Gly Ile Ala Asn Ser Arg Val Met Leu Thr Asn
 500 505 510
 Val His Gly Ile Ala Leu Asp Ser Trp Arg Asp Ala Leu Ala Gly Ala
 515 520 525
 Gln Glu Pro Phe Asn Leu Gly Arg Leu Ile Arg Leu Val Lys Glu Tyr
 530 535 540
 His Leu Leu Asn Pro Val Ile Val Asp Cys Thr Ser Ser Gln Ala Val
 545 550 555 560
 Ala Asp Gln Tyr Val Asp Phe Leu Ala Asp Gly Phe His Val Val Thr
 565 570 575
 Pro Asn Lys Lys Ala Asn Thr Ser Ser Met Asn Tyr Tyr Gln Gln Leu
 580 585 590
 Arg Ala Ala Ala Ala Gly Ser His Arg Lys Phe Leu Tyr Asp Thr Asn
 595 600 605
 Val Gly Ala Gly Leu Pro Val Ile Glu Asn Leu Gln Asn Leu Leu Asn
 610 615 620
 Ala Gly Asp Glu Leu Val Arg Phe Ser Gly Ile Leu Ser Gly Ser Leu
 625 630 635 640
 Ser Phe Ile Phe Gly Lys Leu Asp Glu Gly Leu Ser Leu Ser Ala Ala
 645 650 655
 Thr Leu Gln Ala Arg Ala Asn Gly Tyr Thr Glu Pro Asp Pro Arg Asp
 660 665 670
 Asp Leu Ser Gly Met Asp Val Ala Arg Lys Leu Leu Ile Leu Ala Arg
 675 680 685
 Glu Ala Gly Tyr Lys Leu Glu Leu Ser Asp Ile Glu Val Glu Pro Val
 690 695 700
 Leu Pro Pro Ser Phe Asp Ala Ser Gly Asp Val Asp Thr Phe Leu Ala
 705 710 715 720
 Arg Leu Pro Glu Leu Asp Lys Glu Phe Ala Arg Asn Val Ala Asn Ala
 725 730 735
 Ala Glu Gln Gly Lys Val Leu Arg Tyr Val Gly Leu Ile Asp Glu Gly
 740 745 750
 Arg Cys Lys Val Arg Ile Glu Ala Val Asp Gly Asn Asp Pro Leu Tyr
 755 760 765
 Lys Val Lys Asn Gly Glu Asn Ala Leu Ala Phe Tyr Ser Arg Tyr Tyr
 770 775 780
 Gln Pro Leu Pro Leu Val Leu Arg Gly Tyr Gly Ala Gly Asn Asp Val
 785 790 795 800
 Thr Ala Ala Gly Val Phe Ala Asp Leu Leu Arg Thr Leu Ser Trp Lys
 805 810 815
 Leu Gly Val

<210> 11
< 211> 28
< 212> DNA
< 213> Artificial

5 <220>
< 223> Cebador tig-1

<220>
< 221> Presentación miscelánea

< 222> (1)..(28)

10 < 223> Cebador con secuencia de identificación para el enzima de restricción XbaI

<400> 11
gctctagaaa gagttgaccg agcactgt 28

<210> 12
< 211> 28

15 < 212> DNA
< 213> Artificial

<220>
< 223> Cebador tig-2

20 <220>
< 221> Presentación miscelánea

< 222> (1)..(28)

< 223> Cebador con la secuencia de identificación para el enzima de restricción HindIII

<400> 12
gcaagcttat tacgctgct gggtcatc 28

25 <210> 13
< 211> 1355
< 212> DNA
< 213> Escherichia coli

30 <220>
< 221> Enlace de cebador

< 222> (1)..(28)

< 223> Punto de enlace de cebador para tig-1

<220>

< 221> CDS

< 222> (48)..(1346)

5

< 223> Región codificante tig

<220>

< 221> Enlace de cebador

< 222> (1328)..(1355)

< 223> Punto de enlace de cebador para tig-2

10

<400> 13

ES 2 611 015 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|------------|------------|-----------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| gcctcaga | aaa | gagttgaccg | agcactcaga | LLLLLgagg | Laacaag | alg | caa | gll | | 56 | | | | | | |
| | | | | | | Met | Gln | Val | | | | | | | | |
| | | | | | | 1 | | | | | | | | | | |
| cca | gll | gaa | acc | act | caa | ggc | cul | ggc | cgc | cgl | gla | acg | act | alc | 104 | |
| Ser | Val | Glu | Thr | Thr | Gln | Gly | Leu | Gly | Arg | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Ile | |
| | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | | | | |
| gct | gct | gac | agc | atc | gag | acc | gct | ggt | aaa | agc | gag | ctg | gtc | aac | gtt | 152 |
| Ala | Ala | Asp | Ser | Ile | Glu | Thr | Ala | Val | Lys | Ser | Glu | Leu | Val | Asn | Val | |
| | 20 | | | | 25 | | | | 30 | | | | | | 35 | |
| gcg | aaa | aaa | gla | cgl | all | gac | ggc | llc | cgc | aaa | ggc | aaa | qlg | cca | alg | 200 |
| Ala | Lys | Lys | Val | Arg | Ile | Asp | Gly | Phe | Arg | Lys | Gly | Lys | Val | Pro | Met | |
| | | | 40 | | | | | 45 | | | | | | 50 | | |
| aat | atc | gtt | gct | cag | cgt | tat | ggc | ggc | tct | gta | cgc | cag | gac | gtt | ctg | 248 |
| Asn | Ile | Val | Ala | Gln | Arg | Tyr | Gly | Ala | Ser | Val | Arg | Gln | Asp | Val | Leu | |
| | | | 55 | | | | 60 | | | | | | 65 | | | |
| ggt | gac | ctg | alg | agc | cgt | aac | llc | all | gac | ggc | alc | all | aaa | gaa | aaa | 296 |
| Gly | Asp | Leu | Met | Ser | Arg | Asn | Phe | Ile | Asp | Ala | Ile | Ile | Lys | Glu | Lys | |
| | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | | |
| atc | aat | ccg | gct | ggc | gca | ccg | act | tat | ggt | ccg | ggc | gaa | tac | aag | ctg | 344 |
| Ile | Asn | Pro | Ala | Gly | Ala | Pro | Thr | Tyr | Val | Pro | Gly | Glu | Tyr | Lys | Leu | |
| | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | | | |
| ggt | gaa | gac | llc | act | lac | lcl | gla | gag | lll | gaa | gll | lal | ccg | gaa | gll | 392 |
| Gly | Glu | Asp | Phe | Thr | Tyr | Ser | Val | Glu | Phe | Glu | Val | Tyr | Pro | Glu | Val | |
| | 100 | | | | 105 | | | | 110 | | | | | | 115 | |
| gaa | ctg | cag | ggt | ctg | gaa | ggc | atc | gaa | ggt | gaa | aaa | ccg | atc | gtt | gaa | 440 |
| Glu | Leu | Gln | Gly | Leu | Glu | Ala | Ile | Glu | Val | Glu | Lys | Pro | Ile | Val | Glu | |
| | | | 120 | | | | | | 125 | | | | | 130 | | |
| qlg | acc | gac | gct | gac | glt | gac | ggc | alg | ctg | gal | act | ctg | cgl | aaa | caq | 488 |
| Val | Thr | Asp | Ala | Asp | Val | Asp | Gly | Met | Leu | Asp | Thr | Leu | Arg | Lys | Gln | |
| | | | 135 | | | | | 140 | | | | | 145 | | | |
| cag | ggc | acc | ggg | aaa | gaa | aaa | gac | ggc | gcl | gll | gaa | gca | gaa | gac | cgc | 536 |
| Gln | Ala | Thr | Trp | Lys | Glu | Lys | Asp | Gly | Ala | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Arg | |
| | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | | |
| gta | acc | atc | gac | ttc | acc | ggt | tct | gta | gac | ggc | gaa | gag | ttc | gaa | ggc | 584 |
| Val | Thr | Ile | Asp | Phe | Thr | Gly | Ser | Val | Asp | Gly | Glu | Glu | Phe | Glu | Gly | |
| | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | | |
| ggt | aaa | gcg | lcl | gal | llc | gla | ctg | ggc | alg | ggc | caq | ggl | cgl | alg | alc | 632 |
| Gly | Lys | Ala | Ser | Asp | Phe | Val | Leu | Ala | Met | Gly | Gln | Gly | Arg | Met | Ile | |
| | 180 | | | | 185 | | | | 190 | | | | | | 195 | |
| ccg | ggc | ttt | gaa | gac | ggt | atc | aaa | ggc | cac | aaa | got | ggc | gaa | gag | ttc | 680 |
| Pro | Gly | Phe | Glu | Asp | Gly | Ile | Lys | Gly | His | Lys | Ala | Gly | Glu | Glu | Phe | |
| | | | 200 | | | | | 205 | | | | | 210 | | | |
| acc | alc | gac | qlg | acc | llc | ccg | gaa | gaa | lac | cac | qca | gaa | aac | ctg | aaa | 728 |
| Thr | Ile | Asp | Val | Thr | Phe | Pro | Glu | Glu | Tyr | His | Ala | Glu | Asn | Leu | Lys | |
| | | | 215 | | | | | 220 | | | | | 225 | | | |
| ggt | aaa | gca | ggc | aaa | ttc | gct | atc | aac | ctg | aag | aaa | ggt | gaa | gag | cgt | 776 |
| Gly | Lys | Ala | Ala | Lys | Phe | Ala | Ile | Asn | Leu | Lys | Lys | Val | Glu | Glu | Arg | |
| | | 230 | | | | 235 | | | | | | 240 | | | | |

ES 2 611 015 T3

gaa ctg ccg gaa ctg act gca gaa ttc atc aaa cgt ttc ggc gtt gaa 824
 Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe Gly Val Glu
 245 250 255

gac ggt tcc gla gaa ggt ctg cgc gct gaa qlq cgt aaa aac atg gag 872
 Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys Asn Met Glu
 260 265 270 275

cgc gag ctg aag agc gcc atc cgt aac cgc gtt aag tct cag gcc atc 920
 Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser Gln Ala Ile
 280 285 290

gaa ggt ctg gta aaa gct aac gac atc gac gta ccg gct gcg ctg atc 968
 Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala Ala Leu Ile
 295 300 305

gac agc gaa atc gac gtt ctg cgt cgc cag gct gca cag cgt ttc ggt 1016
 Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln Arg Phe Gly
 310 315 320

ggc aac gaa aaa caa gct ctg gaa ctg ccg cgc gaa ctg ttc gaa gaa 1064
 Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu Phe Glu Glu
 325 330 335

cag gct aaa cgc cgc gta gtt gtt gcc ctg ctg ctg ggc gaa gtt atc 1112
 Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly Glu Val Ile
 340 345 350 355

cgc acc aac gag ctg aaa gct gac gaa gag cgc gtg aaa gcc ctg atc 1160
 Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys Gly Leu Ile
 360 365 370

gaa gag atg gct tct gcg tac gaa gat ccg aaa gaa gtt atc gag ttc 1208
 Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val Ile Glu Phe
 375 380 385

tac agc aaa aac aaa gaa ctg atg gac aac atg cgc aat gtt gct ctg 1266
 Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn Val Ala Leu
 390 395 400

gaa gaa cag gct gtt gaa gct gta ctg gcg aaa gcg aaa gtg act gaa 1304
 Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys Val Thr Glu
 405 410 415

aaa gaa acc act ttc aac gag ctg atg aac cag cag gcg taa taagcctgc 1355
 Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala
 420 425 430

<210> 14

< 211> 432

5

< 212> PRT

< 213> Escherichia coli

<400> 14

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
 1 5 10 15

Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu
 20 25 30

Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys
 35 40 45

Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln

10

ES 2 611 015 T3

| 50 | 55 | 60 |
|--|----|----|
| Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile 65 70 75 80 | | |
| Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu 85 90 95 | | |
| Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr 100 105 110 | | |
| Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro 115 120 125 | | |
| Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu 130 135 140 | | |
| Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala 145 150 155 160 | | |
| Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu 165 170 175 | | |
| Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly 180 185 190 | | |
| Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly 195 200 205 | | |
| Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu 210 215 220 | | |
| Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val 225 230 235 240 | | |
| Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe 245 250 255 | | |
| Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys 260 265 270 | | |
| Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser 275 280 285 | | |
| Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala 290 295 300 | | |
| Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln 305 310 315 320 | | |
| Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu 325 330 335 | | |

ES 2 611 015 T3

Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly
340 345 350

Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys
355 360

Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val
370 375 380

Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn
385 390 395 400

Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys
405 410 415

Val Thr Glu Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala
420 425 430

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Microorganismos de la familia Enterobacteriaceae recombinantes que producen L-treonina o L-triptófano, que contienen un gen *tig* sobreexpresado, que codifica para el factor desencadenante TF, poseyendo ya las cepas madre empleadas para las medidas de la sobreexpresión del gen *tig* la capacidad de enriquecer al menos 0,25 g/l de L-treonina o L-triptófano en un máximo de 120 horas en la célula y/o en el medio nutriente, o bien el caldo de fermentación,
- a) obteniéndose los microorganismos mediante transformación, transducción, conjugación, o una combinación de estos métodos, con un vector que contiene el gen *tig*, un alelo de este gen, o partes del mismo, que presentan la actividad del factor desencadenante TF, y en caso dado un promotor; y/o
- 10 b) presentándose el número de copias del gen *tig* o de los alelos en los microorganismos aumentado en al menos 1, en comparación con los microorganismos no recombinantes para el gen *tig*; y/o
- c) mutando, para la consecución de la intensificación, la región de promotor y de regulación, o el punto de enlace de ribosomas, en línea de entrada del gen *tig*, o incorporándose cassettes de expresión o promotores en línea de entrada del gen *tig*.
- 15 2.- Microorganismos según la reivindicación 1, en los que se sobre expresa un polinucleótido correspondiente al gen *tig*, que codifica para un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos un 90 % a una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 6.
- 3.- Microorganismos según la reivindicación 2, caracterizados por que contienen un correspondiente polinucleótido aislado en el gen *tig*, seleccionado a partir del grupo:
- 20 a) polinucleótido con una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5 y las secuencias de nucleótido complementarias a la misma;
- b) polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que corresponde a SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5 en el ámbito de la degeneración del código genético;
- 25 c) secuencia de polinucleótido con una secuencia que se hibrida con la secuencia complementaria a SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5 bajo condiciones restrictivas, alcanzándose las condiciones restrictivas preferentemente mediante un paso de lavado, en el que la temperatura se extiende a un intervalo de 64°C a 68°C y la concentración de sales del tampón a un intervalo de 2xSSC a 0,1xSSC;
- d) polinucleótido con una secuencia SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 5, que contiene mutantes de sentido de función neutra,
- 30 codificando los polinucleótidos para el factor desencadenante TF.
- 4.- Microorganismos según la reivindicación 2, caracterizados por que el polipéptido posee una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 95 % a una de las secuencias seleccionadas a partir del grupo SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4 y SEQ ID No. 6.
- 35 5.- Microorganismos según la reivindicación 2, caracterizados por que el polipéptido presenta la secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 100 % a una de las secuencias seleccionadas a partir del grupo SEQ ID No. 2 o SEQ ID No. 4.
- 6.- Microorganismos según la reivindicación 1, en los que el número de copias del gen *tig* o de los alelos se presenta aumentado en un máximo de 8, preferentemente en un máximo de 4.
- 40 7.- Microorganismos según la reivindicación 6, caracterizados por que el aumento del número de copias del gen *tig* en al menos 1 se provoca mediante integración del gen o de los alelos en el cromosoma de los microorganismos.
- 8.- Microorganismos según la reivindicación 6, caracterizados por que el aumento del número de copias del gen *tig* en al menos 1 se provoca mediante un vector replicante extracromosómico.
- 45 9.- Microorganismos según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizados por que, mediante la amplificación del gen *tig*, la concentración o actividad del producto génico *tig* (proteína) se han aumentado en al menos un 10 %, referido a la actividad o concentración del producto génico en el microorganismo o cepa madre no recombinante para el gen *tig*.

- 10.- Microorganismos según las reivindicaciones 1 a 9, caracterizados por que los microorganismos se seleccionan a partir de las especies *Escherichia*, *Erwinia*, *Providencia* y *Serratia*.
- 11.- Microorganismos según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizados por que producen L-treonina.
- 12.- Procedimiento para la obtención de los L-aminoácidos L-treonina o L-triptófano mediante fermentación de microorganismos recombinantes de la familia *Enterobacteriaceae* según las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que
- 5 a) los microorganismos que producen L-treonina o L-triptófano, que contienen un gen *tig* sobreexpresado, que codifica para el factor desencadenante TF, se cultivan en un medio bajo condiciones en las cuales el L-aminoácido deseado L-treonina o L-triptófano se enriquece en el medio o en las células, y
- 10 b) el L-aminoácido deseado L-treonina o L-triptófano se aísla, permaneciendo en el producto aislado, 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 %).
- 13.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que, para la obtención de L-treonina, se fermentan microorganismos en los que, de manera adicional, se sobreexpresan simultáneamente uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:
- 15 a) al menos un gen del operon *thrABC* que codifica para la aspartatoquinasa, la homoserina-dehidrogenasa, la homoserinquinasa, y la treoninsintasa,
- b) el gen *pyc* de *Corynebacterium glutamicum* que codifica para la piruvato-carboxilasa,
- c) el gen *pps* que codifica para la fosfoenolpiruvato-sintasa,
- 20 d) el gen *ppc* que codifica para la fosfoenolpiruvato-carboxilasa,
- e) los genes *pntA* y *pntB* que codifican para las subunidades de piridina-transhidrogenasa,
- f) el gen *rhtC* que codifica para la proteína que media la resistencia de treonina,
- g) el gen *thrE* de *Corynebacterium glutamicum* que codifica para la proteína de exportación de treonina,
- h) el gen *gdhA* que codifica para la glutamato-dehidrogenasa,
- 25 i) el gen *ptsH* del operón *ptsHIcrr* que codifica para la fosfohistidina-proteína-hexosa-fosfotransferasa,
- j) el gen *ptsI* del operón *ptsHIcrr* que codifica para el enzima I del sistema fosfotransferasa,
- k) el gen *crr* del operón *ptsHIcrr* que codifica para el componente específico de glucosa IIA del sistema de fosfotransferasa,
- l) el gen *ptsG* que codifica para el componente específico de glucosa IIBC,
- 30 m) el gen *cysK* que codifica para la cisteína-sintasa A,
- n) el gen *cysB* que codifica para el regulador del regulón *cys*,
- o) el gen *cysJ* que codifica para la flavoproteína de NADPH-sulfito-reductasa,
- p) el gen *cysI* que codifica para la hemoproteína de NADPH-sulfito-reductasa,
- q) el gen *cysH* que codifica para la adenililsulfato-reductasa,
- 35 r) el gen *sucA* que codifica para la subunidad decarboxilasa de 2-cetoglutarato-dehidrogenasa,

ES 2 611 015 T3

- s) el gen *sucB* que codifica para la subunidad dihidrolipoiltranssuccinasa E2 de 2-cetoglutarato-dehidrogenasa,
- t) el gen *sucC* que codifica para la subunidad β de succinil-CoA-sintetasa,
- u) el gen *sucD* que codifica para la subunidad α de succinil-CoA-sintetasa,
- v) el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yjcG* de *Escherichia coli*,
- 5 w) el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yibD* de *Escherichia coli*,
- x) el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yaaU* de *Escherichia coli*,
- y) el gen *secB* que codifica para exportación de proteína chaperona SecB del complejo de secreción de proteína Sec,
- z) el gen *mopB* que codifica para el chaperón GroES, regulador de Hsp60,
- 10 aa) el gen *dnaK* que codifica para la chaperona Hsp70 (DnaK),
- bb) el gen *dnaJ* que codifica para la chaperona DnaJ, chaperona acompañante de DnaK,
- cc) el gen *mopA* que codifica para la chaperona Hsp60 (GroEL),
- dd) el gen *ftsZ* que codifica para la proteína de división celular enlazante de GTP esencial,
- ee) el gen *htpG* que codifica para la chaperona Hsp90 (HtpG).
- 15 14.- Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado por que, para la obtención de L-triptófano, se fermentan microorganismos de la familia Enterobacteriaceae en los que, de manera adicional, se sobreexpresen simultáneamente uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:
 - a) al menos un gen del operón de triptófano que codifica para la antranilato-sintasa, la antranilato-fosforibosiltransferasa, la fosforibosilantranilato-isomerasa, la indol-3-glicerinfosfato-sintasa y la triptófano-sintasa,
 - 20 b) el gen *serA* que codifica para la 3-fosfoglicerato-dehidrogenasa,
 - c) el gen *serB* que codifica para la fosfoserinfosfatasa,
 - d) el gen *serC* que codifica para la fosfoserinaminotransferasa,
 - e) el gen *aroF* que codifica para la DHAP-sintasa sensible a L-tirosina
 - f) el gen *aroG* que codifica para la DHAP-sintasa sensible a L-fenilalanina,
 - 25 g) el gen *aroH* que codifica para la DHAP-sintasa sensible a L-triptófano,
 - h) el gen *pps* que codifica para la fosfoenolpiruvato-sintasa,
 - i) el gen *pckA* que codifica para la fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa,
 - j) el gen *tktA* que codifica para la transcetolasa A,
 - k) el gen *tktB* que codifica para la transcetolasa B,
 - 30 l) el producto génico del marco de lectura abierto (ORF) *yddG* de *Escherichia coli*,

- m) el gen *secB* que codifica para la exportación de proteína chaperona SecB del complejo de secreción de proteína Sec,
- n) el gen *mopB* que codifica para la chaperona GroES, regulador de Hsp60,
- o) el gen *dnaK* que codifica para la chaperona Hsp70 (DnaK),
- 5 p) el gen *dnaJ* que codifica para la chaperona DnaJ, chaperona acompañante de DnaK,
- q) el gen *mopA* que codifica para la chaperona Hsp60 (GroEL),
- r) el gen *ftsZ* que codifica para la proteína de división celular FtsZ enlazante de GTP esencial,
- s) el gen *htpG* que codifica para la chaperona Hsp90 (HtpG).
- 10 15.- Procedimiento según las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado por que, para la obtención de L-treonina, se fermentan microorganismos en los que, de manera adicional, se excluyen simultáneamente uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:
- a) el gen *thd* que codifica para la treonina-dehidrogenasa,
- b) el gen *mdh* que codifica para la malato-dehidrogenasa,
- c) el gen *pckA* que codifica para el enzima fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa,
- 15 d) el gen *poxB* que codifica para la piruvato-oxidasa,
- e) el gen *dgsA* que codifica para el regulador DgsA del sistema fosfotransferasa,
- f) el gen *fruR* que codifica para el represor de fructosa,
- g) el gen *rpoS* que codifica para el factor Sigma³⁸,
- h) el gen *aspA* que codifica para la aspartato amonio-liasa,
- 20 i) el gen *ompF* que codifica para la porina F de membrana exterior,
- o se reduce la expresión.
- 16.- Procedimiento según las reivindicaciones 12 y 14, caracterizado por que, para la obtención de L-triptófano, se fermentan microorganismos en los que, de manera adicional, se excluyen simultáneamente uno o varios de los genes seleccionados a partir del grupo:
- 25 a) el gen *tnaA* que codifica para la triptofanasa,
- b) el gen *trpR* que codifica para el represor del operón *trp*,
- c) el gen *tyrA* que codifica para la corismato-mutasa T y la pefenato-dehidrogenasa,
- d) el gen *pheA* que codifica para la corismato-mutasa P y la pefenato-dehidrogenasa,
- e) el gen *mtr* que codifica para la proteína de transporte específica de triptófano,
- 30 f) el gen *tnaB* que codifica para la triptófano-permeasa,
- g) el gen *aroP* que codifica para el transportador de aminoácidos aromáticos,

- h) el gen sdaA que codifica para la L-serina-deaminasa,
- i) el gen pgi que codifica para la glucosa-6-fosfato-isomerasa,
- j) el gen tyrB que codifica para la tirosina-aminotransferasa, y
- k) el gen ompF que codifica para la porina F de membrana exterior,

5 o se reduce la expresión.

17.- Procedimiento según la reivindicación 12 a 16, caracterizado por que los microorganismos se cultivan en un procedimiento discontinuo, procedimiento discontinuo de alimentación, procedimiento discontinuo de alimentación reiterada, o procedimiento continuo.

10 18.- Procedimiento según la reivindicación 12 a 17, caracterizado por que se determina la concentración de L-treonina aislada o L-triptófano aislado.

Figura 1: mapa del plásmido pTrc99Atig

