(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 624 913**

(51) Int. Cl.:

C12P 13/04 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)
C12P 13/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2009** **PCT/JP2009/065475**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010** **WO10027045**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2009** **E 09811570 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017** **EP 2336347**

(54) Título: **Microorganismo que produce un L-aminoácido y procedimiento para producir un L-aminoácido**

(30) Prioridad:

08.09.2008 JP 2008229736
16.02.2009 JP 2009032839

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2017

(73) Titular/es:

AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, Kyobashi 1-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8315, JP

(72) Inventor/es:

TAKIKAWA, RIE;
HARA, YOSHIHIKO;
NONAKA, GEN y
TAKUMI, KAZUHIRO

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

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).

ES 2 624 913 T3

DESCRIPCIÓN

Microorganismo que produce un L-aminoácido y procedimiento para producir un L-aminoácido.

Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un L-aminoácido utilizando un microorganismo, en particular un procedimiento para producir un L-aminoácido en el que el L-aminoácido es ácido L-glutámico, L-lisina, L-treonina, L-triptófano o similar. Estos son L-aminoácidos industrialmente útiles, por ejemplo el ácido L-glutámico resulta útil como condimento, y L-lisina, L-treonina y L-triptófano resultan útiles como aditivos para el pienso animal, ingredientes de alimentos saludables, infusiones de aminoácidos y similares.

Antecedentes de la técnica

Los L-aminoácidos se producen industrialmente mediante la fermentación utilizando diversos microorganismos. Por ejemplo, el ácido L-glutámico es producido principalmente mediante fermentación utilizando bacterias productoras del ácido L-glutámico con las bacterias denominadas corineformes pertenecientes al género *Brevibacterium*, *Corynebacterium* o *Microbacterium*, o cepas mutantes de las mismas (ver, por ejemplo, el documento no de patente nº 1). Como procedimientos para producir ácido L-glutámico mediante fermentación utilizando otros microorganismos se conocen procedimientos de utilización de un microorganismo perteneciente al género *Bacillus*, *Streptomyces, Penicillium* o similar (ver, por ejemplo, el documento de patente nº 1), los procedimientos de utilización de un microorganismo perteneciente al género *Pseudomonas, Arthrobacter, Serratia, Candida* o similares (ver, por ejemplo, el documento de patente nº 2), los procedimientos de utilización de un microorganismo perteneciente al género *Bacillus, Pseudomonas, Serratia, Aerobacter aerogenes* (actualmente denominado *Enterobacter aerogenes*) o similar (ver, por ejemplo, el documento de patente nº 3), los procedimientos de utilización de una cepa mutante de *Escherichia coli* (ver, por ejemplo, el documento de patente nº 1) y similares. Además, también se han dado a conocer procedimientos para producir ácido L-glutámico utilizando un microorganismo perteneciente al género *Klebsiella, Erwinia, Pantoea* o *Enterobacter* (ver, por ejemplo, los documentos de patente nº 2 a nº 4).

Entre dichos procedimientos para producir sustancias diana tales como los L-aminoácidos mediante fermentación utilizando un microorganismo tal como se ha mencionado anteriormente se incluyen procedimientos de utilización de un microorganismo de tipo salvaje (cepa de tipo salvaje), procedimientos de utilización de una cepa auxotrófica derivada de una cepa de tipo salvaje, procedimientos de utilización de una cepa mutante de regulación metabólica derivada de una cepa de tipo salvaje como cepa resistente a uno o más fármacos diversos, procedimientos de utilización de una cepa que es tanto una cepa auxotrófica como una cepa mutante de regulación metabólica, y similares.

En los últimos años, se han utilizado técnicas de ADN recombinante en la producción de sustancias diana mediante fermentación. Por ejemplo, la productividad de L-aminoácidos de un microorganismo puede mejorarse mediante el incremento de la expresión de un gen codificante de un enzima biosintético de L-aminoácidos (documentos de patente nº 5 y nº 6) o incrementando el flujo de entrada de una fuente de carbono en un sistema de biosíntesis de L-aminoácidos (documento de patente nº 7).

Como glucosa deshidrogenasa, en términos generales, se conocen los de tipo dependiente de NAD(P) y los de tipo dependiente de PQQ (pirroloquinolina quinona). Además, es conocido que entre los de tipo dependiente de PQQ (EC1.1.5.2) se incluyen los de tipo soluble y los de tipo unión a membrana, y los del último tipo se encuentran presentes en el espacio periplasmático (espacio entre la membrana externa y la membrana interna) y existen ampliamente en las enterobacterias. En adelante una glucosa deshidrogenasa presente en dicho espacio periplasmático y que utilice la PQQ como coenzima también se denomina "GCD".

Es conocido que algunas bacterias, tales como *Escherichia coli*, no presentan la capacidad de sintetizar PQQ, que es un coenzima de de GCD y, por lo tanto, expresan la actividad de GCD únicamente al añadir PQQ (documento no de patente nº 2). Por otra parte, algunas bacterias, tales como las bacterias *Pantoea*, presentan la capacidad de síntesis de PQQ y presentan un holoenzima GCD.

Como técnicas referidas a GCD, se conoce el procedimiento de producción de celulosa a partir de glucosa mediante la utilización de *Gluconobacter xylinus* en las que se deleciona el gen codificante de GCD (J. Biosci. Bioeng. 99(4):415-422, 2005) y un procedimiento de producción de ácido [5S,6S]-5,6-dihidroxiciclohexa-1,3-dieno-1-carboxílico mediante la utilización de una bacteria *Escherichia* que presenta una actividad reducida de glucosa deshidrogenasa o una bacteria de *Escherichia* inherentemente deficiente en actividad de glucosa deshidrogenasa (documento de patente nº 8).

Sin embargo, no se ha conocido la influencia de la reducción de la actividad de GCD de una bacteria sobre la capacidad productora de L-aminoácido de la bacteria.

Referencias de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente nº 1: patente japonesa abierta al público (KOKAI) nº 5-244970

Documento de patente nº 2: patente US nº 3.563.857

Documento de patente nº 3: publicación de patente japonesa (KOKOKU) nº 32-9393

Documento de patente nº 4: patente japonesa abierta al público nº 2000-189175

Documento de patente nº 5: patente US nº 5.168.056

Documento de patente nº 5: patente US nº 5.776.736

Documento de patente nº 5: patente US nº 5.906.925

Documento de patente nº 8: publicación de patente internacional nº WO2006/133898

Documentos no de patente

Documento no de patente nº 1: Kunihiko Akashi et al., "Amino acid fermentation", páginas 195 a 215, 1986, Japan Scientific Societies Press.

Documento no de patente nº 2: FEMS Microbiol. Lett. 24:329-333, 1984.

Sumario de la invención

Objetivo que debe alcanzar la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que puede producir eficientemente un L-aminoácido y un procedimiento para producir eficientemente un L-aminoácido mediante la utilización de dicho microorganismo.

Medios para alcanzar el objetivo

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo varias investigaciones con el fin de alcanzar el objetivo anteriormente indicado y, como resultado, han encontrado que una capacidad de producción de L-aminoácido de una enterobacteria que presenta inherentemente la actividad de GCD resultaba mejorada mediante la modificación de la enterobacteria para que la actividad de GCD se encontrase reducida, y han llevado a cabo la presente invención.

De esta manera, la presente invención se refiere a lo siguiente.

[1] Un procedimiento para producir un L-aminoácido que comprende cultivar una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y presenta una capacidad productora de L-aminoácido en un medio para producir y acumular el L-aminoácido en cultivo, y recolectar el L-aminoácido a partir del cultivo, en el que la bacteria inherentemente presenta una actividad de una glucosa deshidrogenasa que utiliza pirroloquinolina quinona como coenzima, pero la bacteria ha sido modificada de manera que se reduzca la actividad de la glucosa deshidrogenasa (GCD) mediante la inactivación de un gen *gcd* codificante de la glucosa deshidrogenasa.

[2] El procedimiento según [1], en el que el gen *gcd* es un ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2, o una variante del mismo.

[3] El procedimiento según [1] o [2], en el que el L-aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido L-glutámico, L-lisina, L-treonina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano y L-cisteína.

[4] El procedimiento según [3], en el que el L-aminoácido es ácido L-glutámico o L-cisteína.

[5] El procedimiento según [4], en el que el L-aminoácido es ácido L-glutámico y la actividad o actividades de uno o más tipos de enzimas seleccionados de entre el grupo que consiste en citrato sintasa, metilcitrato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa y glutamato deshidrogenasa se encuentran incrementadas en la bacteria.

[6] El procedimiento según [4], en el que el L-aminoácido es L-cisteína, y la actividad o actividades de uno o más

enzimas seleccionados de entre el grupo que consiste en 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, serina acetiltransferasa y el sistema de transporte de sulfato/tiosulfato se encuentran incrementadas, y/o la expresión de un gen *yeaS* se encuentra incrementada.

[7] El procedimiento según cualquiera de entre [1] y [6], en el que la bacteria es una bacteria perteneciente a un género seleccionado de entre los géneros *Pantoea, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Providencia, Salmonella, Serratia, Morganella* y *Yersinia*.

Efecto de la invención

Mediante la utilización del microorganismo de la presente invención, un L-aminoácido tal como ácido L-glutámico, L-lisina, L-treonina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-treonina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano o L-cisteína pueden producirse eficientemente mediante fermentación.

Breve descripción de los dibujos

la figura 1 representa la estructura del plásmido ayudante RSF-Red-TER.

la figura 2 representa la construcción del plásmido ayudante RSF-Red-TER.

la figura 3 representa la secuencia del promotor Pnlp.

Formas de realización para poner en práctica de la invención

A continuación en la presente memoria se explica en detalle la presente invención.

<1> Bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* utilizada en la presente invención.

La bacteria utilizada en la presente invención es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que inherentemente presenta la actividad de GCD y presenta una capacidad de producción de L-aminoácido, y es una bacteria que ha sido modificada de manera que la actividad de GCD se encuentra reducida mediante la inactivación de un gen *gcd* codificante de la glucosa deshidrogenasa. La bacteria de la presente invención puede obtenerse mediante la modificación de una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, que presenta inherentemente la actividad de GCD, y que presenta una capacidad de producción de L-aminoácido de manera que la actividad de GCD se reduce mediante la inactivación de un gen *gcd* codificante de la glucosa deshidrogenasa. Alternativamente, la bacteria de la presente invención también puede obtenerse proporcionando una capacidad de producción de L-aminoácido a una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y que inherentemente presenta la actividad de GCD pero que ha sido modificada de manera que se reduce la actividad de GCD o se incrementa la capacidad de producción de L-aminoácido de dicha bacteria.

El tipo de L-aminoácido no se encuentra particularmente limitado y entre los ejemplos se incluyen aminoácidos básicos, tales como L-lisina, L-ornitina, L-arginina, L-histidina y L-citrulina; aminoácidos alifáticos, tales como L-isoleucina, L-alanina, L-valina, L-leucina y L-glicina; aminoácidos que son ácidos hidroximonoaminocarboxílicos, tales como L-treonina y L-serina; amionácidos cíclicos, tales como L-prolina; aminoácidos aromáticos, tales como L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano; aminoácidos que contienen azufre, tales como L-cisteína, L-cistina y L-metionina, y aminoácidos ácidos, tales como ácido L-glutámico, ácido L-aspártico, L-glutamina y L-asparagina. Resultan especialmente preferentes el ácido L-glutámico, la L-lisina, la L-treonina y el L-triptófano. El microorganismo de la presente invención puede presentar la capacidad de producir dos o más tipos de aminoácido.

En la presente invención, el término "L-aminoácido" incluye L-aminoácidos en forma libre y sales de los mismos, tales como sulfatos, hidrocloruros, carbonatos, sales de amonio, sales de sodio y sales de potasio de los mismos.

En la presente invención, una bacteria que presenta una capacidad de producción de L-aminoácido se refiere a una bacteria que presenta una capacidad de producir un L-aminoácido y de excretarlo en un medio, al cultivar la bacteria en el medio. La bacteria preferentemente es una bacteria que puede acumular en el medio 0,5 g/l o más, más preferentemente 1,0 g/l o más, de un L-aminoácido diana.

A continuación se ejemplifican bacterias utilizadas como cepa parental de la bacteria de la presente invención que debe modificarse, de manera que se reduce la actividad de la GCD mediante la inactivación de un gen *gcd* codificante de la glucosa deshidrogenasa, y procedimientos para proporcionar o incrementar una capacidad de producción de L-aminoácido.

<2-1> Bacteria de la presente invención

La bacteria de la presente invención es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*.

La familia *Enterobacteriaceae* comprende bacterias pertenecientes a los géneros *Escherichia, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Pantoea, Photorhabdus, Providencia, Salmonella, Serratia, Shigella, Morganella, Yersinia* y similares. En particular, resultan preferentes las bacterias clasificadas en la familia *Enterobacteriaceae* según la taxonomía utilizada en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347).

La expresión "una bacteria perteneciente al género *Escherichia*" se refiere a que la bacteria se clasifica en el género *Escherichia* según la clasificación conocida por el experto en microbiología, aunque la bacteria no se encuentra particularmente limitada a ellas. entre los ejemplos de bacteria perteneciente al género *Escherichia* se incluyen, aunque sin limitación, *Escherichia coli* (*E. coli*).

Entre los ejemplos de la bacteria perteneciente al género *Escherichia coli* se incluyen, por ejemplo, las bacterias de los grupos indicados en el trabajo de Neidhardt et al. (Neidhardt F.C., editor, 1996, *Escherichia* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, segunda edición, páginas 2477 a 2483, tabla 1, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.). Entre los ejemplos específicos se incluyen *Escherichia coli* W3110 (ATCC nº 27325), *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) derivados del prototipo cepa K12 de tipo salvaje, y similares.

Dichas cepas se encuentran disponibles en, por ejemplo, la American Type Culture Collection (dirección postal: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos de América). Es decir, se proporcionan los números de acceso de cada una de las cepas y las cepas pueden ordenarse mediante la utilización de dichos números. Los números de acceso de las cepas se presentan en el catálogo de la American Type Culture Collection.

Entre los ejemplos de las bacterias *Enterobacter* se incluyen *Enterobacter agglomerans, Enterobacter aerogenes* y similares. Específicamente pueden utilizarse las cepas ejemplificadas en la patente europea abierta al público EP 0 952 221. En los últimos años, algunas bacterias *Enterobacter agglomerans* han sido reclasificadas como *Pantoea agglomerans, Pantoea ananatis* o *Pantoea stewartii*, basándose en el análisis de la secuencia de nucleótidos del ARNr 16S, etc. El microorganismo puede pertenecer al género *Enterobacter* o *Pantoea* con la condición de que el microorganismo se clasifique en la familia *Enterobacteriacea*.

Entre las cepas ejemplificativas del género *Enterobacter* se incluyen la cepa *Enterobacter agglomerans* ATCC 12287.

Entre las cepas ejemplificativas de las bacterias *Pantoea* se incluyen *Pantoea ananatis, Pantoea stewartii, Pantoea agglomerans* y *Pantoea citrea*. Entre los ejemplos específicos se incluyen las cepas siguientes:

Pantoea ananatis AJ13355 (FERM BP-6614, patente europea abierta al público EP 0 952 221).

Pantoea ananatis AJ13356 (FERM BP-6615, patente europea abierta al público EP 0 952 221).

Pantoea ananatis AJ13601 (FERM BP-7207, patente europea abierta al público EP 0 952 221).

Aunque dichas cepas se han identificado y depositado como *Enterobacter agglomerans* en el momento de aislarse, actualmente se clasifican como *Pantoea ananatis* basándose en el análisis de la secuencia de nucleótidos del ARNr 16S, etc., tal como se ha indicado anteriormente.

Entre los ejemplos de las bacterias Erwinia se incluyen *Erwinia amylovora* y *Erwinia carotovora*, y entre los ejemplos de las bacterias *Klebsiella* se incluyen *Klebsiella planticola*. Entre los ejemplos específicos se incluyen las cepas siguientes:

Erwinia amylovora ATCC nº 15580

Erwinia carotovora ATCC nº 15713

Klebsiella planticola AJ13399 (FERM BP-6600, patente europea abierta al público EP 0 955 368)

Klebsiella planticola AJ13410 (FERM BP-6617, patente europea abierta al público EP 0 955 368).

La bacteria de la presente invención es una de las enterobacterias indicadas anteriormente y es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* que presenta inherentemente la actividad de GCD y presenta una capacidad de producción de L-aminoácido. Una enterobacteria que presenta inherentemente la actividad de GCD se refiere a una bacteria en la que la cepa salvaje o la cepa sin modificación del gen *gcd* presenta la actividad de GCD. Entre los ejemplos de dicha bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* se incluyen bacterias pertenecientes a dicho género, tal como *Pantoea, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Providencia, Salmonella, Serratia, Morganella, Yersinia, Citrobacter* y *Proteus*. Más específicamente, entre los ejemplos se incluyen las bacterias indicadas en Int. J. Syst. Bacteriol. 39(1):61-67, 1989.

Aunque *Escherichia coli* presenta un gen *gcd* y produce un apoenzima GCD, no presenta capacidad de producción de PQQ. Por lo tanto, no presenta la actividad de GCD en el caso de que no se añada PQQ. Sin embargo, es conocido que en el caso de que se exprese un determinado gen foráneo, se expresa una sustancia que sustituye PQQ y se expresa la actividad de GCD (documento WO2006/133898). Una bacteria que no presenta habitualmente la actividad de GCD, pero en un estado en el que puede expresar la actividad de GCD tal como se ha indicado anteriormente, tal como bacterias *Escherichia*, se encuentra comprendida en el alcance de "enterobacteria que presenta inherentemente la actividad de GCD" al que se hace referencia en la presente invención. La actividad de GCD se explica posteriormente.

A continuación en la presente memoria se describen procedimientos para proporcionar una capacidad de producción de L-aminoácido tal como se ha indicado anteriormente, o procedimientos para incrementar una capacidad productora de L-aminoácido de dichas bacterias.

Para proporcionar una capacidad de producir un L-aminoácido, pueden utilizarse procedimientos utilizados convencionalmente en el cultivo de bacterias corineformes o bacterias del género *Escherichia* (ver "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center, Ltd., 1a edición, publicada el 30 de mayo de 1986, páginas 77 a 100). Entre dichos procedimientos se incluyen la adquisición de un mutante auxotrófico, una cepa resistente a análogo de L-aminoácido, o un mutante de regulación metabólica, la construcción de una cepa recombinante en la que se incrementa la expresión de una biosíntesis de L-aminoácido, etc. En la presente memoria, en el cultivo de bacterias productoras de L-aminoácidos, puede proporcionar una o más propiedades tales como una mutación auxotrófica, resistencia a análogos, o una mutación de regulación metabólica. La expresión del enzima o enzimas de biosíntesis de L-aminoácidos puede incrementarse sola o en combinaciones de dos o más. Además, los procedimientos de provisión de propiedades tales como una mutación auxotrófica, la resistencia a análogo o la mutación de regulación metabólica puede combinarse con los procedimientos de incremento de los enzimas biosintéticos.

Puede obtenerse una cepa mutante auxótrofa, una cepa resistente a análogos de L-aminoácido o una cepa mutante de regulación metabólica con una capacidad para producir un L-aminoácido sometiendo una cepa parental o una cepa de tipo salvaje a mutagénesis convencional, tal como la exposición a rayos X o la irradiación UV o el tratamiento con un mutágeno, tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etc., seguido de la selección de las que muestran autotrofia, resistencia a análogos una mutación de regulación metabólica y que también presentan una capacidad de producir un L-aminoácido.

Además, la provisión o el incremento de una capacidad de producción de un L-aminoácido también puede conseguirse incrementando una actividad enzimática mediante recombinación génica. Un ejemplo del procedimiento para incrementar una actividad enzimática incluye, por ejemplo, un procedimiento de modificación de una bacteria de manera que se incrementa la expresión de un gen codificante de un enzima que participa en la biosíntesis de un L-aminoácido. Respecto al procedimiento para incrementar la expresión de un gen, el incremento también puede conseguirse mediante la introducción de un plásmido de amplificación preparado mediante la introducción de un fragmento de ADN que contiene el gen en un plásmido apropiado, por ejemplo un vector plásmido que contiene por lo menos el gen responsable de la replicación y proliferación del plásmido en un microorganismo, incrementando el número de copias del gen en el cromosoma mediante conjugación, transferencia o similar, o introduciendo una mutación en una región promotora del gen (ver la publicación de patente internacional WO95/34672).

En el caso de que se introduzca un gen objetivo en el plásmido o cromosoma de amplificación anteriormente indicado, puede utilizarse cualquier promotor para expresar el gen con la condición de que funcione en las bacterias objetivo. El promotor puede ser el promotor del gen que debe utilizarse sin modificación o un promotor modificado. La cantidad de expresión del gen también puede controlarse mediante la selección adecuada de un promotor que sea potente en bacterias corineformes, o consiguiendo que las regiones -35 y -10 del promotor sean más similares a una secuencia de consenso. Dichos procedimientos de incremento de la expresión de un gen de enzima tal como se ha indicado anteriormente se describen en la publicación de patente internacional WO00/18935, patente europea abierta a inspección pública EP 1 010 755 y similares.

A continuación en la presente memoria se ejemplifican a continuación procedimientos específicos para proporcionar una capacidad de producción de L-aminoácido a bacterias y bacterias a las que se ha proporcionado capacidad de producción de L-aminoácido. Aunque las descripciones siguientes se refieren principalmente a bacterias *Escherichia*, también pueden aplicarse los procedimientos siguientes a las enterobacterias utilizadas para la presente invención.

Bacterias productoras de L-treonina

Entre los ejemplos preferidos de microorganismos que presentan capacidad de producción de L-treonina se incluyen bacterias en las que se encuentran incrementadas una o más actividades de los enzimas del sistema de biosíntesis de la L-treonina. Entre los ejemplos de enzimas biosintéticos de la L-treonina se incluyen la aspartocinasa III (*lysC*), la aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), la aspartocinasa I (thrA), la homoserina cinasa (*thrB*), la treonina sintasa (*thrC*) codificada por el operón *thr* y la aspartato aminotransferasa (aspartato transaminasa) (*aspC*). Los nombres de los genes codificantes de los enzimas respectivos se mencionan entre paréntesis después de los

nombres de los enzimas (lo mismo resulta de aplicación durante toda la presente memoria). Entre dichos enzimas, son ejemplos particularmente preferidos la aspartato semialdehído deshidrogenasa, la aspartocinasa I, la homoserina cinasa, la aspartato aminotransferasa y la treonina sintasa. Los genes codificantes de los enzimas biosintéticos de la L-treonina pueden introducirse en una bacteria que presenta una capacidad reducida de descomponer la treonina. Un ejemplo de dicha bacteria *Escherichia* que presenta una capacidad reducida de descomponer la treonina es la cepa TDH6, que es deficiente en actividad de treonina deshidrogenasa (patente japonesa abierta al público nº 2001-346578).

Las actividades enzimáticas de los enzimas biosintéticos de la L-treonina resultan inhibidos por el producto final, la L-treonina. Por lo tanto, para construir cepas productoras de L-treonina, resulta deseable que los genes de los enzimas biosintéticos de la L-treonina sean modificadas de manera que los enzimas se encuentren desensibilizados frente a la inhibición por retroalimentación por la L-treonina en las cepas productoras de L-treonina. Los genes *thrA*, *thrB* y *thrC* anteriormente indicados constituyen el operón treonina, que forma una estructura atenuadora. La expresión del operón treonina resulta inhibida por la isoleucina y la treonina en el medio de cultivo y también resulta suprimida mediante atenuación. Por lo tanto, el operón treonina puede modificarse eliminando la secuencia líder en la región de atenuación o en el atenuador (ver Lynn S.P., Burton W.S., Donohue T.J., Gould R.M., Gumport R.L. y Gardner J.F., J. Mol. Biol. 194:59-69, 1987; documentos WO02/26993 y WO2005/049808).

El promotor nativo del operón treonina se encuentra presente cadena arriba del operón treonina y puede sustituirse por un promotor no nativo (ver el documento WO98/04715) o puede construirse un operón treonina que ha sido modificado de manera que la expresión del gen de biosíntesis de la treonina se encuentra controlado por el represor y el promotor del fago λ (patente europea 0 593 792). Además, con el fin de modificar una bacteria de manera que se encuentre desensibilizada frente a la inhibición por retroalimentación por la L-treonina, puede seleccionarse una cepa resistente al ácido α-amino-β-hidroxiisovalérico (AHV).

Resulta preferido que pueda incrementarse el número de copias del operón treonina que se modifica para desensibilizar la inhibición por retroalimentación por la L-treonina, o que pueda incrementarse la expresión del operón treonina mediante la ligación del mismo a un promotor potente en un huésped. El número de copia también puede incrementarse, aparte de la amplificación utilizando un plásmido, transfiriendo el operón treonina a un genoma utilizando un trasposón, fago Mu o similar.

Aparte de incrementar la expresión de los genes biosintéticos de la L-treonina, la expresión de los genes que participan en la ruta glucolítica, el ciclo de los TCA o la cadena respiratoria, los genes que regulan la expresión de dichos genes o los genes que participan en la incorporación de sacáridos también pueden incrementarse preferentemente. Entre los ejemplos de dichos genes se incluyen los genes codificantes de la transhidrogenasa (*pntAB*, patente europea 0 733 712), la fosfoenolpiruvato carboxilasa (*pepC*, documento WO95/06114), la fosfoenolpiruvato sintasa (*pps*, patente europea nº 0 877 090) y un gen codificante de la piruvato carboxilasa de una bacteria corineforme o *Bacillus bacterium* (documento WO99/18228, patente europea abierta al público EP 1 092 776 A).

Resulta preferido que la expresión de un gen que proporciona resistencia a L-treonina o a L-homoserina resulte incrementada o que la resistencia a L-treonina o a L-homoserina sea proporcionada a un huésped. Entre los ejemplos de dichos genes se incluyen los genes *rhtA* (Livshits V.A. et al., Res. Microbiol. 154:123-135, 2003), *rhtB* (patente europea abierta al público EP 0 994 190), *rhtC* (patente europea abierta al público EP 0 994 190), *rhtC* (patente europea abierta al público EP 1 013 765), *yfiK* y *yeaS* (patente europea abierta al público EP 1 016 710). Los procedimientos para proporcionar resistencia a la L-treonina a un huésped se describen en la patente europea abierta al público EP 0 994 190 y en el documento WO90/04636.

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-treonina y las cepas parentales que pueden utilizarse para obtener dichas bacterias se incluyen, aunque sin limitación, las cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tales como *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (patentes US nº 5.175.107 y nº 5.705.371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC nº 98081) (patente US nº 5.631.157), *E. coli* NRRL-21593 (patente US nº 5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (patente US nº 5.474.918), *E. coli* FERM BP-3519 y FERM BP-3520 (patente US nº 5.376.538), *E. coli* MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (en ruso) 14:947-956, 1978), *E. coli* VL643 y VL2055 (patente europea abierta al público EP 1 149 911) y similares.

La cepa TDH-6 es deficiente en el gen *thrC*, así como asimiladora de la sacarosa, y el gen *ilvA* de la misma presenta una mutación parcial. Esta cepa también presenta una mutación en el gen *rhtA*, que proporciona resistencia a una concentración elevada de treonina u homoserina. La cepa B-3996 contiene el plásmido pVIC40, que se obtuvo insertando el operón *thrA**BC, incluyendo un gen *thrA* mutante, en el vector derivado de RSF1010. Este gen *thrA* mutante codifica la aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I que se encuentra desensibilizada sustancialmente frente a la inhibición por retroalimentación por la treonina. La cepa B-3996 se depositó el 19 de noviembre de 1987 en el All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscú, Rusia) bajo el número de acceso RIA 1867. La cepa también se ha depositado en el Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Rusia) el 7 de abril de 1987 bajo el número de acceso VKPM B-3996.

También puede utilizarse *E. coli* VKPM B-5318 (patente europea EP 0 593 792) como bacteria productora de L-treonina o una cepa parental para obtenerla a partir de la misma. La cepa B-5318 es prototrófica con respecto a la isoleucina y un represor C1 y promotor PR del fago lambda sensible a la temperatura sustituyen la región reguladora del operón treonina en el plásmido pVIC40. La cepa VKPM B-5318 se depositó como depósito internacional en el Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Rusia) el 3 de mayo de 1990 bajo el número de acceso VKPM B-5318.

El gene *thrA* que codifica la aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I de *Escherichia coli* ha sido caracterizado (posiciones nucleótidas 337 a 2.799, GenBank nº de acceso NC_000913.2, gi: 49175990). El gen *thrA* se localiza entre los genes *thrL* y *thrB* en el cromosoma de *E. coli* K-12. El gen *thrB* que codifica la homoserina cinasa de *Escherichia coli* ha sido caracterizado (posiciones nucleótidas 2.801 a 3.733, GenBank nº de acceso NC_000913.2, gi: 49175990). El gen *thrB* se localiza entre los genes *thrA* y *thrC* en el cromosoma de *E. coli* K-12. El gen *thrC* que codifica la treonina sintasa de *Escherichia coli* ha sido caracterizado (posiciones nucleótidas 3.734 a 5.020, GenBank nº de acceso NC_000913.2, gi: 49175990). El gen *thrC* se localiza entre el gen *thrB* y el marco de lectura abierto *yaaX* en el cromosoma de *E. coli* K-12. Los tres genes funcionan como un único operón treonina. Para incrementar la expresión del operón treonina, la región atenuadora que afecta a la transcripción deseablemente se extrae del operón (documentos WO2005/049808 y WO2003/097839).

Un gen *thrA* mutante que codifica la aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I resistente a la inhibición por retroalimentación por la treonina, así como los genes *thrB* y *thrC*, puede obtenerse en forma de un solo operón a partir del plásmido bien conocido pVIC40, que se encuentra presente en la cepa de *E. coli* productora de treonina VKPM B-3996. El plásmido pVIC40 se describe en detalle en la patente US nº 5.705.371.

El gen *rhtA* se encuentra presente en 18 min. en el cromosoma de *E. coli* próximo al operón *glnHPQ*, que codifica componentes del sistema de transporte de la glutamina. El gen *rhtA* es idéntico a ORF1 (gen *ybiF*, posiciones nucleótidas 764 a 1.651, GenBank nº de acceso AAA218541, gi: 440181) y se encuentra situado entre los genes *pexB* y *ompX*. La unidad que expresa una proteína codificada por el ORF1 se ha denominado gen *rhtA* (rht: resistencia a homoserina y a treonina). Además, se ha encontrado que la mutación *rhtA23* es una sustitución de A por G en la posición -1 con respecto al codón de inicio ATG (resumen del 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology conjuntamente con el Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California, 24 a 29 de agosto, 1997; resumen nº 457, patente europea abierta al público EP 1 013 765).

El gen *asd* de *E. coli* ya ha sido caracterizado (posiciones nucleótidas 3572511 a 3571408, GenBank nº de acceso NC_000913.1, gi: 16131307) y puede obtenerse mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa; ver White T.J. et al., Trends Genet. 5:185, 1989) utilizando cebadores preparados basándose en la secuencia de nucleótidos del gen. Los genes *asd* de otros microorganismos pueden obtenerse de una manera similar.

Además, el gen *aspC* de *E. coli* ya ha sido caracterizado (posiciones nucleótidas 983742 a 984932, GenBank nº de acceso NC_000913.1, gi: 16128895) y puede obtenerse mediante PCR. Los genes *aspC* de otros microorganismos pueden obtenerse de una manera similar.

Bacterias productoras de L-lisina

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-lisina pertenecientes al género *Escherichia* se incluyen mutantes que presentan resistencia a un análogo de la L-lisina. El análogo de la L-lisina inhibe el crecimiento de las bacterias pertenecientes al género *Escherichia*, aunque dicha inhibición resulta total o parcialmente desensibilizada en el caso de que la L-lisina se encuentre presente en el medio. Entre los ejemplos del análogo de la L-lisina se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, oxalisina, hidroxamato de lisina, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ-metil-lisina, α-clorocaprolactamo y similares. Los mutantes que presentan resistencia a dichos análogos de lisina pueden obtenerse sometiendo las bacterias pertenecientes al género *Escherichia* a un tratamiento convencional de mutagénesis artificial. Entre los ejemplos específicos de cepas bacterianas útiles para producir L-lisina se incluyen *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185, ver la patente US nº 4.346.170) y *Escherichia coli* VL611. En estos microorganismos se ha desensibilizado la inhibición por retroalimentación de la aspartocinasa por la L-lisina.

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-lisina y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-lisina se incluyen además cepas en las que se ha incrementado la expresión de uno o más genes codificantes de un enzima biosintético de la L-lisina. Entre los ejemplos de dichos enzimas se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*), aspartocinasa (*lysC*), dihidrodipicolinato reductasa (*dapB*), diaminopimelato descarboxilasa (*lysA*), diaminopimelato deshidrogenasa (*ddh*) (patente US nº 6.040.160), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), diaminopimelato epimerasa (*dapF*), tetrahidrodipicolinato succinilasa (*dapD*), succinil diaminopimelato desacilasa (*dapE*) y aspartato (*aspA*) (patente europea abierta al público EP 1 253 195). Entre dichos enzimas resultan particularmente preferentes, dihidrodipicolinato reductasa, diaminopimelato descarboxilasa, diaminopimelato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato

carboxilasa, aspartato aminotransferasa, diaminopimelato epimerasa, aspartato semialdehído deshidrogenasa, tetrahidrodipicolinato succinilasa y succinil diaminopimelato desacilasa. Además, las cepas parentales pueden expresar niveles incrementados del gen que participa en la eficiencia energética (*cyo*) (patente europea abierta al público EP 1 170 376), el gen codificante de la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (*pntAb*) (patente US nº 5.830.716), el gen *ybjE* (documento WO2005/073390) o combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de cepas progenitoras que pueden utilizarse para la derivación de bacterias que producen L-lisina incluyen asimismo las cepas que presentan una actividad disminuida o eliminada de una enzima que cataliza una reacción para generar un compuesto diferente a la L-lisina ramificando a partir de la ruta biosintética de la L-lisina. Los ejemplos de las enzimas que catalizan una reacción para generar un compuesto diferente a la L-lisina ramificando a partir de la ruta biosintética de la L-lisina incluyen una homoserina deshidrogenasa, lisina descarboxilasa (patente US nº 5.827.698) y la enzima málica (documento WO 2005/010175).

Entre los ejemplos preferidos de bacterias productoras de L-lisina se incluyen *Escherichia coli* WC196ΔcadAΔldc/pCABD2 (documento WO2006/078039). La cepa se construyó mediante la introducción del plásmido pCABD2 descrito en la patente US nº 6.040.160 en la cepa WC196 con disrupción de los genes *cadA* y *ldcC*, los cuales codifican la lisina descarboxilasa. La cepa WC196 se cultivó a partir de la cepa W3110, que se obtuvo de *Escherichia coli* K-12, mediante la sustitución del gen *lysC* de tipo salvaje en el cromosoma de la cepa W3110 con un gen *lysC* mutante codificante de una aspartocinasa III mutante en la que la treonina en la posición 352 ha sido sustituida por isoleucina, resultando en la desensibilización de la inhibición por retroalimentación del mismo por la L-lisina (patente US nº 5.661.012) y que confiere resistencia AEC a la cepa resultante (patente US nº 5.827.698). La cepa WC196 se denominó *Escherichia coli* AJ13069, depositada en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (actualmente el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 6 de diciembre de 1994 y se le asignó el número de acceso FERM P-14690. A continuación, se convirtió en un depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest el 29 de septiembre de 1995 y se le asignó el número de acceso FERM BP-5252 (patente US nº 5.827.698). La cepa WC196ΔcadAΔldc misma también es una bacteria productora de L-lisina preferente. El plásmido pCABD2 contiene un gen *dapA* mutante obtenido de *Escherichia coli* y codificante de una dihidrodipicolinato sintasa (DDPS) que presenta una mutación para la desensibilización frente a la inhibición por retroalimentación por la L-lisina, un gen *lysC* mutante obtenido de *Escherichia coli* y codificante de la aspartocinasa III que presenta una mutación para la desensibilización frente a la inhibición por retroalimentación por la L-lisina, el gen *dapB* obtenido de *Escherichia coli* y codificante de dihidrodipicolinato reductasa y el gen *ddh* obtenido de *Brevibacterium lactofermentum* y codifciante de diaminopimelato deshidrogenasa.

Bacterias productoras de L-cisteína

La capacidad de producción de L-cisteína de una bacteria puede mejorarse incrementando la actividad de un enzima de la ruta biosintética de la L-cisteína o un enzima que participa en la producción de un compuesto que sirve como sustrato de dicha ruta, tal como la L-serina, por ejemplo la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, la serina acetiltransferasa y otros. La 3-fosfoglicerato deshidrogenasa es objeto de la inhibición por retroalimentación por la serina y, por lo tanto, la actividad de dicho enzima puede incrementarse mediante la incorporación de un gen *serA* mutante que codifica para una 3-fosfoglicerato deshidrogenasa mutante para la que se ha atenuado o eliminado la inhibición por retroalimentación en una bacteria.

Además, la serina acetiltransferasa está sometida a la inhibición por retroalimentación por la L-cisteína. Por lo tanto, la actividad de dicho enzima puede incrementarse mediante la incorporación en una bacteria de un gen cysE mutante codificante de una serina acetiltransferasa para la que la inhibición por retroalimentación se encuentre atenuada o eliminada. Como gen codificante de SAT de *Escherichia coli*, se ha clonado *cycE* a partir de una cepa de tipo salvaje y una cepa mutante de excreción de L-cisteína y la secuencia de nucleótidos de la misma ha sido caracterizada (Denk D. y Boeck A., J. General Microbiol. 133:515-525, 1987). La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos se muestran en SEC ID nº 37 y nº 38.

La capacidad de producción de L-cisteína también puede mejorarse incrementando la actividad del sistema de transporte de sulfato/tiosulfato. El grupo de proteínas del sistema de transporte de sulfato/tiosulfato está codificado por el grupo génico *cysPTWAM* (patente japonesa abierta al público nº 2005-137369, patente europea EP 1 528 108).

La capacidad de producción de L-cisteína de una bacteria también puede mejorarse incrementando la expresión del gen *yeaS* (patente europea abierta al público EP 1 016 710). La secuencia de nucleótidos del gen *yeaS* y la secuencia de aminoácidos codificada por el gen se muestra en SEC ID nº 39 y nº 40, respectivamente. Es conocido que las bacterias utilizan diversos codones, tales como GTG, además de ATG, como el codón de inicio (http://depts.washington.edu/agro/genomes/students/stanstart.htm). Aunque el aminoácido correspondiente al codón de inicio *gtg* se indica como Val en las SEC ID nº 39 y nº 40, es altamente probable que de hecho sea Met.

Entre los ejemplos específicos de bacterias *Escherichia* que presentan la capacidad de producción de L-cisteína y

las cepas parentales que pueden utilizarse para obtener dichas bacterias se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, bacterias *Escherichia* tales como *E. coli* JM15 transformada con diferentes alelos del gen *cysE* codificantes de serina acetiltransferasa resistente a la inhibición por retroalimentación (patente US nº 6.218.168, solicitud de patente rusa nº 2003121601), *E. coli* W3110 en la que se sobreexpresa un gen codificante de una proteína responsable de la excreción de sustancias citotóxicas (patente US nº 5.972.663), la cepa de *E. coli* que presenta una actividad de cisteína desulfhidrasa reducida (patente japonesa abierta al público nº 11-155571) y *E. coli* W3110 en la que la actividad del factor de control transcripcional positivo del regulón de la cisteína codificado por el gen *cysB* se encuentra incrementada (documento WO01/27307).

La capacidad de producción de L-cisteína de una bacteria puede mejorarse mediante la modificación de la bacteria de manera que la actividad de la proteína codificada por *yhaM* (en lo sucesivo también denominada "YhaM") se encuentre reducida. El gen *yhaM* es igual a los genes *ECK3099, b4470* y *yhaN*, y en el pasado también se ha denominado *b3109* o *b3108*.

Entre los ejemplos de bacterias *Pantoea* que presentan capacidad de producción de L-cisteína se incluyen una cepa de *Pantoea ananatis* modificada de manera que la actividad de cisteína desulfhidrasa se encuentra reducida y una cepa de *Pantoea ananatis* que presenta un gen codificante de una serina acetiltransferasa mutante para la que la inhibición por retroalimentación por la L-cisteína se encuentra reducida. Entre los ejemplos de cepas parentales para el cultivo de dichas bacterias productoras de L-cisteína se incluyen la cepa *Pantoea ananatis* AJ13355, la cepa SC17 y la cepa SC17(0). La cepa AJ13355 es una cepa aislada a partir del suelo en Iwata-shi, Shizuoka-ken, Japón, como cepa que puede proliferar en un medio de pH bajo que contiene ácido L-glutámico y una fuente de carbono, y la cepa SC17 es una cepa seleccionada como cepa mutante de baja producción de flema de la cepa AJ13355 (patente US nº 6.596.517). La cepa *Pantoea ananatis* AJ13355 ha sido depositada en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (actualmente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, dirección: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 19 de febrero de 1998 y a la que se ha asignado el número de acceso FERM P-16644. Después ha sido convertida a un depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest, el 11 de enero de 1999, y se le ha asignado el número de acceso FERM BP-6614. La cepa SC17(0) es una cepa construida como cepa resistente al producto del gen *Red* de λ para realizar la disrupción génica en *Pantoea ananatis* (ver el ejemplo de referencia 1).

A la cepa SC17 se le ha proporcionado el número privado AJ416 y ha sido depositada en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (dirección: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 4 de febrero de 2009 como depósito internacional y se le asignó el número de acceso FERM BP-11091. La cepa SC17(0) se depositó en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika (dirección: Rusia, 117545 Moscú, 1 Dorozhny proezd. 1) el 21 de septiembre de 2005 con el número de acceso VKPM B-9246.

Una parte de la L-cisteína producida por una bacteria puede convertirse en L-cistina en el medio mediante la formación de enlaces disulfuro. Además, tal como se indica posteriormente, puede generarse S-sulfocisteína mediante la reacción de la L-cisteína y el ácido tiosulfúrico contenido en el medio (Szczepkowski T.W., Nature 182, 1958). Además, la L-cisteína generada en las células bacterianas puede condensarse con una cetona, aldehído o, por ejemplo, ácido pirúvico, que existe en las células, para producir un derivado tiazolidina mediante un hemitiocetal como intermediario (ver la patente japonesa nº 2992010). Estos derivados tiazolidina y hemitiocetal pueden existir como mezcla en equilibrio. Por lo tanto, la capacidad de producción de L-cisteína no se encuentra limitada a la capacidad de acumular únicamente L-cisteína en el medio o en las células, sino que también incluye la capacidad de acumular, además de la L-cisteína, L-cistina o un derivado de la misma, tal como S-sulfocisteína, un derivado tiazolidina, o un hemitiocetal o una mezcla de los mismos, en el medio.

Bacterias productoras de L-leucina

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-leucina y cepas parentales para obtener bacterias productoras de L-leucina se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tal como las cepas de *E. coli* resistentes a la leucina (por ejemplo la cepa 57 (VKPM B-7386, patente US nº 6.124.121) o análogos de leucina, incluyendo β-2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluoroleucina (publicación de patente japonesa nº 62-34397 y patente japonesa abierta al público nº 8-70879); cepas de *E. coli* obtenidas mediante el procedimiento de ingeniería genética descrito en el documento WO96/06926, *E. coli* H-9068 (patente japonesa abierta a público nº 8-70879) y similares.

La bacteria utilizada para la presente invención puede mejorarse mediante el incremento de la expresión de uno o más genes que participan en la biosíntesis de la L-leucina. Entre los ejemplos de dichos genes se incluyen los genes del operón *leuABCD*, un ejemplo típico del cual es un gen *leuA* mutante codificante de la isopropil malato sintasa desensibilizada frente a la inhibición por retroalimentación por L-leucina (patente US nº 6.403.342). Además, la bacteria utilizada para la presente invención puede mejorarse mediante el incremento de la expresión de uno o más genes codificantes de proteínas que excretan L-aminoácido a partir de la célula bacteriana. Entre los ejemplos de dichos genes se incluyen los genes *b2682* y *b2683* (genes *ygaZH*) (patente europea abierta al público

EP 1 239 041 A2).

Bacterias productoras de L-histidina

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-histidina y cepas parentales para obtener bacterias productoras de L-histidina se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tales como *E. coli* cepa 24 (VKPM B-5945, RU2003677), *E. coli* cepa 80 (VKPM B-7270, RU2119536), *E. coli* NRRL B-12116 - B12121 (patente US nº 4.388.405), *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675) y H-9343 (FERM BP-6676) (patente US nº 6.344.347), *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (patente europea EP 1 085 087), *E. coli* AI80/pFM201 (patente US nº 6.258.554) y similares.

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-histidina y cepas parentales para obtener bacterias productoras de L-histidina se incluyen además cepas en las que se ha incrementado la expresión de uno o más genes codificantes de un enzima biosintético de la L-histidina. Entre los ejemplos de dichos genes se incluyen genes codifciantes de la ATP fosforibosiltransferasa (*hisG*), de la fosforibosil AMP ciclohidrolasa (*hisI*), de la fosforibosil-ATP pirofosfohidrolasa (*hisIE*), de la fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamitida ribótido isomerasa (*hisA*), amidotransferasa (*hisH*), histidinol fosfato aminotransferasa (*hisC*), histidinol fosfatasa (*hisB*), histidinol deshidrogenasa (*hisD*) y similares.

Es conocido que los enzimas biosintéticos de la L-histidina codificados por *hisG* e *hisBHAFI* resultan inhibidos por la L-histidina y, por lo tanto, una capacidad de producción de L-histidina también puede incrementarse eficientemente mediante la introducción de una mutación que confiere resistencia a la inhibición por retroalimentación en el gen ATP fosforibosiltransferasa (*hisG*) (patentes rusas nº 2003677 y nº 2119536).

Entre los ejemplos específicos de cepas que presentan una capacidad de producción de L-histidina se incluyen *E. coli* FERM P-5038 y 5048 en las que se ha introducido un vector que porta un ADN codificante de un enzima biosintético de la L-histidina (patente japonesa abierta al público nº 56-005099), cepas de *E. coli* en las que se ha introducido un gen para la exportación de un aminoácido (patente europea abierta al público nº 1016710), la cepa *E. coli* 80 a la que se ha proporcionado resistencia a sulfaguanidina, a DL-1,2,4-triazol-3-alanina y a estreptomicina (VKPM B-7270, patente rusa nº 2119536) y similares.

Bacterias productoras de ácido L-glutámico

Entre los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas parentales para obtener bacterias productoras de ácido L-glutámico se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tales como *E. coli* VL334thrC$^+$ (patente europea EP 1 172 433). *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) es una cepa auxotrófica para la L-isoleucina y para la L-treonina que presenta mutaciones en los genes *thrC* e *ilvA* (patentes US nº 4.278.765). Se transfirió un alelo de tipo salvaje del gen *thrC* mediante el procedimiento de transducción general utilizando un bacteriófago P1 cultivado en células de la cepa de tipo salvaje *E. coli* K12 (VKPM B-7). Como resultado, se obtuvo la cepa auxotrófica para L-isoleucina VL334thrC$^+$ (VKPM B-8961).

Entre los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas parentales para obtener bacterias productoras de ácido L-glutámico se incluyen además, aunque sin limitarse a ellas, cepas en las que se ha incrementado la actividad de uno o más enzimas biosintéticos del ácido L-glutámico. Entre los ejemplos de dichos genes se incluyen genes codificantes de glutamato deshidrogenasa (*gdhA*), glutamina sintetasa (*glnA*), glutamato sintetasa (*gltAB*), isocitrato deshidrogenasa (*icdA*), aconitato hidratasa (*acnA*, *acnB*), citrato sintasa (*gltA*), metilcitrato sintasa (*prpC*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), piruvato deshidrogenasa (*aceEF*, *lpdA*), piruvato cinasa (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintasa (*ppsA*), enolasa (*eno*), fosfogliceromutasa (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato cinasa (*pgk*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapA*), triosa fosfato isomerasa (*tpiA*), fructosa bisfosfato aldolasa (*fbp*), fosfofructocinasa (*pfkA*, *pfkB*), glucosa fosfato isomerasa (*pgi*) y similares. Entre dichos enzimas resultan preferidas la glutamato deshidrogenasa, la citrato sintasa, la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la metilcitrato sintasa.

Entre los ejemplos de cepas que han sido modificadas de manera que la expresión del gen citrato sintetasa, el gen fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o el gen glutamato deshidrogenasa se encuentre incrementada se incluyen las dadas a conocer en las patentes europeas abiertas al público EP 1 078 989, EP 0 955 368 y EP 0 952 221.

La capacidad de síntesis del ácido L-glutámico de una bacteria puede mejorarse incrementando la actividad de un enzima que participa en la cadena respiratoria, por ejemplo un enzima oxidante terminal respiratorio resistente a cianuro (*cioA*, *cioB*).

Entre los ejemplos de bacterias productoras de ácido L-glutámico y cepas parentales para obtener bacterias productoras de ácido L-glutámico se incluyen además cepas en las que la actividad de un enzima que cataliza la síntesis de un compuesto diferente del ácido L-glutámico apartando la síntesis de la ruta biosintética del ácido L-glutámico o la actividad de un enzima que cataliza una reacción de descomposición o consumo de ácido L-glutámico se encuentra reducida o anulada. Entre los ejemplos de dichos enzimas se incluyen la isocitrato liasa (*aceA*), la α-

cetoglutarato deshidrogenasa (*sucA*), la fosfotransacetilasa (*pta*), la acetato cinasa (*ack*), la ácido acetohidroxi sintasa (*ilvG*), la acetolactato sintasa (ilvI), la formato acetiltransferasa (*pfl*), la lactato deshidrogenasa (*ldh*), la glutamato descarboxilasa (*gadAB*), la γ-glutamil transferasa (*gtt*), la γ-glutamilcisteína sintetasa (*gshA*), la γ-glutamilputrescina sintetasa (*ycjK*) y otros. Las bacterias *Escherichia* sin actividad de α-cetoglutarato deshidrogenasa o con actividad reducida de α-cetoglutarato deshidrogenasa y procedimientos de obtención de dichas bacterias se describen en las patentes US nº 5.378.616 y nº 5.573.945.

Específicamente, entre dichas cepas se incluyen las siguientes:

E. coli W3110sucA::Km^r

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

La cepa *E. coli* W3110sucA::Km^r se obtiene mediante disrupción del gen α-cetoglutarato deshidrogenasa (en lo sucesivo también denominada "gen *sucA*") de *E. coli* W3110. Esta cepa es completamente deficiente en α-cetoglutarato deshidrogenasa.

Entre otros ejemplos de bacteria productora de ácido L-glutámico se incluyen bacterias *Escherichia* que son resistentes a un antimetabolito de ácido aspártico. Estas cepas también pueden ser deficientes en α-cetoglutarato deshidrogenasa y entre ellas se incluyen, por ejemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (patente US nº 5.908.768), FERM P-12379, que adicionalmente se encuentra reducida en una actividad para descomponer el ácido L-glutámico (patente US nº 5.393.671), AJ13138 (FERM BP-5565) (patente US nº 6.110.714) y otros.

Entre los ejemplos de bacteria productora de ácido L-glutámico de *Pantoea ananatis* se incluye la cepa *Pantoea ananatis* AJ13355 indicada anteriormente.

Además, entre los ejemplos de bacteria productora de ácido L-glutámico de *Pantoea ananatis* se incluyen además bacterias *Pantoea* deficientes en actividad de α-cetoglutarato deshidrogenasa (αKGDH) o que presentan una actividad reducida de αKGDH. Entre los ejemplos de dicha cepa se incluyen AJ13356 (patente US nº 6.331.419), que se obtuvo mediante deleción del gen subunidad αKGDH-E1 (*sucA*) en AJ13355 y la cepa SC17sucA (patente US nº 6.596.517) que tampoco presenta el gen *sucA* y se seleccionó a partir de AJ13355 por sus propiedades de baja producción de flema. La cepa AJ13356 se depositó en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (actualmente una agencia administrativa independiente: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón, código postal: 305-8566)) el 19 de febrero de 1998 y se le asignó el número de acceso FERM P-16645. Después, el depósito se convirtió en depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest el 11 de enero de 1999 y se le asignó el número de acceso FERM BP-6616. Aunque las cepas AJ13355 y AJ13356 fueron depositadas en el depósito anteriormente indicado como *Enterobacter agglomerans*, en la presente memoria se hace referencia a las mismas como *Pantoea ananatis*. A la cepa SC17sucA se le asignó el número privado AJ417 y fue depositada en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, el 26 de febrero de 2004, bajo el número de acceso FERM BP-08646.

Entre los ejemplos de bacterias *Pantoea ananatis* productoras de ácido L-glutámico se incluyen las cepas SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB, AJ13601, NP106 y NA1. La cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB se obtuvo mediante la introducción del plásmido RSFCPG que contenía el gen citrato sintasa (*gltA*), el gen fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppsA*) y el gen glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) obtenidos de *Escherichia coli* y el plásmido pSTVCB que contenía el gen citrato sintasa (*gltA*) obtenido de *Brevibacterium lactofermentum* en la cepa SC17sucA. La cepa AJ13601 se seleccionó de la cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB por su resistencia a una concentración elevada de ácido L-glutámico a pH bajo. Además, se obtuvo la cepa NP106 a partir de la cepa AJ13601 mediante la eliminación del plásmido RSFCPG+pSTVCB. La cepa AJ13601 se depositó en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón, código postal: 305-8566) el 18 de agosto de 1999 y se le asignó el número de acceso FERM P-17516. Después, el depósito se convirtió en depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest el 6 de julio de 2000 y se le asignó el número de acceso FERM BP-7207. Además, la cepa NP106 que presentaba RSFPPG en la que el gen *gltA* de RSFCPG indicado anteriormente se había sustituido por *prpC* (ver el documento WO2008/020654 y los ejemplos indicados posteriormente) también es una bacteria productora de ácido L-glutámico preferente.

<u>Bacterias productoras de L-fenilalanina</u>

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-fenilalanina y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener

bacterias productoras de L-fenilalanina se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cepas bacterianas de *Escherichia*, tales como *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyR) (VKPM B-8197), que no presenta corismato mutasa-prefenato deshidrogenasa y el represor de tirosina (documento WO03/044191), *E. coli* HW1089 (ATCC nº 55371), que contiene un gen *pheA34* de tipo mutante que codifica para corismato mutasa-prefenato deshidratasa que ha sido mutado para desensibilizarse frente a la inhibición por retroalimentación (patente US nº 5.354.672), *E. coli* MWEC101-b (KR8903681), *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 y NRRL B-12147 (patente US nº 4.407.952). Además, las cepas siguientes pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-fenilalanina: *E. coli* K12 [W3110 (tyrA)/pPHAB] (FERM BP-3566) que contiene genes codificantes para corismato mutasa-prefenato deshidratasa que ha sido mutado para desensibilizarlo frente a la inhibición por retroalimentación, *E. coli* K12 [W3110(tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. coli* K12 [W3110(tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662) y *E. coli* K-12 [W3110(tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] (también conocido como AJ12604 (FERM BP-3579) (patente europea nº 488424 B1). Además, también pueden utilizarse bacterias *Escherichia* productoras de L-fenilalanina con actividad incrementada de la proteína codificada por el gen *yedA* o el gen *yddG* (solicitudes publicadas de patente US nº 2003/0148473 y nº 2003/0157667, documento WO03/044192).

Bacterias productoras de L-triptófano

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-triptófano se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cepas bacterianas de *Escherichia*, tales como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) y *E. coli* JP6015/pMU91 (DSM10123) que no presentan triptofanil-ARNt sintetasa codificada por un gen *trpS* mutante (patente US nº 5.756.345), *E. coli* SV164 (pGH5) que contiene el alelo *serA* codificante de fosfoglicerato deshidrogenasa y el alelo *trpE* codificante de antranilato sintasa, los cuales se encuentran desensibilizados frente a la inhibición por retroalimentación por serina y triptófano, respectivamente (patente US nº 6.180.373), *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) y *E. coli* AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) que no presentan triptofanasa (patente US nº 4.371.614) y *E. coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps en el que se encuentra incrementada la capacidad de producción de fosfoenolpiruvato (documento WO97/08333, patente US nº 6.319.696). También pueden utilizarse las bacterias productoras de L-triptófano pertenecientes al género *Escherichia* con actividad incrementada de la proteína codificada por el gen *yedA* o el gen *yddG* (solicitudes publicadas de patente US nº 2003/0148473 y nº 2003/0157667).

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-triptófano se incluyen además cepas en las que se encuentran incrementadas una o más actividades de los enzimas siguientes: antranilato sintasa (*trpE*), fosfoglicerato deshidrogenasa (*serA*), 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa (*aroG*), 3-deshidroquinato sintasa (*aroB*), shikimato deshidrogenasa (*aroE*), shikimato cinasa (*aroL*), 5-enopiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (*aroA*), corismato sintasa (*aroC*), prefenato deshidratasa, corismato mutasa y triptófano sintasa (*trpAB*). La prefenato deshidratasa y la corismato mutasa se encuentran codificadas por el gen *pheA* como enzima bifuncional (CM-PD). Entre estos enzimas resultan particularmente preferentes la fosfoglicerato deshidrogenasa, la 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa, la 3-deshidroquinato sintasa, la shikimato deshidratasa, la shikimato cinasa, la 5-enopiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, la corismato sintasa, la prefenato deshidratasa y la corismato mutasa-prefenato deshidratasa. La antranilato sintasa y la fosfoglicerato deshidrogenasa adolecen de inhibición por retroalimentación por L-triptófano y L-serina y, por lo tanto, puede introducirse una mutación desensibilizadora de la inhibición por retroalimentación en los genes codificantes de dichos enzimas. Entre los ejemplos específicos de cepas que presentan dicha mutación se incluyen *E. coli* SV164 con una antranilato sintasa de tipo desensibilizado y una cepa transformante obtenida mediante la introducción de un plásmido pGH5 (documento WO94/08031) que contiene un gen *serA* mutante codificante de fosfoglicerato deshidrogenasa desensibilizada frente a la inhibición por retroalimentación en *E. coli* SV164.

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-triptófano y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-triptófano se incluyen además cepas que han sido transformadas con el operón triptofano que contiene un gen codificante de antranilato sintasa desensibilizada frente a la inhibición (patentes japonesas abiertas al público 57-71397, 62-244382; patente US nº 4.371.614). Además, puede proporcionarse una capacidad de producción de L-triptófano mediante el incremento de la expresión de un gen que codifica triptófano sintasa en el operón triptófano (*trpBA*). La triptófano sintasa incluye subunidades tanto α como β, las cuales se encuentran codificadas por *trpA* y *trpB*, respectivamente. Además, la capacidad de producción de L-triptófano puede mejorarse mediante el incremento de la expresión del operón isocitrato liasa-malato sintasa (documento WO2005/103275).

Bacterias productoras de L-prolina

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-prolina y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-prolina se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cepas bacterianas de *Escherichia*, tales como *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012) que no presenta el gen *ilvA* y puede producir L-prolina (patente europea EP 1 172 433).

La bacteria utilizada para la presente invención puede mejorarse mediante el incremento de la expresión de uno o más genes participantes en la biosíntesis de la L-prolina. Entre los ejemplos de genes preferentes para las bacterias productoras de L-prolina se incluyen el gen *proB* codificante de glutamato cinasa que ha sido desensibilizada frente

a la inhibición por retroalimentación por L-prolina (patente DE 3127361). Además, la bacteria utilizada para la presente invención puede mejorarse mediante el incremento de la expresión de uno o más genes codificantes de proteínas responsables de la secreción de L-aminoácidos de la célula bacteriana. Son ejemplos de dichos genes, los genes b2682 y b2683 (genes *ygaZH*) (patente europea abierta al público EP 1 239 041 A2).

Entre las bacterias *Escherichia* que producen L-prolina se incluyen las cepas de *E. coli* siguientes: NRRL B-12403 y NRRL B-12404 (patente GB 2075056), VKPM B-8012 (solicitud de patente rusa 2000124295), mutantes plasmídicos descritos en la patente DE 3127361, mutantes plasmídicos descritos por Bloom F.R. et al. (The 15th Miami Winter Symposium, 1983, página 34), etc.

Bacterias productoras de L-arginina

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-arginina y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-arginina se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cepas bacterianas de *Escherichia*, tales como *E. coli* cepa 237 (VKPM B-7925) (solicitud publicada de patente US nº 2002/058315 A1) y las cepas derivadas de la misma que incluyen N-acetilglutamato sintasa mutante (solicitud de patente rusa nº 2001112869), *E. coli* cepa 382 (VKPM B-7926) (patente europea abierta al público nº 1170358 A1) y una cepa productora de arginina transformada con un gen *argA* codificante de N-acetilglutamato sintetasa (patente europea abierta al público EP 1 170 361 A1).

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-arginina y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-arginina se incluyen además cepas en las que ha sido incrementada la expresión de uno o más genes codificantes de un enzima biosintético de la L-arginina. Entre los ejemplos de dichos genes se incluyen el gen N-acetilglutamil fosfato reductasa (*argC*), el gen ornitina acetil transferasa (*argJ*), el gen N-acetilglutamato cinasa (*argB*), el gen acetil-ornitina transaminasa (*argD*), el gen ornitina carbamoil transferasa (*argF*), el gen ácido argininosuccínico sintetasa (*argG*), el gen ácido argininosuccínico liasa (*argH*) y el gen carbamoil fosfato sintetasa (*carAB*).

Bacterias productoras de L-valina

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-valina y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-valina se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, cepas que han sido modificadas para sobreexpresar el operón *ilvGMEDA* (patente US nº 5.998.178). Resulta deseable eliminar la región en el operón *ilvGMEDA* que resulta necesaria para la atenuación, de manera que la expresión del operón no resulte atenuada por la L-valina producida. Además, el gen *ilvA* en el operón deseablemente se interrumpe de manera que se reduzca la actividad de treonina desaminasa.

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-valina y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-valina se incluyen además mutantes que presentan mutaciones de amino-acil ARNt sintetasa (patente US nº 5.658.766). Un ejemplo es *E. coli* VL1970, que presenta una mutación en el gen *ileS* codificante de la isoleucina ARNt sintetasa. *E. coli* VL1970 ha sido depositada en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Rusia), el 24 de junio de 1988, bajo el número de acceso VKPM B-4411.

Además, las cepas mutantes que requieren ácido lipoico para el crecimiento yo que no presentan H^+-ATPasa (documento WO96/06926) también resultan eficaces para obtener bacterias productoras de L-valina.

Bacterias productoras de L-isoleucina

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-isoleucina y cepas parentales que pueden utilizarse para obtener bacterias productoras de L-isoleucina se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, mutantes que son resistentes a la 6-dimetilaminopurina (patente japonesa abierta al público nº 5-304969), mutantes que son resistentes a análogos de isoleucina, tales como tioisoleucina e hidroxamato de isoleucina, y mutantes que son adicionalmente resistentes a DL-etionina y/o hidroxamato de arginina (patente japonesa abierta al público nº 5-130882). Además, las cepas recombinantes transformadas con genes codificantes de proteínas que participan en la biosíntesis de la L-isoleucina, tales como la treonina desaminasa y la acetohidroxato sintasa, también resultan eficaces para obtener bacterias productoras de L-isoleucina (patente japonesa abierta al público nº 2-458, patente FR nº 0356739 y patente US nº 5.998.178).

Bacterias productoras de L-tirosina

Entre los ejemplos de bacterias productoras de L-tirosina se incluyen bacterias *Escherichia* con un gen prefenato deshidratasa (*tyrA*) desensibilizado respecto a la inhibición por la tirosina (patente europea abierta al público EP 1 616 940).

En el caso de que las bacterias productoras de L-aminoácido anteriormente indicadas se cultiven mediante

recombinación genética, los genes que deben utilizarse no se encuentran limitados a los genes que presentan la información genética indicada anteriormente o los genes que presentan secuencias conocidas, sino que también incluyen genes que presentan mutaciones conservadoras, tales como homólogos o genes artificialmente modificados, los cuales también pueden utilizarse con la condición de que no resulten degradadas las funciones de las proteínas codificadas. Es decir, pueden existir genes codificantes de una secuencia de aminoácidos conocida que contenga una o más sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones o similares de uno o varios residuos aminoácidos en una o varias posiciones.

Aunque el número de los "varios" residuos aminoácidos a los que se hace referencia en la presente memoria puede diferir dependiendo de la posición en la estructura tridimensional o de los tipos de residuos aminoácidos de la proteína, específicamente puede ser preferentemente de entre 1 y 20, más preferentemente de entre 1 y 10 y todavía más preferentemente de entre 1 y 5. La mutación conservadora es una mutación en la que la sustitución tiene lugar mutuamente de entre Phe, Trp y Tyr, en el caso de que el sitio de sustitución sea un aminoácido aromático; de entre Leu, Ile y Val en el caso de que sea un aminoácido hidrofóbico; de entre Gln y Asn en el caso de que sea un aminoácido polar; de entre Lys, Arg y His en el caso de que sea un aminoácido básico; de entre Asp y Glu en el caso de que sea un aminoácido ácido, y de entre Ser y Thr, en el caso de que sea un aminoácido que presente un grupo hidroxilo. La mutación conservadora típicamente es una sustitución conservadora y entre la sustituciones consideradas sustituciones conservadoras se incluyen, específicamente, sustituciones de Ser o Thr por Ala, la sustitución de Gln, His o Lys por Arg, la sustitución de Glu, Gln, Lys, His o Asp por Asn, la sustitución de Asn, Glu o Gln por Asp, la sustitución de Ser o Ala por Cys, la sustitución de Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg por Gln, la sustitución de Gly, Asn, Gln, Lys o Asp por Glu, la sustitución de Pro por Gly, la sustitución de Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr por His, la sustitución de Leu, Met, Val o Phe por Ile, la sustitución de Ile, Met, Val o Phe por Leu, la sustitución de Asn, Glu, Gln, His o Arg por Lys, la sustitución de Ile, Leu, Val o Phe por Met, la sustitución de Trp, Tyr, Met, Ile o Leu por Phe, la sustitución de Thr o Ala por Ser, la sustitución de Ser o Ala por Thr, la sustitución de Phe o Tyr por Trp, la sustitución de His, Phe o Trp por Tyr, y la sustitución de Met, Ile o Leu por Val. Las sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones, inversiones o similares de aminoácidos anteriormente indicadas puede ser el resultado de una mutación natural o de una variación debida a una diferencia individual o una diferencia de especie de un microorganismo del que se derivan los genes (mutantes o variantes). Dichos genes pueden obtenerse mediante, por ejemplo, la modificación de una secuencia de nucleótidos conocida de un gen mediante mutagénesis específica de sitio de manera que entre los residuos aminoácidos en los sitios específicos de la proteína codificada se incluyen sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones de residuos aminoácidos.

Además, dichos genes que presentan una o más mutaciones conservadoras tal como se ha indicado anteriormente pueden codificar una proteína que presenta una homología de 80% o superior, preferentemente de 90% o superior, más preferentemente de 95% o superior, particularmente preferentemente de 97% o superior, respecto a la secuencia de aminoácidos codificada completa y que presentan una función equivalente a la de la proteína de tipo salvaje. En la presente memoria, el término "homología" también puede utilizarse para referirse a "identidad".

Además, los codones en las secuencias génicas pueden sustituirse por otros codones que son fácilmente utilizados en el huésped en el que se introducen los genes.

Los genes que presentan una o más mutaciones conservadoras pueden obtenerse mediante procedimientos utilizados habitualmente en tratamientos de mutagénesis, tales como los tratamientos con agentes de mutagénesis.

Además, los genes pueden ser un ADN que puede hibridarse con una secuencia complementaria de una secuencia génica conocida o una sonda que puede prepararse a partir de la secuencia complementaria bajo condiciones restrictivas y codifica una proteína que presenta una función equivalente a la del producto génico conocido. Las "condiciones restrictivas" a las que se hace referencia en la presente memoria son condiciones bajo las que se forma un denominado híbrido específico y no se forma un híbrido no específico. Entre los ejemplos de condiciones restrictivas se incluyen aquellos bajo los que se hibridan entre sí los ADN altamente homólogos, por ejemplo. Los ADN con una homología inferior al 80%, preferentemente no inferior a 90%, más preferentemente no inferior a 95%, particularmente preferentemente no inferior a 97%, se hibridan entre sí, y los ADN con homología inferior a la anteriormente indicada no se hibridan entre sí, o condiciones de lavado de una vez, preferentemente 2 o 3 veces, a una concentración salina y temperatura correspondientes al lavado típico de la hibridación southern, es decir, 1xSSC, SDS al 0,1% a 60ºC, preferentemente 0,1xSSC, SDS al 0,1% a 60ºC, más preferentemente 0,1xSSC, SDS al 0,1% a 68ºC.

Como sonda puede utilizarse una parte de la secuencia que es complementaria al gen. Dicha sonda puede prepararse mediante PCR utilizando oligonucleótidos preparados basándose en la secuencia génica conocida como cebadores y un fragmento de ADN que contiene las secuencias de nucleótidos como molde. Por ejemplo, en el caso de que se utilice como sonda un fragmento de ADN que presenta una longitud de aproximadamente 300 pb, las condiciones de lavado de la hibridación pueden ser 50ºC, 2xSSC y SDS al 0,1%.

Las descripciones anteriormente indicadas referentes a variantes de genes se aplican de manera similar al gen *gcd* indicado a continuación.

<2-2> Reducción de la actividad de GCD

A continuación en la presente memoria se explica la modificación de una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* para reducir la actividad de GCD del mismo.

La actividad de GCD se refiere a la actividad que cataliza la reacción siguiente:

β-D-Glucosa + PQQ oxidado --> D-δ-gluconolactona + PQQ reducido

La actividad de GCD puede medirse, por ejemplo, basándose en la detección de la generación de DCPIP reducido mediante las reacciones siguientes, mediante espectrometría a 600 nm (patente japonesa abierta al público nº 2007-129965).

D-Glucosa + PMS oxidado --> D-glucono-1,5-lactona + PMS reducido

PMS reducido + DCPIP oxidado --> PMS oxidado + DCPIP reducido

PMS: metosulfato de fenazina

DCPIP: 2,6-diclorofenolindofenol

La expresión "modificado de manera que se reduce la actividad de GCD" se refiere a que la actividad de GCD por célula de bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* se ha reducido a una inferior a la de una cepa no modificada, tal como una cepa de tipo salvaje, de la bacteria. Esto significa, por ejemplo, que se reduce el número de moléculas de GCD por cada célula respecto a las de la cepa parental o una cepa de tipo salvaje, o que la actividad de GCD por molécula se reduce respecto a la de la cepa parental o la de una cepa de tipo salvaje. La actividad de GCD por cada célula puede compararse mediante la comparación de las actividades de GCD en extractos celulares de una cepa de tipo salvaje o parental y una cepa modificada cultivada bajo las mismas condiciones. El término "reducción" de la actividad incluye la desaparición completa de la actividad.

La bacteria *Pantoea* de tipo salvaje utilizada como referencia para la comparación era, por ejemplo, *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6615) o similares.

La reducción de la actividad de GCD se consiguió mediante inactivación del gen codificante de GCD (*gcd*). La "inactivación" del gen *gcd* se refiere a dicha modificación del gen mediante recombinación génica o la introducción de una mutación en el gen de manera que la actividad de GCD codificada por el gen resulta reducida o eliminada.

Entre los ejemplos del gen *gcd* se incluyen el gen *gcd* de *Pantoea ananatis* que presenta la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 1. La secuencia de aminoácidos de GCD codificada por dicho gen *gcd* se muestra en la SEC ID nº 2. El gen *gcd* puede clonarse llevando a cabo una PCR utilizando oligonucléotidos sintéticos sintetizados basándose en la secuencia y cromosoma anteriormente indicados de *Pantoea ananatis* a modo de molde. Además, en el caso de que se delecione el gen *gcd* mediante recombinación homóloga, también puede utilizarse un gen que muestre una homología superior a un determinado nivel, por ejemplo de 80% o superior, preferentemente de 90% o superior, más preferentemente de 95% o superior, respecto al gen *gcd* en un cromosoma. Además, también puede utilizarse un gen hibridable con el gen *gcd* en un cromosoma bajo condiciones restrictivas. Entre los ejemplos de las condiciones restrictivas se incluyen, por ejemplo, el lavado una vez, más preferentemente el lavado dos o tres veces, a concentraciones salinas correspondientes a 1xSSC, SDS al 0,1%, preferentemente 0,1xSSC, SDS al 0,1% a 60ºC.

Específicamente, la inactivación del gen *gcd* puede conseguirse mediante, por ejemplo, la deleción de una parte o la totalidad de la región codificante del gen *gcd* en un cromosoma, o mediante la inserción de otra secuencia en la región codificante. Estas técnicas también se denominan disrupción génica.

El gen *gcd* también puede inactivarse mediante la reducción de la expresión del gen *gcd* mediante modificación de una secuencia de control de la expresión, tal como un promotor o secuencia de Shine-Dalgarno (SD) del gen *gcd*, o similar.

La reducción de la expresión incluye la reducción de la transcripción y la reducción de la traducción. La expresión del gen también puede reducirse mediante modificación de una región no traducida diferente de las regiones de control de la expresión.

Además, puede delecionarse el gen diana entero, incluyendo regiones cadena arriba y cadena abajo del gen diana en el cromosoma. Además, la inactivación del gen *gcd* también puede llevarse a cabo mediante la introducción de una mutación para una sustitución de aminoácido (mutación de cambio de sentido), un codón de parada (mutación sin sentido) o una mutación por desplazamiento de marco que añade o deleciona uno o dos nucleótidos en o de la región codificante del gen *gcd* en un cromosoma (Journal of Biological Chemistry 272:8611-8617, 1997; Proceedings

of the National Academy of Sciences USA 95:5511-5515, 1998; Journal of Biological Chemistry 266:20833-20839, 1991).

La modificación del gen preferentemente se consigue mediante recombinación génica. Entre los ejemplos específicos del procedimiento basado en la recombinación génica se incluyen la deleción de una secuencia parcial o entera de una secuencia de control de la expresión del gen diana en un cromosoma, por ejemplo una región promotora o una región codificante o una región no codificante, y la inserción de otra secuencia en dichas regiones.

La modificación de una secuencia de control de la expresión se lleva a cabo preferentemente para uno o más nucleótidos, más preferentemente para dos o más nucleótidos, particularmente preferentemente tres o más nucleótidos. En el caso de que se delecione una región codificante, la región que debe delecionarse puede ser una región N-terminal, una región interna o una región C-terminal, o incluso la región codificante entera, con la condición de que la función de la proteína que debe producirse a partir del gen se reduzca o se delecione. La deleción de una región más larga habitualmente puede inactivar con mayor seguridad el gen diana. Además, resulta preferente que los marcados de lectura cadena arriba o abajo de la región que debe delecionarse no son iguales.

En el caso de que se inserte otra secuencia en una región codificante, la secuencia puede insertarse en cualquier región del gen diana y la inserción de una región más larga habitualmente inactivar con mayor seguridad el gen diana. Resulta preferente que los marcos de lectura cadena arriba o abajo del sitio de inserción no sean iguales. La otra secuencia no se encuentra particularmente limitada con la condición de que se seleccione una secuencia que reduzca o delecione la función de la proteína codificada por el gen diana, y entre los ejemplos se incluyen, por ejemplo, un trasposón que porta un gen de resistencia a antibiótico, un gen útil para la producción de un L-aminoácido, etc.

Dicha modificación de un gen diana en un cromosoma tal como se ha indicado anteriormente puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la preparación de un gen de tipo deleción en el que se deleciona una secuencia parcial de un gen diana de manera que no pueda producir una proteína que pueda funcionar normalmente, y transformar una bacteria con un ADN que contiene el gen de tipo deleción para causar la recombinación homóloga entre el gen de tipo deleción y el gen diana en un cromosoma y de esta manera sustituir el gen de tipo deleción por el gen diana en el cromosoma. La proteína codificada por el gen de tipo deleción presenta una conformación diferente de la de una proteína de tipo salvaje, aunque resulte producida y, de esta manera, se reduzca o se delecione la función de la misma. Dicha disrupción génica basada en la sustitución génica que utiliza la recombinación homóloga ya h sido establecida y existe un procedimiento denominado integración regulada por Red (Datsenko K.A. y Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000), un procedimiento de utilización de un ADN lineal, tal como un procedimiento que utiliza la integración controlada por Red en combinación con un sistema de excisión derivado del fago λ (Cho E.H., Gumport R.I., Gardner J.F., J. Bacteriol. 184:5200-5203, 2002), un procedimiento de utilización de un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a la temperatura o un plásmido capaz de transferencia por conjugación, un procedimiento de utilización de un vector suicida que no presenta un origen de replicación en un huésped (patente US nº 6.303.383, patente japonesa abierta al público 05-007491) y similares.

La reducción de la cantidad de transcripción de un gen diana puede confirmarse mediante la comparación de la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen diana con la observada en una cepa de tipo salvaje o una cepa no modificada. Entre los ejemplos del procedimiento para medir la cantidad de ARNm se incluyen hibridación northern, RT-PCR y otros (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Aunque la cantidad de transcripción puede reducirse en cualquier medida con la condición de que se reduzca en comparación con la observada en una cepa de tipo salvaje o no modificada, se reduce deseablemente en por lo menos 75% o menos, en 50% o menos, en 25% o menos, o en 10% o menos, de la observada en, por ejemplo, una cepa de tipo salvaje o no modificada, y resulta particularmente preferente que el gen no se exprese en absoluto.

La reducción de la cantidad de una proteína codificada por el gen diana puede confirmarse mediante transferencia western utilizando anticuerpos que se unen a la proteína (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Aunque la cantidad de la proteína puede reducirse en cualquier medida con la condición de que se reduzca en comparación con la observada en una cepa de tipo salvaje o una cepa no modificada, se reduce deseablemente en por lo menos 75% o menos, en 50% o menos, en 25% o menos o en 10% o menos, respecto a la observada en, por ejemplo, una cepa de tipo salvaje o no modificada, y resulta particularmente preferido que la proteína no se produzca en absoluto (la actividad ha desaparecido por completo).

Entre los ejemplos del procedimiento para reducir la actividad de GCD se incluyen, aparte de las técnicas de manipulación genética anteriormente indicadas, por ejemplo, un procedimiento de tratamiento de una enterobacteria tal como bacterias *Pantoea* con irradiación ultravioleta o un mutágeno utilizado para el tratamiento habitual de mutagénesis, tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o ácido nitroso, y la selección de una cepa que muestra una actividad de GCD reducida.

La actividad de GCD también puede reducirse mediante la reducción de la capacidad de síntesis de PQQ. La capacidad de síntesis de PQQ puede reducirse mediante, por ejemplo, la deleción de una parte o la totalidad de pqqABCDEF, que es el operón requerido para la biosíntesis de PQQ (J.S. Velterop, P.W. Postma, J. Bacteriology

177(17):5088-5098, 1995).

En el caso de un microorganismo que no presenta la actividad de GCD, tal como *Escherichia coli* y las bacterias corineformes, la glucosa es incorporada mediante la utilización de un transportador denominado glucosa PTS (sistema de glucosa fosfotransferasa) o glucosa permeasa. El PTS se incorpora en células en forma de glucosa 6-fosfato, que se acopla con la reacción de conversión de PEP (ácido fosfoenolpirúvico) en Pyr (ácido pirúvico). La glucosa 6-fosfato se convierte en fructosa-6-fosfato y resulta metabolizada por el denominado sistema glucolítico (EMP, ruta Embden-Myerhof) para generar ácido pirúvico.

Por otra parte, en el caso de un microorganismo que presenta la actividad de GCD, la glucosa es convertida en ácido glucónico en el espacio periplasmático, que después es incorporado por la gluconato permeasa, generando ácido 6-fosfoglucónico a partir del mismo mediante una reacción de fosforilación.

El ácido 6-fosfoglucónico es metabolizado en el ciclo de las pentosas fosfato o en la ruta de Entner-Doudoroff (ED), generando gliceraldehído 3-fosfato, ácido pirúvico y otros.

Es conocido que un microorganismo que presenta GCD, tal como las bacterias del ácido acético, presenta una característica sacarometabólica peculiar, en que convierte una parte de la glucosa en ácido glucónico en el periplasma y después la incorpora. Debido a que las capacidades de la ruta EMP intracelular, la ruta de ED y el ciclo de las pentosas fosfato son diferentes según el microorganismo, se espera que en el caso de que se delecione GCD para modificar el sacarometabolismo, puede modificarse el patrón metabólico posterior al mismo.

En el caso de *Pantoea ananatis*, se considera que, a una temperatura de cultivo habitual, por ejemplo a 34ºC, la glucosa no resulta totalmente asimilada por la GCD, y una cantidad considerable de la misma resulta asimilada por PTS. Por otra parte, en el caso de que se cultive a una temperatura elevada, por ejemplo a 38ºC, debido a que la temperatura óptima de la GCD es elevada, se espera un incremento de la actividad de GCD y del consumo de sacárido por parte de la GCD. Debido a que *Pantoea ananatis* no presenta la ruta de ED, el ácido 6-fosfoglucónico resulta deshidrogenado por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y seguidamente metabolizado en el ciclo de las pentosas fosfato. Debido a que se libera una molécula de dióxido de carbono por cada molécula de ácido 6-fosfoglucónico con la deshidrogenación por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, se espera que, en el caso de un incremento del consumo de sacárido por parte de la GCD, se reduzca la cantidad de aminoácido producida. Además, se estima que, en el caso de que el consumo de sacárido por la GCD se incremente con el cultivo a una temperatura elevada, la capacidad del ciclo de las pentosas fosfato se vuelve insuficiente y el exceso de flujo de metabolitos fluye hacia rutas que generan productos secundarios y se reduce en consecuencia el rendimiento de L-aminoácidos. Se considera que, en la presente invención, la liberación de dióxido de carbono y la superación de la capacidad de absorción del ciclo de pentosas fosfato resultan eliminados mediante la reducción de la actividad de la GCD, especialmente al llevar a cabo el cultivo a una temperatura elevada y, por lo tanto, se mejora la productividad de L-aminoácido.

Además, se estima que, también en *Pantoea ananatis* en que se ha introducido la ruta ED (patente japonesa abierta al público 2003-274988), en el caso de que el consumo de sacárido por la GCD se incremente, se reducirá el rendimiento de L-aminoácido debido a la liberación de dióxido de carbono en el momento de la deshidrogenación del ácido 6-fosfoglucónico por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y las capacidades insuficientes de la ruta de ED y del ciclo de las pentosas fosfato. Por lo tanto, se considera que se mejora la productividad de L-aminoácido mediante la reducción de la actividad de GCD también en la *Pantoea ananatis* en la que se ha introducido la ruta de ED.

La bacteria utilizada para la presente invención puede ser una bacteria en la que se ha reducido la actividad de GCD y en la que se ha incrementado adicionalmente la actividad de incorporación de sacáridos. La actividad de incorporación de sacáridos puede potenciarse mediante el incremento, por ejemplo, de la actividad de la glucosa PTS o de la glucosa permeasa. Además, es conocido que los transportadores se consideran como miembros de la superfamilia de facilitadores mayores (MFS, Griffith J.K. et al., Curr. Opin. Cell Biol. 4(4):684-95, 1992), tal como la galactosa permeasa (Flores et al., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 13:105-116, 2007), la xilosa permeasa (patente europea abierta al público 1807445 A1) y la arabinosa permeasa también presentan la actividad de incorporación de glucosa, etc. Por lo tanto, también en una bacteria en la que se ha reducido la actividad de la GCD, mediante el incremento de cualquiera de las actividades de dichos transportadores también se incrementa la incorporación de sacáridos tales como la sacarosa y se mejora la productividad de L-aminoácidos.

<2> <u>Procedimiento de producción de L-aminoácido de la presente invención</u>

Mediante el cultivo del microorganismo de la presente invención en un medio para producir y acumular un L-aminoácido en el medio y recolectar el L-aminoácido del medio, puede producirse un L-aminoácido.

Como medio utilizado para el cultivo puede utilizarse un medio típico que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales, así como nutrientes traza orgánicos, tales como aminoácidos y vitaminas, según resulte necesario. Puede utilizarse un medio sintético o un medio natural. Puede utilizarse cualquier tipo de fuente de carbono y fuente de nitrógeno con la condición de que puedan ser utilizados por la cepa que se ha

seleccionado para el cultivo.

Como la fuente de carbono pueden utilizarse azúcares tales como glucosa, glicerol, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, galactosa, hidrolizados de almidón y melaza. Además, también pueden utilizarse ácidos orgánicos, tales como ácido acético y ácido cítrico, y alcoholes tales como etanol, cada uno por sí solo o en combinación con otras fuentes de carbono. Como la fuente de nitrógeno puede utilizarse amonio, sales amónicas tales como sulfato amónico, carbonato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico y acetato amónico, sales de ácido nítrico y similares. Como los nutrientes traza orgánicos pueden utilizarse aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, ácidos nucleicos, y aquellos que contengan sustancias tales como peptona, ácidos casamino, extracto de levadura, producto de descomposición de proteínas de la soja y otros. En el caso de que se utilice una cepa mutante auxotrófica que requiera un aminoácido o similar para su crecimiento, puede aportarse el nutriente requerido.

En particular, en caso de que se utilice un medio líquido preparado para satisfacer una condición para precipitar ácido L-glutámico, la adición de ácido pantoténico al medio proporciona una precipitación más eficiente del ácido L-glutámico (documento WO2004/111258). Como sales inorgánicas pueden utilizarse sales de ácido fosfórico, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro, sales de manganeso, etc.

El cultivo puede llevarse a cabo en forma de un cultivo aeróbico, mientras que la temperatura de fermentación se controla para que sea de entre 20ºC y 45ºC y el pH sea de entre 3 y 9. En el caso de que el pH se reduzca durante el cultivo, puede añadirse carbonato de calcio o el cultivo se neutraliza con una sustancia alcalina, tal como gas amonio. El L-aminoácido diana se acumula en el medio de cultivo después de, por ejemplo, 10 a 120 horas de cultivo bajo condiciones tales como las indicadas anteriormente.

En la presente invención, aunque puede producirse eficientemente un L-aminoácido mediante cultivo a una temperatura adecuada para el crecimiento de la bacteria, el efecto se vuelve particularmente notable especialmente en el caso de que el cultivo se lleve a cabo a una temperatura elevada. Por ejemplo, en el caso de bacterias de *Pantoea*, tales como *Pantoaea ananatis*, habitualmente resulta preferente una temperatura de aproximadamente 34ºC para el crecimiento de la misma. Sin embargo, aunque la bacteria en la que se reduce la actividad de GCD muestra una capacidad de producción de L-aminoácidos más alta que la de una cepa no modificada incluso a dicha temperatura de cultivo, muestra una capacidad de producción de L-aminoácidos adicionalmente mejorada a, por ejemplo 36ºC o 38ºC.

Además, el cultivo puede llevarse a cabo mediante la precipitación de ácido L-glutámico en un medio mediante la utilización, como medio, de un medio líquido ajustado para satisfacer una condición bajo la que precipita el ácido L-glutámico. Entre los ejemplos de las condiciones bajos las que precipita el ácido L-glutámico se incluyen, por ejemplo, un pH de entre 5,0 y 4,0, preferentemente un pH de entre 4,5 y 4,0, más preferentemente un pH de entre 4,3 y 4,0, particularmente preferentemente un pH de 4,0.

En el caso de que el ácido L-glutámico precipite en el medio, la adición preliminar de cristales de ácido L-glutámico o de L-lisina como núcleos de cristalización puede proporcionar una cristalización más eficiente (patente europea 1233069; patente europea abierta al público 1624069).

La recolección del L-aminoácido a partir del caldo de cultivo tras llevar a cabo el cultivo puede llevarse a cabo mediante un procedimiento de recolección conocido. Por ejemplo, tras separar las células del medio de cultivo, el L-aminoácido puede recolectarse mediante concentración del medio para cristalizar el L-aminoácido, mediante cromatografía de intercambio iónico o similar. En el caso de que el cultivo se lleve a cabo bajo condiciones en las que precipita el ácido L-glutámico, puede recolectarse el ácido L-glutámico precipitado en el medio mediante centrifugación o filtración. En este caso, el ácido L-glutámico que se disuelve en el medio puede hacerse precipitar y después separarse conjuntamente con el ácido L-glutámico ya precipitado.

En el caso de que se produzca un aminoácido básico, la producción puede llevarse a cabo mediante un procedimiento en el que se lleva a cabo la fermentación mediante el control del pH del medio durante el cultivo a un valor de entre 6,5 y 9,0 y el control del pH después de completar el cultivo a un valor de entre 7,2 y 9,0 y mediante el control de la presión en el tanque de fermentación durante la fermentación para que sea positiva, o mediante la provisión de dióxido de carbono o un gas mixto que contiene dióxido de carbono al medio de manera que exista un periodo durante el que se encuentren presentes iones bicarbonato y/o iones carbonato a una concentración de por lo menos 2 g/l en el medio de cultivo durante el cultivo, y estos iones bicarbonato y/o iones carbonato sirven como contraiones de los cationes, consistentes principalmente del aminoácido básico y seguidamente se recolecta el aminoácido básico diana (ver la patente japonesa abierta al público 2002-065287 y la solicitud publicada de patente US nº 2002/025564).

El L-aminoácido recolectado según la presente invención puede contener células bacterianas, componentes del medio, humedad y metabolitos productos secundarios de la bacteria además del L-aminoácido objetivo. La pureza del L-aminoácido recolectado es de 50% o superior, preferentemente de 85% o superior, particularmente preferentemente de 95% o superior (patente japonesa 1214636; patentes US nº 5.431.933, nº 4.956.471, nº 4.777.051, nº 4.946.654, nº 5.840.358, nº 6.238.714 y solicitud publicada de patente US nº 2005/0025878).

En el caso de que la L-cisteína se produzca mediante el procedimiento de la presente invención, la L-cisteína obtenida puede utilizarse para la producción de derivados de L-cisteína. Entre los derivados de cisteína se incluyen metilcisteína, etilcisteína, carbocisteína, sulfocisteína, acetilcisteína y otros.

Además, en el caso de que se acumule en el medio un derivado tiazolidina de la L-cisteína, la L-cisteína puede producirse mediante la recolección del derivado tiazolidina del medio para romper el equilibrio de reacción entre el derivado tiazolidina y la L-cisteína de manera que se produzca en exceso la L-cisteína. Además, en el caso de que se acumule en el medio S-sulfocisteína, puede convertirse en L-cisteína mediante reducción con un agente reductor, tal como ditiotreitol.

Ejemplos

A continuación en la presente memoria se explica la presente invención con mayor detalle haciendo referencia a ejemplos.

Ejemplo de referencia 1: construcción de una cepa de *Pantoea ananatis* que es resistente al producto de gen Red del fago λ.

Para delecionar un gen en *Pantoea ananatis*, se construyó una cepa receptora para llevar a cabo de manera altamente eficiente el procedimiento denominado de "integración regulada por Red" o de "integración mediada por Red" (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000).

En primer lugar, se construyó el nuevo plásmido ayudante RSF-Red-TER que expresa los genes *gam*, *bet* y *exo* del fago λ (en lo sucesivo denominado "genes Red de λ") (fig. 1). Los detalles del mismo se indican en el ejemplo de referencia 2.

Dicho plásmido puede utilizarse en un amplio abanico de huéspedes que presentan diferentes fondos genéticos. Ello se debe a que: 1) dicho plásmido presenta el replicón del plásmido de amplio espectro de huéspedes RSF1010 (Scholz et al., 1989; Buchanan-Wollaston et al., 1987), que se mantiene establemente en muchos tipos de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas e incluso en células vegetales, 2) los genes Red de λ, los genes *gam*, *bet* y *exo*, se encuentran bajo el control del promotor PlacUV5, que resulta reconocido por las ARN polimerasas de muchos tipos de bacteria (por ejemplo Brunschwig E. y Darzins A., Gene 111(1):35-41, 1992; Dehio M. et al., Gene 215(2):223-229, 1998), y 3) el factor de autorregulación P_{lacUV5}-lacI y el terminador de transcripción no dependiente de ρ (TrrnB) del operón *rrnB* de *Escherichia coli* reducen el nivel basal de expresión de los genes Red de λ (Skorokhodova A. Yu et al., Biotekhnologiya (Rus.) 5:3-21, 2004). Además, el plásmido RSF-Red-TER contiene el gen levansacarasa (*sacB*) y mediante la utilización de este gen, puede recolectarse el plásmido de las células en un medio que contiene sacarosa.

En *Escherichia coli*, la frecuencia de integración del fragmento de ADN generado mediante PCR conjuntamente con la región flanqueante corta proporcionada por el plásmido RSF-Red-TER es tan alta como la frecuencia obtenida al utilizar el plásmido ayudante pKD46 (Datsenko K.A., Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000). Sin embargo, la expresión de los genes Red de λ resulta tóxica para *Pantoea ananatis*. Las células transformadas con el plásmido ayudante RSF-Red-TER crecen de manera extremadamente lenta en medio LB que contiene IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranósido, 1 mM) y un antibiótico apropiado (25 µg/ml de cloranfenicol o 40 µg/ml de canamicina) y la eficiencia de la recombinación mediada por Red de λ es extremadamente baja (10^{-8}), en caso de observarse en absoluto.

Se seleccionó una cepa variante de *Pantoea ananatis* que es resistente a la expresión de los tres genes Red de λ. Con este fin se introdujo el plásmido RSF-Red-TER en *Pantoea ananatis* cepa SC17 (patente US nº 6.596.517) mediante electroporación. Tras cultivar durante 18 horas, se obtuvieron aproximadamente 10^6 transformantes y entre ellos, 10 clones formaron colonias grandes y la totalidad del resto formó colonias extremadamente pequeñas. Tras cultivar durante 18 horas, las colonias grandes presentan un tamaño aproximado de 2 mm y las colonias pequeñas eran de aproximadamente 0,2 mm. Mientras que las colonias pequeñas no crecieron más aun prolongando el cultivo hasta las 24 horas, las colonias grandes sí que continuaron creciendo. Para análisis adicionales se utilizó una de las cepas mutantes de *Pantoea ananatis* de colonia grande que era resistente a la expresión de los tres genes Red de λ (*gam*, *bet* y *exo*).

El ADN del plásmido RSF-Red-TER se aisló a partir de un clon de los clones de colonia grande y de varios clones de colonia pequeña y se transformaron nuevamente en *Escherichia coli* MG1655 para examinar la capacidad del plásmido de sintetizar un producto activo de gen Red. Mediante un experimento de control para la integración dependiente de Red en los transformantes obtenidos se demostró que únicamente el plásmido aislado a partir del clon de colonia grande indujo la expresión de los genes Red de λ requeridos para la integración dependiente de Red. Con el fin de investigar si se producía la integración mediada por Red en el clon de colonia grande seleccionado, se llevó a cabo la electroporación utilizando un fragmento de ADN lineal producido mediante PCR. Este fragmento se designó de manera que contuviese un marcador Km^R y una región flanqueante de 40 pb

homóloga respecto al gen *hisD*. Este fragmento se integró en el gen *hisD* de *Pantoea ananatis* en el sitio de reconocimiento *Sma*I. A modo de control se utilizaron dos clones de colonia pequeña. La secuencia de nucleótidos del gen *hisD* de *Pantoea ananatis* se muestra en la SEC ID nº 3. Para la PCR, se utilizaron los oligonucleótidos de SEC ID nº 4 y nº 5 como cebadores y se utilizó como molde el plásmido pMW118-(λattL-Km^r-λattR). Los dos clones de colonia pequeña que no eran resistentes a los genes Red de λ se utilizaron a modo de control. La construcción del plásmido pMW118-(λattL-Km^r-λattR) se explica en detalle en el ejemplo de referencia 3.

El plásmido RSF-Red-TER puede inducir la expresión de los genes Red por el gen *lacI* que porta el plásmido. Se investigaron dos tipos de condiciones de inducción. En el primer grupo, se añadió IPTG (1 mM) 1 hora antes de la electroporación, y en el segundo grupo, se añadió IPTG al inicio del cultivo para preparar células en las que resultase posible la electroporación. La tasa de crecimiento de las células que alojaban RSF-Red-TER obtenidas del clon de colonias grandes no era significativamente inferior a la de una cepa que no presentaba dicho plásmido. La adición de IPTG sólo redujo ligeramente la tasa de crecimiento de dichos cultivos. Por otra parte, la progenie de los clones de colonia pequeña creció de manera extremadamente lenta incluso sin adición de IPTG y, tras la inducción, se anuló sustancialmente el crecimiento. Tras la electroporación de las células de la progenie del clon de colonia grande, crecieron muchos clones Km^R (18 clones después de un tiempo de inducción corto y aproximadamente 100 clones tras un tiempo de inducción prolongado). La totalidad de los 100 clones que se investigaron presentaban un fenotipo His$^-$ y se confirmó mediante PCR que aproximadamente 20 clones presentaban la estructura esperada del cromosoma en las células. Por otra parte, incluso tras llevar a cabo electroporación con la progenie de los clones de colonia pequeña, no se obtuvo una cepa integrada.

El clon de colonia grande obtenido se cultivó en una placa que contenía 7% de sacarosa para eliminar el plásmido y se transformó nuevamente con RSF-Red-TER. La cepa sin el plásmido se denominó SC17(0).

Todos los clones que crecieron tras la re-transformación anteriormente indicada mostraron un tamaño de colonia grande, como el clon de cepa parental SC17(0). Se llevó a cabo el experimento de integración mediada por Red en la cepa SC17(0) re-transformadas con el plásmido RSF-Red-TER. Se investigaron tres de los transformantes independientes utilizando el mismo fragmento de ADN que el utilizado para el experimento anterior. Se utilizó el tiempo de inducción corto (1 hora antes de la electroporación). En cada experimento crecieron más de diez clones Km^R. La totalidad de los clones examinados presentaba el fenotipo His$^-$. De esta manera, se seleccionó una cepa mutante denominada SC17(0), que era resistente a la expresión de los genes Red de λ. Esta cepa podía utilizarse como cepa receptora adecuada para la integración dependiente de Red en el cromosoma de *Pantoea ananatis*.

Ejemplo de referencia 2: construcción del plásmido ayudante RSF-Red-TER

En la figura 2 se muestra el esquema para la construcción del plásmido ayudante RSF-Red-TER.

Como primera etapa en la construcción, se designó un vector RSFsacBPlacMCS. Con este fin, se amplificaron fragmentos de ADN que contenían el gen cat del plásmido pACYC184 y la región estructura del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* mediante PCR utilizando los oligonucleótidos de las SEC ID nº 6 y nº 7, y nº 8 y nº 9, respectivamente. Estos oligonucleótidos contenían los sitios de enzima de restricción *Bgl*II, *Sac*I, *Xba*I y *Bam*HI, los cuales resultan necesarios y convenientes para la clonación adicional, en las regiones terminales 5', respectivamente. El fragmento *sacB* obtenido de 1,5 kb se clonó en el vector pMW119-P$_{lac}$lacI obtenido anteriormente en el sitio *Xba*I-*Bam*HI. Se construyó este vector de la misma manera que la indicada para el vector pMW118-P$_{lac}$lacI (Skorokhodova A. Yu et al., Biotekhnologiya (Rus.) 5:3-21, 2004). Sin embargo, dicho vector contenía una fracción poli-conector derivada de pMW219 en lugar del plásmido pMW218.

A continuación, el fragmento *cat* de 1,0 kb anteriormente indicado se trató con *Bgl*II y *Sac*I, y se clonó en el plásmido RSF-P$_{lac}$lacIsacB obtenido en la etapa anterior en el sitio *BamH*I-*Sac*I. El plásmido obtenido pMW-P$_{lac}$lacIsacBcat contenía el fragmento PlacUV5-lacI-sacB-cat. Con el fin de subclonar dicho fragmento en el vector RSF1010, se digirió pMW-P$_{lac}$lacIsacBcat con *Bgl*II, se crearon extremos romos con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y se digirió sucesivamente con *Sac*I. Se eluyó un fragmento *Bagl*II-*Sac*I de 3,8 kb del plásmido pMW-P$_{lac}$lacIsacBcat de un gel de agarosa al 1% y se ligó con el vector RSF1010 que había sido tratado con *Pst*I y *Sac*I. Se transformó *Escherichia coli* TG1 con la mezcla de ligación y se sembró en una placa con medio L (medio que contenía 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar en 1 l de agua purificada, pH 7,0) que contenía cloranfenicol (50 mg/l). Los plásmidos aislados de los clones cultivados se analizaron con enzimas de restricción, obteniendo un plásmido RSFsacB. Con el fin de construir un vector RSFsacBP$_{lac}$MCS, se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN que contenía el promotor P$_{lacUV5}$ utilizando los oligonucleótidos de SEC ID nº 10 y nº 11 como cebadores y el plásmido pMW119-P$_{lac}$lacI como el molde. El fragmento obtenido de 146 pb se digirió con *Sac*I y *Not*I, y se ligó con el fragmento grande *Sac*I-*Not*I del plásmido RSFsacB. A continuación, mediante PCR utilizando los oligonucleótidos de SEC ID nº 12 y nº 13 como cebadores y el plásmido pKD46 (Datsenko K.A., Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000) como molde, se amplificó un fragmento de ADN de 2,3 kb que contenía los genes λRedαβγ y el terminador de transcripción tL3. El fragmento obtenido se clonó en el vector RSFsacBP$_{lac}$MCS en el sitio *Pvu*I-*Not*I. De esta manera se construyó el plásmido RSFRed.

Con el fin de eliminar los transcritos ultraleídos de los genes Red, se insertó un terminador de transcripción

dependiente de ρ del operón *rrnB* de *Escherichia coli* en una posición entre el gen *cat* y el promotor P_{lacUV5}. Con este fin, se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN que contenía el promotor P_{lacUV5} y el terminador TrrnB utilizando los oligonucleótidos de SEC ID nº 14 y nº 11 como cebadores y el cromosoma de *Escherichia coli* BW3350 como molde. Estos fragmentos obtenidos se trataron con *Kpn*I y se ligaron. A continuación, el fragmento de 0,5 kb que contenía tanto P_{lacUV5} como TrrnB se amplificó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos de SEC ID nº 11 y nº 15 como cebadores. El fragmento de ADN obtenido se digirió con *EcoR*I, se crearon extremos romos mediante un tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, se digirió con *BamH*I y se ligó con el fragmento grande EcI136II-*BamH*I del vector RSFsacBPlacMCS. El plásmido obtenido se denominó RSF-Red-TER.

Ejemplo de referencia 3: construcción del plásmido pMW118-(λattL-Kmr-λattR)

Se construyó el plásmido pMW118-(λattL-Km^r-λattR) a partir del plásmido pMW118-attL-Tc-attR (documento WO2005/010175) mediante la sustitución del gen marcador de resistencia a la tetraciclina por el gen de resistencia a la canamicina del plásmido pUC4K. Con este fin, el fragmento grande *EcoR*I-*Hind*III del plásmido pMW118-attL-Tc-attR se ligó a dos fragmentos del plásmido pUC4K: el fragmento *Hind*III-*Pst*I (676 pb) y el fragmento *EcoR*I-*Hind*III (585 pb). Se obtuvo el plásmido básico pMW118-attL-Tc-attR mediante la ligación de los cuatro fragmentos siguientes:

1) El fragmento *Bgl*II-*EcoR*I (114 pb) que incluía *attL* (SEC ID nº 18), que se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región correspondiente a *attL* del cromosoma de *Escherichia coli* W3350 (que contenía el profago λ) utilizando los cebadores P1 y P2 (SEC ID nº 16 y nº 17) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiarios de *Bgl*II y *EcoR*I).

2) El fragmento *Pst*I-*Hind*III (182 pb) que incluía *attR* (SEC ID nº 21), que se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región correspondiente a *attR* del cromosoma de *Escherichia coli* W3350 (que contenía el profago λ) utilizando los cebadores P3 y P2 (SEC ID nº 19 y nº 20) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiarios de *Pst*I e *Hind*III).

3) El fragmento *Bgl*II-*Hind*III (3.916 pb) de pMW118-ter_rrnB. Se obtuvo el plásmido pMW118-ter_rrnB mediante ligación de los tres fragmentos de ADN siguientes:

- el fragmento de ADN grande (2.359 pb) que incluía el fragmento *Aat*II-*EcoR*I de pMW118 que se obtuvo mediante digestión de pMW118 con *EcoR*I, el tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y la digestión posterior con *Aat*II,
- el fragmento *Aat*II-*Bgl*II pequeño (1.194 pb) de pUC19 que incluía el gen *bla* de resistencia a la ampicilina (Ap^R), que se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región correspondiente del plásmido pUC19 utilizando los cebadores P5 y P6 (SEC ID nº 22 y nº 23) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiarios de *Pst*I, *Aat*II y *Bgl*II),
- el fragmento *Bgl*II-*Pst*I pequeño (363 pb) del terminador de transcripción ter_rrnB, que se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región correspondiente del cromosoma de *Escherichia coli* MG1655 utilizando los cebadores P7 y P8 (SEC ID nº 24 y nº 25) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiarios de *Pst*I, *Bgl*II y *Pst*I).

4) El fragmento *EcoR*I-*Pst*I pequeño (1.388 pb) (SEC ID nº 26) de pML-Tc-ter_thrL que incluía el gen de resistencia a la tetraciclina y el terminador de transcripción ter_thrL, el plásmido pML-Tc-ter_thrL se obtuvo mediante las dos etapas siguientes:

- el plásmido pML-ter_thrL se obtuvo mediante la digestión del plásmido pML-MCS (Mashko S.V. et al., Biotekhnologiya (en ruso) 5:3-20, 2001) con *Xba*I y *Bam*HI, seguido de la ligación del fragmento grande (3.342 pb) con el fragmento *Xba*I-*Bam*HI (68 pb) portador del terminador ter_thrL obtenido mediante amplificación por PCR de la región correspondiente del cromosoma de *Escherichia coli* MG1655 utilizando los cebadores P9 y P10 (SEC ID nº 27 y nº 28) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiarios de *Pst*I, *Xba*I y *Bam*HI),
- el plásmido pML-Tc-ter_thrL se obtuvo mediante digestión del plásmido pML-ter_thrL con *Kpn*I y *Xba*I seguido del tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y se ligó con el fragmento EcoRI-van9II pequeño (1.317 pb) de pBR322 que incluía el gen de resistencia a la tetraciclina (pBR322 fue digerido con *EcoR*I y *Van*9II y después tratado con fragmento Klenow de la ADN polimerasa I).

Ejemplo de referencia 4: construcción de plásmido RSFPPG productor de ácido glutámico

Se construyó el plásmido RSFPPG (documento WO2008/020654) en el que se amplificaron los genes del sistema de biosíntesis del ácido glutámico, el gen *prpC* (publicación de patente internacional WO2006/051660), el gen *ppc* y el gen *gdhA* (patente europea abierta al público EP 0 999 282).

Se diseñó el cebador 1 (SEC ID nº 29) y el cebador 2 (SEC ID nº 30) para la amplificación de una parte de RSFCPG (patente europea abierta al público nº 1233068) diferente del ORF del gen *gltA*. Mediante la utilización de dichos cebadores y RSFCPG como molde, se llevó a cabo la PCR, obteniendo un fragmento de aproximadamente 14,9 kb. Al igual que para *prpC*, se llevó a cabo una PCR utilizando el cebador 3 (SEC ID nº 31) y el cebador 4 (SEC ID nº 32) y el ADN cromosómico de *E. coli* cepa W3110 como molde, obteniendo un fragmento de aproximadamente 1,2 kb. Ambos productos de PCR fueron tratados con *Bgl*II y *Kpn*I, ligados y después utilizados para transformar *E. coli* cepa JM109. Se recolectaron todas las colonias que crecieron y se extrajeron los plásmidos de las colonias en forma de una mezcla. La cepa de *E. coli* ME8330, que es una cepa deficiente en citrato sintasa (CS), se transformó con la mezcla de plásmidos y la suspensión celular se aplicó sobre medio mínimo M9 (5 g de glucosa, sulfato de magnesio 2 mM, 3 g de fosfato monopotásico, 0,5 g de cloruro sódico, 1 g de cloruro amónico y 6 g de fosfato disódico en 1 litro de agua pura) que contenía 50 mg/l de uracilo y 5 mg/l de HCl de tiamina. Se recolectaron todas las colonias que crecieron, se extrajeron los plásmidos en forma de una mezcla y la cepa NP106, que es una cepa productora de ácido L-glutámico de *P. ananatis*, se transformó con la mezcla de plásmidos. Los clones que crecieron se cultivaron en probetas bajo condiciones neutras y una cepa que mostraba un rendimiento de ácido L-glutámico comparable al de la cepa G106S se denominó NA1. Se extrajo un plásmido de esta cepa y se denominó RSFPPG para el incremento de *prpC*, *gdh* y *ppc*. Este plásmido, RSFPPG, se introdujo en *Pantoea ananatis* cepa NP106, que es una cepa productora de ácido L-glutámico, construyendo una cepa productora de ácido L-glutámico, NP106/RSFPPG (esta cepa se denomina "cepa NA1").

La cepa NP106 se obtuvo de la manera siguiente. La cepa de *Pantoea ananatis* AJ13601 indicada anteriormente se cultivó durante la noche a 34ºC en un medio líquido obtenido mediante la adición de componentes de medio mínimo (5 g/l de glucosa, sulfato de magnesio 2 mM, 3 g/l de fosfato monopotásico, 0,5 g/l de cloruro sódico, 1 g/l de cloruro amónico y 6 g/l de fosfato disódico) al medio L (10 g/l de Bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, pH 7,0) (en lo sucesivo denominado "medio LBGM9") bajo agitación, el medio se diluyó de manera que creciesen 100 a 200 colonias en cada placa y se aplicó a una placa de LBGM9 que contenía 12,5 mg/l de tetraciclina. Las colonias que aparecieron se replicaron en una placa de LBGM9 que contenían 12,5 mg/l de tetraciclina y 25 mg/l de cloranfenicol y se seleccionó una cepa que era sensible al cloranfenicol, obteniendo una cepa de la que se eliminó pSTVCB, que se denominó G106S. La cepa G106S se cultivó adicionalmente durante la noche a 34ºC en el medio líquido LBGM9 bajo agitación, el medio se diluyó de manera que apareciesen 100 a 200 colonias en cada placa, y se aplicó a una placa de LBGM9 sin antibióticos. Las colonias que crecieron se replicaron en una placa de LBGM9 que contenía 12,5 mg/lg de tetraciclina y en una placa de LBGM9 sin antibióticos, y se seleccionó una cepa que era sensible a la tetraciclina para obtener una cepa de la que se había eliminado RSFCPG, que se denominó NP106. La NP106 obtenida tal como se ha indicado anteriormente no contenía los plásmidos RSFCPG y pSTVCB, los cuales se alojan en la cepa AJ13601.

La cepa G106S es una cepa obtenida mediante la eliminación de únicamente pSTVCB de la cepa AJ13601 de una manera similar.

Ejemplo 1: producción de ácido L-glutámico utilizando una cepa deficiente en gen *gcd*

(1) Construcción de una cepa deficiente en gen *gcd*

Se sintetizaron dos cebadores de ADN sintéticos mostrados en SEC ID nº 33 y nº 34 mediante un procedimiento ordinario.

El cebador mostrado en SEC ID nº 33 presentaba una configuración en la que tras la secuencia homóloga cadena arriba del gen *gcd* de *Pantoea ananatis* se encontraba la secuencia homóloga en el extremo 5' de λattL-Km^r-λattR. El cebador de SEC ID nº 34 presentaba una configuración en la que tras la secuencia complementaria cadena abajo del gen *gcd* de *Pantoea ananatis* se encontraba la secuencia complementaria en el extremo 3' de λattL-Km^r-λattR. Mediante la realización de la PCR utilizando dichos cebadores y pMW118-(λattL-Km^r-λattR) como molde, se ligó un fragmento de aproximadamente 1,5 kpb en el que la secuencia homóloga cadena arriba del gen *gcd* con el extremo 5' de la secuencia de λattL-Km^r-λattR, y se amplificó la secuencia homóloga cadena abajo del gen *gcd* ligada con el extremo 3' de la secuencia de λattL-Km^r-λattR.

El fragmento de PCR anteriormente indicado se purificó y se utilizó para la integración dependiente de λ en el cromosoma de *Pantoea ananatis*. Se utilizó el plásmido ayudante RSF-Red-TER como portador de los genes Red del fago λ. Con el fin de obtener células electrocompetentes de *Pantoea ananatis*, la cepa SC17(0) se transformó con el plásmido RSF-Red-Ter y se cultivó durante la noche a 34ºC en medio LB que contenía 50 µg/ml de cloranfenicol. A continuación, el caldo de cultivo se diluyó 100 veces con medio LB fresco que contenía 50 µg/ml de cloranfenicol y las células se cultivaron a 34ºC bajo aireación hasta que la DO_{600} alcanzó el valor de 0,3. Seguidamente se añadió IPTF 1 mM y se continuó con el cultivo hasta que la DO_{600} alcanzó el valor de 0,7. Las células en 10 ml del cultivo se lavaron 3 veces con un volumen igual de agua desionizada y las células se suspendieron en 80 µl de glicerol frío al 10%. El producto de PCR anteriormente indicado se disolvió en 10 µl de agua desionizada y se añadieron 100 a 200 ng del fragmento de PCR a la suspensión celular. Se llevó a cabo la electroporación mediante la utilización de un aparato de electroporación bacteriana (BioRad, Estados Unidos,

número de catálogo 165-2089, versión 2-89). Los parámetros del pulso utilizado fueron de intensidad de campo de 18 kV/cm y tiempo de pulso de 5 milisegundos.

Tras la electroporación, se añadió inmediatamente 1 ml del medio LB complementado con glucosa (al 0,5%) a la suspensión celular. A continuación, se dejó que las células creciesen a 34ºC durante 2 horas bajo aireación y se seleccionaron en el medio L (10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar en 1 litro de agua purificada, pH 7,0) que contenía 40 mg/l de canamicina para obtener aproximadamente 20 colonias como transformantes. La inserción del fragmento del gen de resistencia a la canamicina en la región del gen *gcd* se confirmó mediante PCR utilizando los dos cebadores de ADN sintéticos mostrados en SEC ID nº 35 y nº 36 y se confirmó una cepa en la que se confirmó la inserción del fragmento se denominó SC17(0)::Δgcd. Se extrajo el ADN genómico de dicha cepa y se utilizó para transformar la cepa NA1 mediante electroporación.

La cepa NA1 en la que se había introducido el ADN genómico de SC17(0)::Δgcd en una placa con medio LBGM9 complementado con 40 mg/l de canamicina, 12,5 mg/l de hidrocloruro de tetraciclina y 15 g/l de agar. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 20 colonias como transformantes. en la totalidad de dichas cepas, se insertó el fragmento de λattL-Kmr-λattR en la región del gen *gcd* y se seleccionó un clon de entre ellos y se denominó NA1::Δgcd.

(2) Evaluación de la capacidad de producción de ácido L-glutámico de la cepa deficiente en gen *gcd*

Con el fin de examinar el efecto de la deleción del gen *gcd* sobre la producción de ácido L-glutámico, se llevó a cabo un cultivo de producción de ácido L-glutámico mediante la utilización de las cepas NA1::Δgcd y NA1.

El cultivo se llevó a cabo en dos etapas: un cultivo de siembra para permitir la formación de células y un cultivo principal para producir ácido L-glutámico.

El cultivo de siembra se llevó a cabo con la composición de medio siguiente:

Composición de medio de cultivo de siembra:

Sacarosa	50 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4 g/l
GD113 (antiespumante)	0,1 ml/l
$(NH_4)_2SO_4$	4,0 g/l
KH_2PO_4	2,0 g/l
Extracto de levadura	4,0 g/l
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 g/l
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01 g/l
Ácido cítrico	0,02 g/l
Hidrocloruro de L-lisina	0,4 g/l
DL-metionina	0,4 g/l
Ácido ε-diaminopimélico	0,4 g/l
Pantotenato de calcio	18 mg/l
Hidrocloruro de tetraciclina	12,5 mg/l

El medio se esterilizó con vapor a 120ºC durante 20 minutos

Cada una de las cepas NA1::Δgcd y NA1 se precultivó en la placa con medio LBGM9 complementado con 12,5 mg/l de tetraciclina y 15 g/l de agar y las células correspondientes a una placa se inocularon en 300 ml del medio de cultivo de siembra de la composición anteriormente indicada contenida en un minifrasco y se controló la agitación a 34ºC y pH 6,0 durante aproximadamente 12 horas de manera que se obtuviese una aireación de 1/1 vvm y una concentración de oxígeno de 3% o superior. Durante el cultivo, se controló el pH a 6,0 añadiendo gas amonio. Durante el cultivo, se controló el pH a 6,0 mediante la adición de gas amonio. Se terminó el cultivo de siembra en el momento de agotamiento del sacárido en el medio, observado en un índice.

Se muestra a continuación la composición del medio de cultivo principal.

Composición del medio de cultivo (concentraciones tras la inoculación de 20% de medio de cultivo de siembra)

Sacarosa	100 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4 g/l
GD113	0,1 ml/l
$(NH_4)_2SO_4$	5,0 g/l
KH_2PO_4	6,0 g/l
Extracto de levadura	6,0 g/l

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 g/l
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0,02 g/l
Ácido cítrico	0,02 g/l
Betaína*	2,0 g/l
Hidrocloruro de L-lisina	0,8 g/l
DL-metionina	0,6 g/l
Ácido ε-diaminopimélico	0,6 g/l
Pantotenato de calcio	18 mg/l
Hidrocloruro de tetraciclina	25 mg/l
*N,N,N-trimetilglicina	

Las células obtenidas con el cultivo de siembra en un volumen de 60 ml se inocularon en 240 ml de medio que presentaba la composición anteriormente indicada contenida en un mini-frasco de 1 litro de volumen y se cultivaron a 34ºC, 36ºC o 38ºC y a un pH de 4,9. Finalizó el cultivo al consumirse toda la glucosa en el medio. Se midió la concentración del ácido L-glutámico en el sobrenadante de cultivo diluido apropiadamente con agua, mediante la utilización del aparato Biotech Analyzer (AS-210, Sakura SI).

Se muestran los resultados en la tabla 1. Se puso de manifiesto que la acumulación de ácido L-glutámico de la cepa deficiente en gen *gcd*, la cepa NA1::Δgcd, mejoraba respecto a la cepa comparativa, la cepa NA1.

Tabla 1: ácido L-glutámico producido (g/frasco)

Cepa	34ºC	36ºC	38ºC
NA1	13,0	12,4	13,3
NA1::Δgcd	15,4	16,0	16,7

Ejemplo 2: producción de L-cisteína utilizando una cepa deficiente en gen *gcd*

(1) Construcción de bacterias productoras de L-cisteína

Con el fin de investigar los efectos de la deleción del gen *gcd* sobre la producción de L-cisteína de *P. ananatis*, se construyó una bacteria productora de L-cisteínas de *P. ananatis*.

(1-1) Construcción del plásmido de expresión del gen *yeaS*

En primer lugar se construyó un plásmido para construir la cepa anteriormente indicada. El procedimiento para ello se describe a continuación.

Mediante PCR, utilizando el ADN cromosómico de *E. coli* MG1655 (ATCC nº 47076) como molde, así como P11 (agctgagtcg acccccagga aaaattggtt aataac, SEC ID nº 51) y P12 (agctgagcat gcttccaact gcgctaatga cgc, SEC ID nº 52) como cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN que contenía una región promotora del gen *nlpD* (en adelante el promotor del gen *nlpD* de tipo salvaje se denomina "Pnlp0") de aproximadamente 300 pb. En los extremo 5' y 3' de los cebadores anteriormente indicados, se diseñaron sitios para los enzimas de restricción *Sal*I y *Pae*I, respectivamente. El ciclo de PCR era el siguiente: 95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 25 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 55ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 15 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final. El fragmento obtenido se trató con *Sal*I y *Pae*I y se insertó en pMIV-5JS (patente japonesa abierta al público 2008-99668) en el sitio *Sal*I-*Pae*I, obteniendo el plásmido pMIV-Pnlp0. La secuencia de nucleótidos del fragmento *Pae*I-*Sal*I del promotor Pnlp0 insertada en dicho plásmido pMIV-Pnlp0 fue la mostrada en SEC ID nº 41.

A continuación, mediante PCR utilizando el ADN cromosómico de MG1655 como molde, así como P13 (agctgatcta gaaaacagaa tttgcctggc ggc, SEC ID nº 53) y P14 (agctgaggat ccaggaagag tttgtagaaa cgc, SEC ID nº 54) como cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN que contenía una región terminadora del gen *rrnB* de aproximadamente 300 pb. En los extremos 5' de los cebadores anteriormente indicados, se diseñaron sitios para los enzimas de restricción *Xba*I y *Bam*HI, respectivamente. El ciclo de PCR fue el siguiente: 95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 25 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 59ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 15 segundos y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final. El fragmento obtenido se trató con *Xba*I y *Bam*HI y se insertó en pMIV-Pnlp0 en el sitio *Xba*I-*Bam*HI, obteniendo un plásmido pMIV-Pnlp0-ter.

A continuación, mediante PCR utilizando el ADN cromosómico de la cepa MG1655 como molde, así como P15(agctgagtcg acgtgttcgc tgaatacggg gt, SEC ID nº 55) y P16 (agctgatcta gagaaagcat caggattgca gc, SEC ID nº 56) como cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 700 pb que contenía el gen *yeaS*. En los extremo 5' de los cebadores anteriormente indicados, se diseñaron sitios para los enzimas de restricción *Sal*I y *Xba*I, respectivamente. El ciclo de PCR fue el siguiente: 95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60

segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 25 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 55ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 15 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final. El fragmento obtenido se trató con *Sal*I y *Xba*I y se insertó en pMIV-Pnlp0-ter en el sitio *Sal*I-*Xba*I, obteniendo el plásmido pMIV-Pnlp0-YeaS3. Tal como se ha indicado anteriormente, se construyó una unidad de expresión de *yeaS* que comprendía el vector pMIV-5JS en el que se ligó el promotor nlpD, el gen *yeaS* y el terminador *rrnB*, en este orden.

Con el fin de modificar la región -10 del promotor nlpD para convertirlo en un promotor más fuerte, se aleatorizó la región -10 siguiendo el procedimiento siguiente. La región promotora nlpD contiene dos de las regiones que se cree funcionan como promotores (fig. 3) y se indican como pnlp1 y pnlp2, respectivamente, en el dibujo. Mediante PCR utilizando el plásmido pMIV-Pnlp0 como molde, así como P11 y P17 (atcgtgaaga tcttttccag tgttnannag ggtgccttgc acggtnatna ngtcactgg ("n" se refiere a que el residuo correspondiente puede ser cualquiera de entre a, t, g y c, SEC ID nº 57) como cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN en el que la región -10 contenida en la secuencia de extremo 3' del promotor nlpD (denominado -10(Pnlp1)) se había aleatorizado (fig. 3). El ciclo de PCR fue el siguiente: 95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 25 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 60ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 15 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final.

Además, mediante PCR utilizando el plásmido pMIV-Pnlp0 como molde, así como P12 y P18 (tggaaaagat cttcannnnn cgctgacctg cg ("n" se refiere a que el residuo correspondiente puede ser cualquiera de entre a, t, g y c, SEC ID nº 58) como cebadores, se obtuvo de manera similar un fragmento de ADN en el que la región -10 contenida en la secuencia de extremo 5' del promotor nlpD (denominado -10(Pnlp2)) se había aleatorizado (fig. 3). El ciclo de PCR fue el siguiente: 95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos, y 72ºC durante 40 segundos, 25 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 60ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 15 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final.

Los fragmentos de extremo 3' y 5' obtenidos pudieron ligarse utilizando los sitios *Bgl*II designados en los cebadores P17 y P18, y pudo construirse la longitud completa del promotor nlpD en la que se habían aleatorizado dos regiones -10. Mediante PCR utilizando dicho fragmento como molde, así como P11 y P12 como cebadores, se obtuvo un fragmento de ADN correspondiente a un promotor nlpD de tipo modificado de la longitud completa. El ciclo de PCR fue el siguiente: 95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 12 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 60ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 15 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final.

El fragmento amplificado se trató con los enzimas de restricción *Sal*I y *Pae*I, para los que se diseñaron sitios en los extremos 5' de los cebadores, y se insertaron en el plásmido pMIV-Pnlp0-YeaS3 tratado de manera similar con *Sal*I y *Pae*I para sustituir el Pnlp mutante por la región promotora nlpD de tipo salvaje (Pnlp0) en el plásmido. A partir de dichos plásmidos se seleccionó la secuencia promotora (Pnlp8) mostrada en la fig. 3 y se denominó pMIV-Pnlp8-YeaS7. La secuencia de nucleótidos del fragmento *Pae*I-*Sal*I del promotor Pnlp8 insertado en dicho plásmido se muestra en la SEC ID nº 42.

(1-2) Construcción de plásmido de expresión variante de *cysE*

A continuación, de pMW-Pomp-cysE5 (documento WO2005/007841) se extrajo la parte de casete Pomp-cysE5 con *Pae*I y *Sac*I, y se insertó en el mismo sitio de pMIV-5JS para construir pMIV-Pomp-CysE5. pMW-Pomp-CysE5 era un plásmido obtenido mediante la inserción del gen *cysE5* codificante de SAT mutante ligado con el promotor del gen *ompC* en pMW118. De pACYC184 (GenBank/número de acceso del EMBL X06403, disponible de Nippon Gene), se extrajo el gen de resistencia a la tetraciclina con *Xba*I y *Eco*88I y este fragmento génico se trató con el fragmento Klenow y después se insertó en pMIV-Pomp-CysE5 en el sitio *Pvu*I para construir pMT-Pomp-CysE5. A continuación, se digirió pMIV-Pnlp8-YeaS7 con *Hind*III, se crearon extremos romos con el fragmento Klenow y después se digirió con *Nco*I para extraer un fragmento que contenía el casete del terminador Pnlp8-YeaS-*rrnB* y el marcador de resistencia al cloranfenicol. Este fragmento se ligó con un fragmento de digestión *Sma*I y *Nco*I de pMT-Pomp-CysE5 que presentaba de manera similar pMIV-5JS como el esqueleto para construir pMT-EY2. pMT-EY2 es un plásmido que presenta el casete terminador Pnlp8-YeaS-*rrnB* y el casete Pomp-CysE5 en un plásmido.

(1-3) Introducción de *cysE5* y *yeaS* en la cepa *P. ananatis* SC17

pMT-EY2 indicado anteriormente presenta los sitios de unión del fago Mu originado a partir de pMIV-5JS (patente japonesa abierta al público 2008-99668). Permitiendo que este plásmido coexista con el plásmido ayudante pMH10 con la transposasa Mu (Zimenkov D. et al., Biotechnologiya (en ruso) 6:1-22, 2004) en la misma célula, el casete de terminador PompC-cysE5-Pnlp8-YeaS-*rrnb*, incluyendo el marcador de resistencia de cloranfenicol situado entre los sitios de unión del fago Mu en dicho plásmido pMT-EY2 en el cromosoma de la cepa *P. ananatis* SC17 (patente US nº 6.596.517). Además, debido a que el marcador de resistencia del cloranfenicol situado en el plásmido pMT-EY2 presenta una estructura que existe entre dos sitios de unión del fago λ (λattR y λattL), el marcador de resistencia a cloranfenicol puede extraerse y eliminarse mediante el procedimiento indicado posteriormente.

En primer lugar, se seleccionó una cepa SC17 introducida con pMH10 mediante electroporación mediante el cultivo

durante la noche a 30ºC en el medio de LB agar que contenía 20 mg/l de canamicina. El transformante obtenido se cultivó a 30ºC y pMT-E2 se introdujo adicionalmente en dicha cepa mediante electroporación. Esta cepa transformada con pMH10 y pMT-EY2 se sometió a un choque térmico bajo las condiciones de 42ºC durante 20 minutos y se seleccionaron colonias de cepas resistentes a cloranfenicol en medio LB-agar que contenía 20 mg/l de cloranfenicol. La temperatura de cultivo de dicha selección fue de 39ºC. Tal como se ha indicado anteriormente, se obtuvieron aproximadamente 50 clones y se llevó a cabo la curación de pMH10 y pMT-EY2 mediante el cultivo de cada clon a 39ºC durante 48 horas en el medio LB-agar. Se obtuvo una cepa que mostraba resistencia al cloranfenicol debido a la inserción del casete en el cromosoma y que mostraba sensibilidad a la canamicina y a la ampicilina debido a la curación de ambos plásmidos. Además, se confirmó que se había insertado el casete objetivo en el cromosoma de la cepa obtenida mediante PCR utilizando el ADN cromosómico de dicha cepa como molde, así como P11 y P16 como cebadores. La totalidad de los clones obtenidos se denominó EY01 y EY50, respectivamente y se llevó a cabo el cultivo de producción de L-cisteína mediante la utilización de las cepas EY01 y EY50. Para el cultivo, se utilizó el procedimiento descrito posteriormente. Se seleccionó la cepa EY19, que era un clon que producía L-cisteína en la cantidad máxima como resultado del cultivo.

El marcador de resistencia al cloranfenicol introducido en la cepa EY19 se extrajo con un sistema de excisión obtenido del fago λ. Específicamente, la cepa EY19 se transformó con pMT-Int-Xis2 (documento WO2005/010175) portador del gen *Int-Xis* del fago λ y se obtuvo una cepa EY19(s) que mostraba sensibilidad al cloranfenicol de los transformantes obtenidos.

(1-4) Preparación de la cepa con expresión incrementada del gen *cysPTWA* a partir de la cepa EY19(s)

A continuación, con el fin de incrementar la expresión del gen *cysPTWA*, se sustituyó el promotor situado cadena arriba del clúster del gen *cysPTWA* en el cromosoma por el promotor potente Pnlp8 anteriormente indicado. Se obtuvo un fragmento de ADN que contenía el promotor nlp8 de aproximadamente 300 pb en primer lugar mediante PCR utilizando pMIV-Pnlp8-YeaS7 como molde, así como P11 y P12. El ciclo de PCR fue el siguiente: 95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 20 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 59ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 15 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final.

El fragmento de ADN amplificado que contenía el promotor nlp8 se trató con el fragmento Klenow, se insertó en el plásmido pMW118-(λattL-KmR-λattR) (documento WO2006/093322A2) digerido con *Xba*I y después se trató con el fragmento Klenow, obteniendo el plásmido pMW-Km-Pnlp8. Mediante PCR utilizando pMW-Km-Pnlp8 como molde, así como los cebadores P19 (tccgctcacg atttttttca tcgctggtaa ggtcatttat cccccaggaa aaattggtta, SEC ID nº 59) y P20 (tttcacaccg ctcaaccgca gggcataacc ggcccttgaa gcctgctttt ttatactaag ttg, SEC ID nº 60), se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 1,6 kb que contenía el casete Km-Pnlp8. El ciclo de PCR para dicha amplificación fue el siguiente: 95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 30 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 54ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 90 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final. En ambos cebadores, se diseñó una secuencia que sirvió de diana en el cromosoma para la inserción de un fragmento objetivo mediante integración dependiente de λ (el procedimiento denominado "integración regulada por Red" (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):6640-6645, 2000)) (en este caso, una secuencia próxima al promotor de *cysPTWA*). Por lo tanto, en el caso de que se insertase el fragmento de ADN obtenido en la cepa objetivo mediante dicha integración dependiente de λ, se obtendría una estructura en la que Km-Pnlp8 se inserta inmediatamente antes del gen *cysPTWA* en el cromosoma y el gen *cysPTWA* se liga al promotor nlp8. La secuencia de nucleótidos del clúster del gen *cysPTWA* se muestra en la SEC ID nº 43, y las secuencias de aminoácidos codificadas por los genes *cysP*, *cysT* y *cysW* se muestran en las SEC ID nº 44 a nº 46, respectivamente. La secuencia de nucleótidos del gen *cysA* y la secuencia de aminoácidos codificada por dicho gen se muestran en las SEC ID nº 47 y nº 48, respectivamente.

La cepa *P. ananatis* SC17(0)/RSF-Red-TER es una cepa huésped para llevar a cabo eficientemente la integración dependiente de λ y es una cepa obtenida mediante la introducción del plásmido ayudante RSF-Red-TER que expresa los genes *gam, bet* y *exo* (en lo sucesivo denominados "genes Red de λ") en la cepa SC17(0), que es una cepa de *P. ananatis* resistente al producto del gen Red de λ (documento WO2008/075483). La SC17(0) se depositó en el Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika (dirección: Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd. 1) el 21 de septiembre de 2005, con el número de acceso VKPM B-9246. Se da a conocer en detalle un procedimiento para construir el plásmido RSF-Red-TER en el documento WO2008/075483.

La cepa SC17(0)/RSF-Red-TER anteriormente indicada se cultivó con adición de IPTG para inducir la expresión de los genes Red de λ con el fin de preparar las células para la electroporación. El fragmento de ADN objetivo anteriormente indicado se introdujo en dichas células mediante electroporación y una cepa recombinante en la que se había insertado el promotor nlp8 cadena arriba del gen *cysPTWA* mediante integración dependiente de λ se obtuvo mediante la utilización de la resistencia a canamicina como marcador. Mediante PCR utilizando el ADN cromosómico de la cepa obtenida como molde, así como P21 (ctttgtccct ttagtgaagg, SEC ID nº 61) y P22 (agctgatcta gaagctgact cgagttaatg gcctcccaga cgac, SEC ID nº 62) como cebadores, se confirmó que se había formado la estructura objetivo, Km-Pnlp8-cysPTWA, y esta cepa se denominó SC17(0)-Pnlp8-PTWA.

A continuación, se purificó el ADN cromosómico de la cepa SC17(0)-Pnlp8-PTWA y se introdujeron 10 µg de dicho ADN cromosómico en la cepa EY19(s) mediante electroporación, obteniendo una cepa resistente a la canamicina. La amplificación se llevó a cabo mediante PCR utilizando el ADN cromosómico de la cepa obtenida como molde, así como P21 y P22 como cebadores, confirmando que la estructura Km-Pnlp8-cysPTWA había sido introducida en el cromosoma de la cepa EY19(s). La cepa obtenida tal como se ha indicado anteriormente se denominó cepa EYP197. Además, se extrajo el marcador de resistencia a la canamicina del cromosoma mediante la utilización de pMT-Int-Xis2 tal como se ha indicado anteriormente y la cepa que se había convertido en sensible a la canamicina se denominó cepa EYP197(s).

(1-5) Preparación de la cepa portadora del gen mutante 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (serA348) de la cepa EYP197(s)

Como gen de 3-fosfoglicerato deshidrogenada que debía introducirse en la bacteria productora de L-cisteína, se construyó mediante el procedimiento a continuación el gen *serA348*, que es un gen codificante de la 3-fosfoglicerato deshidrogenasa de *Pantoea ananatis* y codificante de un enzima mutante que incluye una mutación para la sustitución de un residuo de alanina por el residuo de asparagina en la posición 348 (N348A) (J. Biol. Chem. 217(38):23235-8, 1996).

La secuencia del gen *serA* de tipo salvaje derivada de *Pantoea ananatis* se muestra en la SEC ID nº 49. La secuencia de aminoácidos codificada por dicho gen se muestra en la SEC ID nº 50. Con el fin de obtener un fragmento de ADN en el lado del extremo 3' del gen *serA* en el que se había introducido la mutación anteriormente indicada, se llevó a cabo PCR mediante la utilización del ADN cromosómico de la cepa SC17 como molde, así como P23 (agctgagtcg acatggcaaa ggtatcactg gaa, SEC ID nº 63) y P24 (gagaacgccc gggcgggctt cgtgaatatg cagc, SEC ID nº 64) y P24 (gagaacgccc gggcgggctt cgtgaatatg cagc, SEC ID nº 64) como cebadores (95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 25 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 60ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 60 segundos y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final). A continuación, con el fin de obtener un fragmento de ADN del lado 5'-terminal en el que se había introducido la mutación, se llevó a cabo una PCR de la misma manera mediante la utilización del ADN cromosómico de la cepa SC17 como molde, así como P25 (agctgatcta gacgtgggat cagtaaagca gg, SEC ID nº 65) y P26 (aaaaccgccc gggcgttctc ac, SEC ID nº 66) como cebadores (95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 20 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 60ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 20 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final). Ambos fragmentos de PCR obtenidos se trataron con el enzima de restricción *Sma*I y se ligaron mediante la utilización de una ADN ligasa, obteniendo un fragmento de ADN correspondiente a un gen *serA* mutante de longitud completa que incluía la mutación objetivo (N348A). Se amplificó este fragmento de ADN mediante PCR utilizándolo como molde, así como P23 y P25 como cebadores (95ºC durante 3 minutos, seguido de 2 ciclos de 95ºC durante 60 segundos, 50ºC durante 30 segundos y 72ºC durante 40 segundos, 15 ciclos de 94ºC durante 20 segundos, 60ºC durante 20 segundos y 72ºC durante 75 segundos, y 72ºC durante 5 minutos como ciclo final). Los sitios de los enzimas de restricción *Sal*I y *Xba*I diseñados en los cebadores P23 y P25 se trataron con *Sal*I y *Xba*I y el fragmento se insertó en pMIV-Pnlp8-ter tratado de manera similar con *Sal*I y *Xba*I, preparando pMIV-Pnlp8-serA348.

El plásmido pMIV-Pnlp8-serA348 construido portaba el sitio de unión de Mu originado en pMIV-5J2 (patente japonesa abierta al público nº 2008-99668). Mediante la utilización de dicho plásmido conjuntamente con el plásmido ayudante pMH10 que presentaba la trasposasa de Mu, pudo insertarse el casete del terminador Pnlp8-serA348-rrnb, incluyendo el marcador de resistencia al cloranfenicol, en el cromosoma de la cepa *P. ananatis* SC17, tal como se ha indicado anteriormente. Se introdujo pMIV-Pnlp8-serA348 y pMH10 en la cepa SC17(0), obteniendo una cepa en la que el casete del terminador Pnlp8-serA348-rrnb se encontraba insertado en el cromosoma. Mediante PCR con los cebadores P11 y P25, se confirmó la presencia del casete objetivo en las células. Se midió la actividad de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa en extractos celulares de 50 de los clones obtenidos y se seleccionó una cepa que mostraba la actividad más elevada y la cepa se denominó SC17int-serA348. A continuación, se introdujeron 10 µg del ADN cromosómico de la cepa SC17int-serA348 en la cepa EYP197(s) mediante electroporación, obteniendo una cepa resistente al cloranfenicol y mediante PCR utilizando los cebadores P11 y P25 se confirmó que se había introducido la estructura Pnlp8-serA348 conjuntamente con el marcador de resistencia al cloranfenicol en el cromosoma de la cepa EYP197(s). La cepa obtenida tal como se ha indicado anteriormente se denominó EYPS1976.

Mediante el procedimiento anteriormente indicado para eliminar el marcador utilizando pMT-Int-Xis2 se eliminó el marcador de resistencia al cloranfenicol y la cepa que se había vuelto sensible al cloranfenicol se denominó EYPS1976(s).

(1-6) Preparación de cepa deficiente en gen *gcd* a partir de la cepa EYPS1976(s)

Se preparó ADN genómico a partir de la cepa SC17(0)::Δgcd indicada en el ejemplo 1 y se introdujo en la cepa EYPS1976(s) mediante electroporación, obteniendo una cepa deficiente en gen *gcd* (cepa EYPS1976Δgcd) a partir de la cepa EYPS1976(s) mediante la utilización de la resistencia a la canamicina como marcador.

(2) Cultivo de las cepas productoras de L-cisteína EYPS1976(s) y EYPS1976Δgcd

Con el fin de investigar el efecto de la deleción del gen *gcd* sobre la producción fermentativa de L-cisteína y de O-acetilserina, que es un precursor de la L-cisteína, se llevó a cabo la producción fermentativa de la misma mediante la utilización de la cepa EYPS1976(s) de bacteria productora de L-cisteína y la cepa deficiente en gen *gcd* eyps1976Δgcd a partir de la cepa EYPS1976(s) y se compararon las cantidades producidas de L-cisteína y O-acetilserina. Para el cultivo, se utilizó un medio de producción de L-cisteína que presentaba la composición siguiente.

Medio de producción de L-cisteína (las concentraciones de los componentes son concentraciones finales)

Componente 1:	
$(NH_4)_2SO_4$	15 g/l
KH_2PO_4	1,5 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g/l
Hidrocloruro de tiamina	0,1 mg/l
Componente 2:	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1,7 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,15 mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,7 mg/l
$MnCl \cdot 4H_2O$	1,6 mg/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3 mg/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,25 mg/l
Componente 3:	
Triptona	0,6 g/l
Extracto de levadura	0,3 g/l
Cloruro sódico	0,6 g/l
Componente 4:	
Carbonato de calcio	20 g/l
Componente 5:	
Monohidrato de monohidrocloruro de L-histidina	135 mg/l
Componente 6:	
Tiosulfato sódico	6 g/l
Componente 7:	
Hidrocloruro de piridoxina	2 mg/l
Componente 8:	
Glucosa	40 g/l

Para dichos componentes se prepararon soluciones madre de concentración 10 veces mayor (componente 1), concentración 1.000 veces mayor (componente 2), concentración 100/6 veces mayor (componente 3), concentración 100 veces mayor (componente 5), 350 g/l (componente 6), concentración 1.000 veces mayor (componente 7) y concentración 10 veces mayor (componente 8), que se mezclaron en el momento de la utilización y el volumen definido se obtuvo con agua esterilizada para alcanzar las concentraciones finales.

La esterilización se llevó a cabo mediante autoclavado a 110ºC durante 30 minutos (componentes 1, 2, 3, 5 y 8), esterilización con aire caliente a 180ºC durante 5 horas o más (componente 4) o esterilización mediante filtración (componentes 6 y 7).

Se llevó a cabo el cultivo de producción de L-cisteína de la manera siguiente. Se aplicó cada una de las cepas EYPS1976(s) y EYPS1976Δgcd y se extendieron sobre el medio de LB-agar para llevar a cabo el precultivo durante la noche a 34ºC y después las células correspondientes a 7 cm sobre la placa se rasparon dos veces con un asa de inoculación de 10 µl (Nunc Blue Loop) y se inocularon en 2 ml del medio de producción de L-cisteína contenido en una probeta grande (diámetro interno: 23 mm, longitud: 20 cm) a cantidades celulares sustancialmente iguales en el momento de iniciar el cultivo.

Las cepas se cultivaron a 34ºC o 38ºC bajo agitación y se terminó el cultivo tras 24 horas. En este punto se confirmó que la glucosa como fuente de carbono había sido completamente consumida. Se cuantificó la L-cisteína producida en el medio mediante el procedimiento descrito por Gaitonde M.K. (Biochem. J. 104(2):627-33, agosto de 1967). La OAS (O-acetilserina) producida en el medio se cuantificó mediante HPLC. En esta cuantificación, se utilizó un procedimiento de conversión de la OAS en la más estable NAS (N-acetilserina), mediante dilución de la muestra con Tris-HCl 200 mM (pH 9,0) y detectando la NAS. Las condiciones de la HPLC fueron las siguientes.

Columna: Inertsil ODS-3 (columna hidrofóbica, GL Science Co., Ltd.)

Caudal de tampón: 1,0 ml/minuto

Temperatura de la columna: 40ºC

Detección: UV 210 nm

Volumen de aplicación de la muestra: 10 ml

Tampón: $KH_2PO_4 \cdot H_3PO_4$ 0,1 M (pH 2,2), 1-octanosulfonato de Na 5 mM

El experimento se llevó a cabo por hexaplicado para cada cepa y los resultados se indican en la tabla 2, medias y desviaciones estándar. Tal como se muestra en la tabla 2, se encontró que la deleción del gen *gcd* resultó eficaz para incrementar la L-cisteína y O-acetilserina a ambas temperaturas de cultivo: 34ºC y 38ºC. El grado de incremento fue más notable a 38ºC y, de esta manera, se encontró que resultaba especialmente eficaz para el cultivo a temperatura elevada. También se encontró que también resultaba eficaz para incrementar el número de células (DO) a 38ºC.

Tabla 2: capacidad de producción de L-cisteína y NAS de la cepa deficiente en gen *gcd*

		Cys (g/l)	NAS (g/l)	DO600
34ºC	EYPS1976(s)	1,02 ± 0,16	0,81 ± 0,10	15,1 ± 0,50
	EYPS1976Δgcd	1,29 ± 0,16	1,01 ± 0,10	15,0 ± 0,24
38ºC	EYPS1976(s)	0,31 ± 0,12	0,54 ± 0,11	11,1 ± 1,68
	EYPS1976Δgcd	0,95 ± 0,21	0,87 ± 0,10	19,2 ± 0,57

Explicación del listado de secuencias

SEC ID nº 1: secuencia de nucleótidos del gen *gcd* de *Pantoea ananatis*

SEC ID nº 2: secuencia de aminoácidos de GCD de *Pantoea ananatis*

SEC ID nº 3: secuencia de nucleótidos del gen *hisD* de *Pantoea ananatis*

SEC ID nº 4: cebador para la amplificación del fragmento para la integración del gen Km^r en el gen *hisD*

SEC ID nº 5: cebador para la amplificación del fragmento para la integración del gen Km^r en el gen *hisD*

SEC ID nº 6: cebador para la amplificación del gen *cat*

SEC ID nº 7: cebador para la amplificación del gen *cat*

SEC ID nº 8: cebador para la amplificación del gen *sacB*

SEC ID nº 9: cebador para la amplificación del gen *sacB*

SEC ID nº 10: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el promotor PlacUV5

SEC ID nº 11: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el promotor PlacUV5

SEC ID nº 12: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye los genes λ*Red*αβγ y *tL3*

SEC ID nº 13: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye los genes λ*Red*αβγ y *tL3*

SEC ID nº 14: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el promotor PlacUV5 y *TrrnB*

SEC ID nº 15: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el promotor PlacUV5 y *TrrnB*

SEC ID nº 16: cebador para la amplificación de *attL*

SEC ID nº 17: cebador para la amplificación de *attL*

SEC ID nº 18: secuencia de nucleótidos de *attL*

SEC ID nº 19: cebador para la amplificación de *attR*

SEC ID nº 20: cebador para la amplificación de *attR*

SEC ID nº 21: secuencia de nucleótidos de *attR*

SEC ID nº 22: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el gen *bla*

SEC ID nº 23: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el gen *bla*

SEC ID nº 24: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye *ter_rrnB*

SEC ID nº 25: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye *ter_rrnB*

SEC ID nº 26: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el terminador *ter_thrL*

SEC ID nº 27: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el terminador *ter_thrL*

SEC ID nº 28: cebador para la amplificación del fragmento de ADN que incluye el terminador *ter_thrL*

SEC ID nº 29: cebador para la amplificación del gen *gltA* excepto por el ORF

SEC ID nº 30: cebador para la amplificación del gen *gltA* excepto por el ORF

SEC ID nº 31: cebador para la amplificación del gen *prpC*

SEC ID nº 32: cebador para la amplificación del gen *prpC*

SEC ID nº 33: cebador para la amplificación del gen *gcd*

SEC ID nº 34: cebador para la amplificación del gen *gcd*

SEC ID nº 35: cebador para confirmar la deleción del gen *gcd*

SEC ID nº 36: cebador para confirmar la deleción del gen *gcd*

SEC ID nº 37: secuencia de nucleótidos del gen *cysE* de tipo salvaje

SEC ID nº 38: secuencia de aminoácidos de la serina acetiltransferasa codficada por *cysE* de tipo salvaje

SEC ID nº 39: secuencia de nucleótidos del gen *yeaS* de tipo salvaje

SEC ID nº 40: secuencia de aminoácidos de YeaS de tipo salvaje

SEC ID nº 41: secuencia de nucleótidos de *Pnlp0*

SEC ID nº 42: secuencia de nucleótidos de *Pnlp8*

SEC ID nº 43: secuencia de nucleótidos del clúster del gen *cysPTWA*

SEC ID nº 44: secuencia de aminoácidos codificada por el gen *cysP*

SEC ID nº 45: secuencia de aminoácidos codificada por el gen *cysT*

SEC ID nº 46: secuencia de aminoácidos codificada por el gen *cysW*

SEC ID nº 47: secuencia de nucleótidos del gen *cysA*

SEC ID nº 48: secuencia de aminoácidos codificada por el gen *cysA*

SEC ID nº 49: secuencia de nucleótidos del gen *serA* de tipo salvaje de *Pantoea ananatis*

SEC ID nº 50: secuencia de aminoácidos codificada por el gen *serA* de tipo salvaje de *Pantoea ananatis*

SEC ID nº 51 a nº 66: cebadores P11 a P26

Listado de secuencias

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Bacteria que produce un L-aminoácido y procedimiento para producir un L-aminoácido

<130> D095-C9293

<150> JP2008-229736
<151> 2008-09-08

<150> JP2009-032839
<151> 2009-02-16

<160> 66

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 2931
<212> ADN
<213> Pantoea ananatis

<220>
<221> CDS
<222> (301)..(2691)

<400> 1
```
gcgtctggcg atctcattcc ctttacgctt taacctttct tatctcctgg cactattgaa      60
tcatatcggc aaggccccat taacaccctc taaagtattg ccttagatgc gttgttaaga     120
gctttaagcc aaaaaaatca aaactcatac caattttgct ataacattta acagatatgg     180
atcatcacgc ttcagggaag agcgaaataa gaatgccttt catcttttgt actttatgac     240
tgacaacaat ctatctgatt gttttcctga gttttctggc aacgaaatga ggtcaacatt     300
atg ggg aaa aac tcc tca tcc ttt agc gtg gtc cgt ttt tta acg gtg       348
Met Gly Lys Asn Ser Ser Ser Phe Ser Val Val Arg Phe Leu Thr Val
1               5                   10                  15
ctg ttc gcc gtg cta acg ggt gcg ttc atg tta att ggt ggt atc tgg       396
Leu Phe Ala Val Leu Thr Gly Ala Phe Met Leu Ile Gly Gly Ile Trp
            20                  25                  30
ctg gcc acg atc ggt ggt tcc tgg tac tac atc atc ggc ggt gca gcc       444
Leu Ala Thr Ile Gly Gly Ser Trp Tyr Tyr Ile Ile Gly Gly Ala Ala
        35                  40                  45
atg ctg ctt acc gct ttc ctg ctg tgg cga cgt aac agc gct gcc ctg       492
Met Leu Leu Thr Ala Phe Leu Leu Trp Arg Arg Asn Ser Ala Ala Leu
    50                  55                  60
gtt gtc tat gcg ctc tta ctg ctg gct acg ctg gcc tgg ggc gtt tgg       540
Val Val Tyr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Thr Leu Ala Trp Gly Val Trp
65                  70                  75                  80
gaa gtc ggc acc gac ttc tgg gca ctg gca ccg cgt acc gac gta ctg       588
Glu Val Gly Thr Asp Phe Trp Ala Leu Ala Pro Arg Thr Asp Val Leu
                85                  90                  95
gtg atc ttt ggc gtc tgg ctg gtg ttg ccc ttt gtc tat cgc ggc tta       636
Val Ile Phe Gly Val Trp Leu Val Leu Pro Phe Val Tyr Arg Gly Leu
            100                 105                 110
tac cag ccg ggt aaa ggc gca ctg ggt gcc atg ggc gta gcg ctg gtt       684
Tyr Gln Pro Gly Lys Gly Ala Leu Gly Ala Met Gly Val Ala Leu Val
        115                 120                 125
gcc agt gca gcg gtg tta acc tat tcc gtc ttt aat gat ccg caa gtg       732
```

```
Ala Ser Ala Ala Val Leu Thr Tyr Ser Val Phe Asn Asp Pro Gln Val
    130                 135                 140
gtt aac ggt gca tta ccg gca aca gcg gat aat gcg cct cag gca cag      780
Val Asn Gly Ala Leu Pro Ala Thr Ala Asp Asn Ala Pro Gln Ala Gln
145                 150                 155                 160
ccg ttg agc aat att gct gat ggt gac tgg ccg gcc tat gcg cgc gat      828
Pro Leu Ser Asn Ile Ala Asp Gly Asp Trp Pro Ala Tyr Ala Arg Asp
                165                 170                 175
cag caa ggg acg cgc ttc tcg ccg ctc aag cag atc aac cac gac aat      876
Gln Gln Gly Thr Arg Phe Ser Pro Leu Lys Gln Ile Asn His Asp Asn
            180                 185                 190
gtg aaa gaa ctg cag gtt gcc tgg caa ttc cag acc ggt gat atg aaa      924
Val Lys Glu Leu Gln Val Ala Trp Gln Phe Gln Thr Gly Asp Met Lys
        195                 200                 205
cgc cca agc gat ccg ggc gaa att acc gat gaa gtg acg cca atc aag      972
Arg Pro Ser Asp Pro Gly Glu Ile Thr Asp Glu Val Thr Pro Ile Lys
    210                 215                 220
att cgc gac acg ctg tat ctt tgc acg cca cat cag att tta ttt gct     1020
Ile Arg Asp Thr Leu Tyr Leu Cys Thr Pro His Gln Ile Leu Phe Ala
225                 230                 235                 240
ctg gat gcg gcc acc ggc aag caa aag tgg aag ttt gat ccc ggc ctg     1068
Leu Asp Ala Ala Thr Gly Lys Gln Lys Trp Lys Phe Asp Pro Gly Leu
                245                 250                 255
aaa acc aac cca acc ttc cag cac gtg acc tgt cgt ggt gtg tca tac     1116
Lys Thr Asn Pro Thr Phe Gln His Val Thr Cys Arg Gly Val Ser Tyr
            260                 265                 270
cac gaa ttc cct gca gcg aag gat gcg tcc aat acc cag cct gcg ctg     1164
His Glu Phe Pro Ala Ala Lys Asp Ala Ser Asn Thr Gln Pro Ala Leu
        275                 280                 285
tgc tcg cgt cgt atc tac ctg cca gtc aat gac ggg cgt ttg ttc gcg     1212
Cys Ser Arg Arg Ile Tyr Leu Pro Val Asn Asp Gly Arg Leu Phe Ala
    290                 295                 300
ctg gat gcg gaa acc ggt gaa cgc tgc ccg gcc ttt ggt aac aac ggt     1260
Leu Asp Ala Glu Thr Gly Glu Arg Cys Pro Ala Phe Gly Asn Asn Gly
305                 310                 315                 320
gag ctg gat ctg cag cac aag cag ccg gtc aca acg cca ggc atg tat     1308
Glu Leu Asp Leu Gln His Lys Gln Pro Val Thr Thr Pro Gly Met Tyr
                325                 330                 335
gag cca acc tcg cca ccg gtg att act gac acc acc att gtg atg gct     1356
Glu Pro Thr Ser Pro Pro Val Ile Thr Asp Thr Thr Ile Val Met Ala
            340                 345                 350
ggc gcg gta acc gat aac ttt tca acc cgt gaa cct tca ggc gcc atc     1404
Gly Ala Val Thr Asp Asn Phe Ser Thr Arg Glu Pro Ser Gly Ala Ile
        355                 360                 365
cgt ggc ttt gat gtg aac acc ggt aag ctg ttg tgg gtg ttc gat ccg     1452
Arg Gly Phe Asp Val Asn Thr Gly Lys Leu Leu Trp Val Phe Asp Pro
    370                 375                 380
ggc gcg aaa gat cct aac gcg att ccg gcg gat gaa cac acg ttc acc     1500
Gly Ala Lys Asp Pro Asn Ala Ile Pro Ala Asp Glu His Thr Phe Thr
385                 390                 395                 400
atg aac tcc cct aac tcg tgg gca cct gcg gtt tac gat ccg aag ctg     1548
Met Asn Ser Pro Asn Ser Trp Ala Pro Ala Val Tyr Asp Pro Lys Leu
                405                 410                 415
gat atc gtt tac ctg cca atg ggg gtg acc acg ccg gat atc tgg ggc     1596
Asp Ile Val Tyr Leu Pro Met Gly Val Thr Thr Pro Asp Ile Trp Gly
            420                 425                 430
ggc aac cgc aca cct gag cag gaa cgt tat gcc agc agc gtg ctg gcg     1644
Gly Asn Arg Thr Pro Glu Gln Glu Arg Tyr Ala Ser Ser Val Leu Ala
        435                 440                 445
ctg aac gcg acg acc ggt aag ctg gtg tgg tca tat cag act gtg cat     1692
```

```
Leu Asn Ala Thr Thr Gly Lys Leu Val Trp Ser Tyr Gln Thr Val His
    450                 455                 460
cac gat ctg tgg gat atg gac ctg cct tcg cag ccg acg ctg gcg gat     1740
His Asp Leu Trp Asp Met Asp Leu Pro Ser Gln Pro Thr Leu Ala Asp
465                 470                 475                 480
att acc gat aaa gac ggt aat acc gtg ccg gtt atc tat gcc cct gcc     1788
Ile Thr Asp Lys Asp Gly Asn Thr Val Pro Val Ile Tyr Ala Pro Ala
                485                 490                 495
aaa acc ggg aac atc ttt gtt ctg gat cgc cgc aca ggt aaa act gtg     1836
Lys Thr Gly Asn Ile Phe Val Leu Asp Arg Arg Thr Gly Lys Thr Val
            500                 505                 510
gtt ccg gcc ccg gaa acc cct gtt ccg cag ggc gca gct aag ggc gac     1884
Val Pro Ala Pro Glu Thr Pro Val Pro Gln Gly Ala Ala Lys Gly Asp
        515                 520                 525
cat gtc tca gct aca cag cct tac tct gaa ctg acc ttc cgt ccg aaa     1932
His Val Ser Ala Thr Gln Pro Tyr Ser Glu Leu Thr Phe Arg Pro Lys
    530                 535                 540
cag aac ctg acg gat aag gac atg tgg ggc gcg acg atg tat gac cag     1980
Gln Asn Leu Thr Asp Lys Asp Met Trp Gly Ala Thr Met Tyr Asp Gln
545                 550                 555                 560
ctg gtg tgc cgc gtg att ttc aaa cgt ctg cgc tac gaa ggt ccg ttc     2028
Leu Val Cys Arg Val Ile Phe Lys Arg Leu Arg Tyr Glu Gly Pro Phe
                565                 570                 575
acg cca cct tct gag cag ggc acc ctg gtc ttc ccg ggc aac ctg ggc     2076
Thr Pro Pro Ser Glu Gln Gly Thr Leu Val Phe Pro Gly Asn Leu Gly
            580                 585                 590
atg ttt gaa tgg ggc ggc att tcc gtt gat ccg cat cgt cag att gcg     2124
Met Phe Glu Trp Gly Gly Ile Ser Val Asp Pro His Arg Gln Ile Ala
        595                 600                 605
att gct aac cca atg gcg ctg ccg ttc gtg tct aag ctg atc cca cgc     2172
Ile Ala Asn Pro Met Ala Leu Pro Phe Val Ser Lys Leu Ile Pro Arg
    610                 615                 620
ggt ccg ggt aat ccg gaa gag cca cca aaa ggc gca acg ggc ggt tca     2220
Gly Pro Gly Asn Pro Glu Glu Pro Pro Lys Gly Ala Thr Gly Gly Ser
625                 630                 635                 640
ggt act gaa acc ggt att cag ccg cag tac ggt gtg cca tat ggc gtt     2268
Gly Thr Glu Thr Gly Ile Gln Pro Gln Tyr Gly Val Pro Tyr Gly Val
                645                 650                 655
gaa ctg aat ccg ttc ctg tca cct ttt ggt ctg ccg tgt aaa caa cct     2316
Glu Leu Asn Pro Phe Leu Ser Pro Phe Gly Leu Pro Cys Lys Gln Pro
            660                 665                 670
gca tgg ggt tat gtt tct gct gtt gac ctg aaa acc aac gaa gtg gtg     2364
Ala Trp Gly Tyr Val Ser Ala Val Asp Leu Lys Thr Asn Glu Val Val
        675                 680                 685
tgg aaa caa cgt att ggt acc gtt cgt gac agc tca cct gta ccg ctg     2412
Trp Lys Gln Arg Ile Gly Thr Val Arg Asp Ser Ser Pro Val Pro Leu
    690                 695                 700
ccc ttt aaa atg ggt atg cca atg ctg ggc gga ccg gtt gcc acc gca     2460
Pro Phe Lys Met Gly Met Pro Met Leu Gly Gly Pro Val Ala Thr Ala
705                 710                 715                 720
ggc aaa gtg ttc ttt att ggc gca acg gct gat aac tac ctg cgc gct     2508
Gly Lys Val Phe Phe Ile Gly Ala Thr Ala Asp Asn Tyr Leu Arg Ala
                725                 730                 735
ttc agc acc gac acc ggt gaa ctc ttg tgg cag gcg cgc ctg cca gcc     2556
Phe Ser Thr Asp Thr Gly Glu Leu Leu Trp Gln Ala Arg Leu Pro Ala
            740                 745                 750
ggt ggt cag gca acg cca atg acc tat gaa gtt aac ggc aag caa tac     2604
Gly Gly Gln Ala Thr Pro Met Thr Tyr Glu Val Asn Gly Lys Gln Tyr
        755                 760                 765
gtt gtg att gct gcc ggt ggc cat ggt tca ttc ggc acc aag ctg ggc     2652

Val Val Ile Ala Ala Gly Gly His Gly Ser Phe Gly Thr Lys Leu Gly
    770                 775                 780
gat tac gtg att gcc tat gcg ctg ccc gac cag aag taa ttaacacctg      2701
Asp Tyr Val Ile Ala Tyr Ala Leu Pro Asp Gln Lys
785                 790                 795
aacagaggcg gactccggtc cgccttttt tatgcctgct atctgccctg tgcttttgcg    2761
cgtggggagc gccagcttaa ccaggcgcac agccccatga ccatgcaggt ggccagaaat   2821
actggccgca ttccccacgc gccaccaatc accccaccaa aaaggggacc actgacctgg   2881
ccgatatact gcgccgacgt cgaatagccg agcatgcgcc ccacctgcac              2931
```

<210> 2
<211> 796
<212> PRT
<213> Pantoea ananatis

<400> 2
Met Gly Lys Asn Ser Ser Ser Phe Ser Val Val Arg Phe Leu Thr Val
1 5 10 15
Leu Phe Ala Val Leu Thr Gly Ala Phe Met Leu Ile Gly Gly Ile Trp
20 25 30
Leu Ala Thr Ile Gly Gly Ser Trp Tyr Tyr Ile Ile Gly Gly Ala Ala
35 40 45
Met Leu Leu Thr Ala Phe Leu Leu Trp Arg Arg Asn Ser Ala Ala Leu
50 55 60
Val Val Tyr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Thr Leu Ala Trp Gly Val Trp
65 70 75 80
Glu Val Gly Thr Asp Phe Trp Ala Leu Ala Pro Arg Thr Asp Val Leu
85 90 95
Val Ile Phe Gly Val Trp Leu Val Leu Pro Phe Val Tyr Arg Gly Leu
100 105 110
Tyr Gln Pro Gly Lys Gly Ala Leu Gly Ala Met Gly Val Ala Leu Val
115 120 125
Ala Ser Ala Ala Val Leu Thr Tyr Ser Val Phe Asn Asp Pro Gln Val
130 135 140
Val Asn Gly Ala Leu Pro Ala Thr Ala Asp Asn Ala Pro Gln Ala Gln
145 150 155 160
Pro Leu Ser Asn Ile Ala Asp Gly Asp Trp Pro Ala Tyr Ala Arg Asp
165 170 175
Gln Gln Gly Thr Arg Phe Ser Pro Leu Lys Gln Ile Asn His Asp Asn
180 185 190
Val Lys Glu Leu Gln Val Ala Trp Gln Phe Gln Thr Gly Asp Met Lys
195 200 205
Arg Pro Ser Asp Pro Gly Glu Ile Thr Asp Glu Val Thr Pro Ile Lys
210 215 220
Ile Arg Asp Thr Leu Tyr Leu Cys Thr Pro His Gln Ile Leu Phe Ala
225 230 235 240
Leu Asp Ala Ala Thr Gly Lys Gln Lys Trp Lys Phe Asp Pro Gly Leu
245 250 255
Lys Thr Asn Pro Thr Phe Gln His Val Thr Cys Arg Gly Val Ser Tyr
260 265 270
His Glu Phe Pro Ala Ala Lys Asp Ala Ser Asn Thr Gln Pro Ala Leu
275 280 285
Cys Ser Arg Arg Ile Tyr Leu Pro Val Asn Asp Gly Arg Leu Phe Ala
290 295 300
Leu Asp Ala Glu Thr Gly Glu Arg Cys Pro Ala Phe Gly Asn Asn Gly
305 310 315 320
Glu Leu Asp Leu Gln His Lys Gln Pro Val Thr Thr Pro Gly Met Tyr
325 330 335
Glu Pro Thr Ser Pro Pro Val Ile Thr Asp Thr Thr Ile Val Met Ala

```
            340                 345                 350
Gly Ala Val Thr Asp Asn Phe Ser Thr Arg Glu Pro Ser Gly Ala Ile
        355                 360                 365
Arg Gly Phe Asp Val Asn Thr Gly Lys Leu Leu Trp Val Phe Asp Pro
    370                 375                 380
Gly Ala Lys Asp Pro Asn Ala Ile Pro Ala Asp Glu His Thr Phe Thr
385                 390                 395                 400
Met Asn Ser Pro Asn Ser Trp Ala Pro Ala Val Tyr Asp Pro Lys Leu
                405                 410                 415
Asp Ile Val Tyr Leu Pro Met Gly Val Thr Thr Pro Asp Ile Trp Gly
            420                 425                 430
Gly Asn Arg Thr Pro Glu Gln Glu Arg Tyr Ala Ser Ser Val Leu Ala
        435                 440                 445
Leu Asn Ala Thr Thr Gly Lys Leu Val Trp Ser Tyr Gln Thr Val His
    450                 455                 460
His Asp Leu Trp Asp Met Asp Leu Pro Ser Gln Pro Thr Leu Ala Asp
465                 470                 475                 480
Ile Thr Asp Lys Asp Gly Asn Thr Val Pro Val Ile Tyr Ala Pro Ala
                485                 490                 495
Lys Thr Gly Asn Ile Phe Val Leu Asp Arg Arg Thr Gly Lys Thr Val
            500                 505                 510
Val Pro Ala Pro Glu Thr Pro Val Pro Gln Gly Ala Ala Lys Gly Asp
        515                 520                 525
His Val Ser Ala Thr Gln Pro Tyr Ser Glu Leu Thr Phe Arg Pro Lys
    530                 535                 540
Gln Asn Leu Thr Asp Lys Asp Met Trp Gly Ala Thr Met Tyr Asp Gln
545                 550                 555                 560
Leu Val Cys Arg Val Ile Phe Lys Arg Leu Arg Tyr Glu Gly Pro Phe
                565                 570                 575
Thr Pro Pro Ser Glu Gln Gly Thr Leu Val Phe Pro Gly Asn Leu Gly
            580                 585                 590
Met Phe Glu Trp Gly Gly Ile Ser Val Asp Pro His Arg Gln Ile Ala
        595                 600                 605
Ile Ala Asn Pro Met Ala Leu Pro Phe Val Ser Lys Leu Ile Pro Arg
    610                 615                 620
Gly Pro Gly Asn Pro Glu Glu Pro Pro Lys Gly Ala Thr Gly Gly Ser
625                 630                 635                 640
Gly Thr Glu Thr Gly Ile Gln Pro Gln Tyr Gly Val Pro Tyr Gly Val
                645                 650                 655
Glu Leu Asn Pro Phe Leu Ser Pro Phe Gly Leu Pro Cys Lys Gln Pro
            660                 665                 670
Ala Trp Gly Tyr Val Ser Ala Val Asp Leu Lys Thr Asn Glu Val Val
        675                 680                 685
Trp Lys Gln Arg Ile Gly Thr Val Arg Asp Ser Ser Pro Val Pro Leu
    690                 695                 700
Pro Phe Lys Met Gly Met Pro Met Leu Gly Gly Pro Val Ala Thr Ala
705                 710                 715                 720
Gly Lys Val Phe Phe Ile Gly Ala Thr Ala Asp Asn Tyr Leu Arg Ala
                725                 730                 735
Phe Ser Thr Asp Thr Gly Glu Leu Leu Trp Gln Ala Arg Leu Pro Ala
            740                 745                 750
Gly Gly Gln Ala Thr Pro Met Thr Tyr Glu Val Asn Gly Lys Gln Tyr
        755                 760                 765
Val Val Ile Ala Ala Gly Gly His Gly Ser Phe Gly Thr Lys Leu Gly
    770                 775                 780
Asp Tyr Val Ile Ala Tyr Ala Leu Pro Asp Gln Lys
785                 790                 795
```

<210> 3
<211> 1308
<212> ADN
<213> Pantoea ananatis

<400> 3
atgagcagaa tcatgacgcc cgtgaactgg gaagcctgca gcagcgaggc gcagcaggcg 60
ctgttggcac gccctgcgct cgcctcgtct gacagcatca gccagatcgt gcgcgatgtg 120
ttggtcagag tgaaagagga aggcgatgcg gctttacgag aattcagcgc gcgctttgac 180
aaggttgaaa cagacgacct gcgcgttacg ccacagcaga tgcaggcggc cagcgatcgc 240
cttggtgacg agctgaaaca ggcgatggcc gtggccattg gcaatattga aacctttcac 300
cgtgcgcaga tcctgccgcc ggtggatgtg gaaacgcagc ccggcgtgcg ctgtcagcaa 360
attacgcgcc cgatgaaatc ggtgggcttg tatattccgg gcggttctgc cccgctgttt 420
tctaccgttc tgatgctggc tacccccggcg cggattgcgg gctgtggtcg cgtggtgctg 480
tgctcgcccc cgccgattgc tgatgaaatt ctctacgcgg ccaaactttg cggtgtggaa 540
gaagtgttcc aggtgggtgg atcacaggcg attgccgccc tggcttttgg caccgaaagc 600
atccctaagg tagataaaat ttttggtccg ggcaacgcgt gggttaccga agccaaacgt 660
caggtcagcc agcgccttga tggcgcggcg attgatatgc ccgctggccc gtcggaagtg 720
ctggtgattg ccgatgaagg tgccacaccg gccttcgttg cctctgatct gctgtcgcag 780
gcggaacacg gccctgactc gcaggtgatt ttactgacgc cttcgctggc gctggccgag 840
cgcgtcgccg aggcggtgga ggatcagctg gcccagttgc cacgtgcggc gacagcccgc 900
caggcactgg aaagcagccg cctgatcgtc gcccgggata tgcagcaatg cattgcgatc 960
tccaaccgct atggtccgga gcacctgatt ctgcaaaccc gcacgccacg ggatctggtg 1020
gaacagatta ccagcgccgg ttcggttttc ctgggcgact ggtcaccgga atccgcagga 1080
gattatgctt cgggcaccaa ccacgtgctg ccgacctacg gctataccgc gacatgctcc 1140
agcctgggcc tggccgactt tcagaaacgc atgacggtac aggagctgac gccgcagggc 1200
ttcctgaacc tggcggcgac catcgaaacc ctggcggccg ctgaacagct gcacgcccac 1260
aaaaatgccg tcacgttgcg cgttgccgca ctcaaggagc aagcatga 1308

<210> 4
<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 4
ccatagcggt tggagatcgc aatgcattgc tgcatatccc tgaagcctgc ttttttatac 60
taagttgg 68

<210> 5
<211> 68
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
gcccgccagg cactggaaag cagccgcctg atcgtcgccc cgctcaagtt agtataaaaa 60
agctgaac 68

<210> 6
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 6
tagcgagatc tctgatgtcc ggcggtgctt ttg 33

<210> 7
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 7
aaaaagagct cttacgcccc gccctgccac tc 32

<210> 8
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 8
caggatctag aaggagacat gaacgatgaa catc 34

<210> 9
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
gataaggatc cgaaataaaa gaaaatgcca atagga 36

<210> 10
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 10
cctttgagct cgcgggcagt gagcgcaacg c 31

<210> 11
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 11
ctagagcggc cgccgatcgg gatcctcctg tgtgaaattg ttatccgc 48

<210> 12
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 12
ctctacgatc gaggaggtta taaaaaatgg atattaatac tg 42

<210> 13
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 13
tcaaagcggc cgcttcttcg tctgtttcta ctggta 36

<210> 14
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 14
cctttggtac cgcgggcagt gagcgcaacg c 31

<210> 15
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 15
aacaggaatt ctttgcctgg cggcagtagc gcgg 34

<210> 16
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P1

<400> 16
ctagtaagat cttgaagcct gctttttat actaagttgg 40

<210> 17
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P2

<400> 17
atgatcgaat tcgaaatcaa ataatgattt tattttgact g 41

<210> 18
<211> 120
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de ADN que contiene attL

<400> 18
agatcttgaa gcctgctttt ttatactaag ttggcattat aaaaaagcat tgcttatcaa 60
tttgttgcaa cgaacaggtc actatcagtc aaaataaaat cattatttga tttcgaattc 120

<210> 19
<211> 41

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P3

<400> 19
atgccactgc agtctgttac aggtcactaa taccatctaa g 41

<210> 20
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P4

<400> 20
accgttaagc tttctagacg ctcaagttag tataaaaaag ctgaac 46

<210> 21
<211> 184
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de ADN que contiene attR

<400> 21
ctgcagtctg ttacaggtca ctaataccat ctaagtagtt gattcatagt gactgcatat 60
gttgtgtttt acagtattat gtagtctgtt ttttatgcaa aatctaattt aatatattga 120
tatttatatc attttacgtt tctcgttcag ctttttttata ctaacttgag cgtctagaaa 180
gctt 184

<210> 22
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P5

<400> 22
ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgc 38

<210> 23
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P6

<400> 23
taacagagat ctcgcgcaga aaaaaaggat ctcaaga 37

<210> 24
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P7

<400> 24
aacagagatc taagcttaga tcctttgcct ggcggcagta gcgcgg 46

<210> 25
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P8

<400> 25
ataaactgca gcaaaaagag tttgtagaaa cgcaa 35

<210> 26
<211> 1388
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento de ADN que contiene el gen Tc y ter_thrL

<400> 26
gaattctcat gtttgacagc ttatcatcga taagctttaa tgcggtagtt tatcacagtt 60
aaattgctaa cgcagtcagg caccgtgtat gaaatctaac aatgcgctca tcgtcatcct 120
cggcaccgtc accctggatg ctgtaggcat aggcttggtt atgccggtac tgccgggcct 180
cttgcgggat atcgtccatt ccgacagcat cgccagtcac tatggcgtgc tgctagcgct 240
atatgcgttg atgcaatttc tatgcgcacc cgttctcgga gcactgtccg accgctttgg 300
ccgccgccca gtcctgctcg cttcgctact tggagccact atcgactacg cgatcatggc 360
gaccacaccc gtcctgtgga tcctctacgc cggacgcatc gtggccggca tcaccggcgc 420
cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg 480
ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg 540
gggactgttg ggcgccatct ccttgcatgc accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg 600
cctcaaccta ctactgggct gcttcctaat gcaggagtcg cataagggag agcgtcgacc 660
gatgcccttg agagccttca acccagtcag ctccttccgg tgggcgcggg gcatgactat 720
cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat catgcaactc gtaggacagg tgccggcagc 780
gctctgggtc attttcggcg aggaccgctt tcgctggagc gcgacgatga tcggcctgtc 840
gcttgcggta ttcggaatct tgcacgccct cgctcaagcc ttcgtcactg gtcccgccac 900
caaacgtttc ggcgagaagc aggccattat cgccggcatg gcggccgacg cgctgggcta 960
cgtcttgctg gcgttcgcga cgcgaggctg gatggccttc cccattatga ttcttctcgc 1020
ttccggcggc atcgggatgc ccgcgttgca ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga 1080
ccatcaggga cagcttcaag gatcgctcgc ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg 1140
accgctgatc gtcacggcga tttatgccgc ctcggcgagc acatggaacg ggttggcatg 1200
gattgtaggc gccgccctat accttgtctg cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag 1260
ccgggccacc tcgacctgaa tggaagccgg cggcacctcg ctaacggatt caccactcca 1320
actagaaagc ttaacacaga aaaaagcccg cacctgacag tgcgggcttt ttttttcgac 1380
cactgcag 1388

<210> 27
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P9

<400> 27
agtaattcta gaaagcttaa cacagaaaaa agcccg 36

<210> 28
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P10

<400> 28
ctagtaggat ccctgcagtg gtcgaaaaaa aaagcccgca ctg 43

<210> 29
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador 1

<400> 29
ggaagatcta tttgccttcg cacatcaacc tgg 33

<210> 30
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador 2

<400> 30
cggggtacct tgtaaatatt ttaacccgcc 30

<210> 31
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador 3

<400> 31
ggaagatcta aggagacctt aaatgagcga cacaacgatc ctgcaaaaca gtaccc 56

<210> 32
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador 4

<400> 32
cggggtacct cgtagaggtt tactggcgct tatccagcg 39

<210> 33
<211> 80
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 33
ctatctgatt gttttcctga gttttctggc aacgaaatga ggtcaacatt tgaagcctgc 60
ttttttatac taagttggca 80

<210> 34
<211> 80
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 34
agcaggcata aaaaaaggcg gaccggagtc cgcctctgtt caggtgttaa cgctcaagtt 60
agtataaaaa agctgaacga 80

<210> 35
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 35
gatatggatc atcacgcttc a 21

<210> 36
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 36
catgctcggc tattcgac 18

<210> 37
<211> 1422
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (301)..(1119)

<400> 37
tcggtcaggg catggatgta caaagcgcgc aggagaagat tggtcaggtg gtggaaggct 60
accgcaatac gaaagaagtc cgcgaactgg cgcatcgctt cggcgttgaa atgccaataa 120
ccgaggaaat ttatcaagta ttatattgcg gaaaaaacgc gcgcgaggca gcattgactt 180
tactaggtcg tgcacgcaag gacgagcgca gcagccacta accccaggga acctttgtta 240
ccgctatgac ccggcccgcg cagaacgggc cggtcattat ctcatcgtgt ggagtaagca 300
atg tcg tgt gaa gaa ctg gaa att gtc tgg aac aat att aaa gcc gaa 348
Met Ser Cys Glu Glu Leu Glu Ile Val Trp Asn Asn Ile Lys Ala Glu
1 5 10 15
gcc aga acg ctg gcg gac tgt gag cca atg ctg gcc agt ttt tac cac 396
Ala Arg Thr Leu Ala Asp Cys Glu Pro Met Leu Ala Ser Phe Tyr His
20 25 30
gcg acg cta ctc aag cac gaa aac ctt ggc agt gca ctg agc tac atg 444
Ala Thr Leu Leu Lys His Glu Asn Leu Gly Ser Ala Leu Ser Tyr Met
35 40 45
ctg gcg aac aag ctg tca tcg cca att atg cct gct att gct atc cgt 492
Leu Ala Asn Lys Leu Ser Ser Pro Ile Met Pro Ala Ile Ala Ile Arg

```
    50                  55                  60
gaa gtg gtg gaa gaa gcc tac gcc gct gac ccg gaa atg atc gcc tct      540
Glu Val Val Glu Glu Ala Tyr Ala Ala Asp Pro Glu Met Ile Ala Ser
65                  70                  75                  80
gcg gcc tgt gat att cag gcg gtg cgt acc cgc gac ccg gca gtc gat      588
Ala Ala Cys Asp Ile Gln Ala Val Arg Thr Arg Asp Pro Ala Val Asp
                85                  90                  95
aaa tac tca acc ccg ttg tta tac ctg aag ggt ttt cat gcc ttg cag      636
Lys Tyr Ser Thr Pro Leu Leu Tyr Leu Lys Gly Phe His Ala Leu Gln
            100                 105                 110
gcc tat cgc atc ggt cac tgg ttg tgg aat cag ggg cgt cgc gca ctg      684
Ala Tyr Arg Ile Gly His Trp Leu Trp Asn Gln Gly Arg Arg Ala Leu
        115                 120                 125
gca atc ttt ctg caa aac cag gtt tct gtg acg ttc cag gtc gat att      732
Ala Ile Phe Leu Gln Asn Gln Val Ser Val Thr Phe Gln Val Asp Ile
    130                 135                 140
cac ccg gca gca aaa att ggt cgc ggt atc atg ctt gac cac gcg aca      780
His Pro Ala Ala Lys Ile Gly Arg Gly Ile Met Leu Asp His Ala Thr
145                 150                 155                 160
ggc atc gtc gtt ggt gaa acg gcg gtg att gaa aac gac gta tcg att      828
Gly Ile Val Val Gly Glu Thr Ala Val Ile Glu Asn Asp Val Ser Ile
                165                 170                 175
ctg caa tct gtg acg ctt ggc ggt acg ggt aaa tct ggt ggt gac cgt      876
Leu Gln Ser Val Thr Leu Gly Gly Thr Gly Lys Ser Gly Gly Asp Arg
            180                 185                 190
cac ccg aaa att cgt gaa ggt gtg atg att ggc gcg ggc gcg aaa atc      924
His Pro Lys Ile Arg Glu Gly Val Met Ile Gly Ala Gly Ala Lys Ile
        195                 200                 205
ctc ggc aat att gaa gtt ggg cgc ggc gcg aag att ggc gca ggt tcc      972
Leu Gly Asn Ile Glu Val Gly Arg Gly Ala Lys Ile Gly Ala Gly Ser
    210                 215                 220
gtg gtg ctg caa ccg gtg ccg ccg cat acc acc gcc gct ggc gtt ccg     1020
Val Val Leu Gln Pro Val Pro Pro His Thr Thr Ala Ala Gly Val Pro
225                 230                 235                 240
gct cgt att gtc ggt aaa cca gac agc gat aag cca tca atg gat atg     1068
Ala Arg Ile Val Gly Lys Pro Asp Ser Asp Lys Pro Ser Met Asp Met
                245                 250                 255
gac cag cat ttc aac ggt att aac cat aca ttt gag tat ggg gat ggg     1116
Asp Gln His Phe Asn Gly Ile Asn His Thr Phe Glu Tyr Gly Asp Gly
            260                 265                 270
atc taatgtcctg tgatcgtgcc ggatgcgatg taatcatcta tccggcctac          1169
Ile

agtaactaat ctctcaatac cgctcccgga taccccaact gccgccaggc ttcatacacc   1229
actaccgaca ccgcattgga cagattcatg ctgcggctgt ccggcaccat cggaatgcga   1289
atttttgtt cagcgggcag ggcatcaaga atgctcgctg gcaggccgcg tgtttccggg    1349
ccgaacatca gataatcgcc atcctgatag cttacggcgc tgtgagcagg tgtacctttc   1409
gtggtgaggg cga                                                      1422
```

<210> 38
<211> 273
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 38

```
Met Ser Cys Glu Glu Leu Glu Ile Val Trp Asn Asn Ile Lys Ala Glu
1               5                   10                  15
Ala Arg Thr Leu Ala Asp Cys Glu Pro Met Leu Ala Ser Phe Tyr His
            20                  25                  30
```

```
Ala Thr Leu Leu Lys His Glu Asn Leu Gly Ser Ala Leu Ser Tyr Met
        35                  40                  45
Leu Ala Asn Lys Leu Ser Ser Pro Ile Met Pro Ala Ile Ala Ile Arg
    50                  55                  60
Glu Val Val Glu Glu Ala Tyr Ala Ala Asp Pro Glu Met Ile Ala Ser
65                  70                  75                  80
Ala Ala Cys Asp Ile Gln Ala Val Arg Thr Arg Asp Pro Ala Val Asp
                85                  90                  95
Lys Tyr Ser Thr Pro Leu Leu Tyr Leu Lys Gly Phe His Ala Leu Gln
            100                 105                 110
Ala Tyr Arg Ile Gly His Trp Leu Trp Asn Gln Gly Arg Arg Ala Leu
        115                 120                 125
Ala Ile Phe Leu Gln Asn Gln Val Ser Val Thr Phe Gln Val Asp Ile
    130                 135                 140
His Pro Ala Ala Lys Ile Gly Arg Gly Ile Met Leu Asp His Ala Thr
145                 150                 155                 160
Gly Ile Val Val Gly Glu Thr Ala Val Ile Glu Asn Asp Val Ser Ile
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Val Thr Leu Gly Gly Thr Gly Lys Ser Gly Gly Asp Arg
            180                 185                 190
His Pro Lys Ile Arg Glu Gly Val Met Ile Gly Ala Gly Ala Lys Ile
        195                 200                 205
Leu Gly Asn Ile Glu Val Gly Arg Gly Ala Lys Ile Gly Ala Gly Ser
    210                 215                 220
Val Val Leu Gln Pro Val Pro Pro His Thr Thr Ala Ala Gly Val Pro
225                 230                 235                 240
Ala Arg Ile Val Gly Lys Pro Asp Ser Asp Lys Pro Ser Met Asp Met
                245                 250                 255
Asp Gln His Phe Asn Gly Ile Asn His Thr Phe Glu Tyr Gly Asp Gly
            260                 265                 270
Ile
```

<210> 39
<211> 1039
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (201)..(839)

<400> 39

```
tgcggataac ggtagaattt ttacgccagt attttgccga gcactacccg aatttttcac     60
tggagcatgc ctgattaatg attcaattat cgggttgata tcaggttaaa acctgatttt    120
ctcctttcta agccgctaca gattggttag catattcacc tttaatcgcg catgatcgaa    180
agataattaa agaggttaat gtg ttc gct gaa tac ggg gtt ctg aat tac tgg    233
                      Val Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp
                      1               5                   10
acc tat ctg gtt ggg gcc att ttt att gtg ttg gtg cca ggg cca aat      281
Thr Tyr Leu Val Gly Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn
            15                  20                  25
acc ctg ttt gta ctc aaa aat agc gtc agt agc ggt atg aaa ggc ggt      329
Thr Leu Phe Val Leu Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly
        30                  35                  40
tat ctt gcg gcc tgc ggt gta ttt att ggc gat gcg gta ttg atg ttt      377
Tyr Leu Ala Ala Cys Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe
    45                  50                  55
ctg gca tgg gct gga gtg gcg aca tta att aag acc acc ccg ata tta      425
Leu Ala Trp Ala Gly Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu
```

```
60                  65                  70                  75
ttc aac att gta cgt tat ctt ggt gcg ttt tat ttg ctc tat ctg ggg      473
Phe Asn Ile Val Arg Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly
                80                  85                  90
agt aaa att ctt tac gcg acc ctg aag ggt aaa aat agc gag gcc aaa      521
Ser Lys Ile Leu Tyr Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys
            95                  100                 105
tcc gat gag ccc caa tac ggt gct att ttt aaa cgc gcg tta att ttg      569
Ser Asp Glu Pro Gln Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu
        110                 115                 120
agc ctg act aat ccg aaa gcc att ttg ttc tat gtg tcg ttt ttc gta      617
Ser Leu Thr Asn Pro Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val
    125                 130                 135
cag ttt atc gat gtt aat gcc cca cat acg gga att tca ttc ttt att      665
Gln Phe Ile Asp Val Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile
140                 145                 150                 155
ctg gcg gcg acg ctg gaa ctg gtg agt ttc tgc tat ttg agc ttc ctg      713
Leu Ala Ala Thr Leu Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu
                160                 165                 170
att ata tct ggt gct ttt gtc acg cag tac ata cgt acc aaa aag aaa      761
Ile Ile Ser Gly Ala Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys
            175                 180                 185
ctg gct aaa gtt ggc aac tca ctg att ggt ttg atg ttc gtg ggt ttc      809
Leu Ala Lys Val Gly Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe
        190                 195                 200
gct gcc cga ctg gcg acg ctg caa tcc tga tgctttcagc ccgcgttgtc        859
Ala Ala Arg Leu Ala Thr Leu Gln Ser
    205                 210
gcgggcttcc catctataat cctccctgat tcttcgctga tatggtgcta aaaagtaacc    919
aataaatggt atttaaaatg caaattatca ggcgtaccct gaaacggctg gaataaaccg    979
ttttcagcgc attcaccgaa ggagggaaaa ggatgcttca aatcccacag aattatattc   1039
```

<210> 40
<211> 212
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 40

```
Val Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
1               5                   10                  15
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
            20                  25                  30
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
        35                  40                  45
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
    50                  55                  60
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
65                  70                  75                  80
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
                85                  90                  95
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
            100                 105                 110
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro
        115                 120                 125
Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val
    130                 135                 140
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu
145                 150                 155                 160
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala
```

```
                165                 170                 175
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly
            180                 185                 190
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala
        195                 200                 205
Thr Leu Gln Ser
    210
```

<210> 41
<211> 313
<212> ADN
<213> Escherichia coli

<400> 41

```
gcatgcttcc aactgcgcta atgacgcagc tggacgaagg cgggattctc gtcttacccg     60
taggggagga gcaccagtat ttgaaacggg tgcgtcgtcg gggaggcgaa tttattatcg    120
ataccgtgga ggccgtgcgc tttgtccctt tagtgaaggg tgagctggct taaaacgtga    180
ggaaatacct ggatttttcc tggttatttt gccgcaggtc agcgtatcgt gaacatcttt    240
tccagtgttc agtagggtgc cttgcacggt aattatgtca ctggttatta accaattttt    300
cctgggggtc gac                                                       313
```

<210> 42
<211> 312
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> promotor de nlpD mutante

<400> 42

```
gcatgcttcc aactgcgcta atgacgcagc tggacgaagg cgggattctc gtcttacccg     60
taggggagga gcaccagtat ttgaaacggg tgcgtcgtcg gggaggcgaa tttattatcg    120
ataccgtgga ggccgtgcgc tttgtccctt tagtgaaggg tgagctggct taaaacgtga    180
ggaaatacct ggatttttcc tggttatttt gccgcaggtc agcgtataat gaagatcttt    240
tccagtgttg acaagggtcc ttgcacggtt ataatgtcac tggttattaa ccaattttc     300
ctgggggtcg ac                                                        312
```

<210> 43
<211> 4403
<212> ADN
<213> Pantoea ananatis

<220>
<221> CDS
<222> (301)..(1311)

<220>
<221> CDS
<222> (1317)..(2147)

<220>
<221> CDS
<222> (2150)..(3022)

<400> 43

```
tacagcggaa cctggcacgg gccagaaggg ttgatgccgt cggatgacac actcaagagc     60
tggacgctca gcaaaattgt ctggcagcgc taagtctttt ttcacaccgc tcaaccgcag    120
```

```
ggcataaccg gccctgcgcg tccaattctg tttttcgtct gtcttttccc gccgccttat     180
gcctttttcg actttgaaat cagcaaacga tatataaaac cgttacgggt ttacgctgag     240
ttataaataa actgctgtat ctgcagatga gatctgcatc aaatttcctc agggtgaacc     300
atg acc tta cca gcg atg aaa aaa atc gtg agc gga ctc gca ctg tcg       348
Met Thr Leu Pro Ala Met Lys Lys Ile Val Ser Gly Leu Ala Leu Ser
1               5                   10                  15
ctg agt ctg gcc ggt gcc gca aac gcg acc gag ctg ttg aac agc tct       396
Leu Ser Leu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Thr Glu Leu Leu Asn Ser Ser
            20                  25                  30
tac gat gtc gca cgt gaa tta ttt gtc gcc ctg aat gcg cct ttt gtc       444
Tyr Asp Val Ala Arg Glu Leu Phe Val Ala Leu Asn Ala Pro Phe Val
        35                  40                  45
agc cag tgg gat gcc agc cat cct gac gac aag ctg acc att aag atg       492
Ser Gln Trp Asp Ala Ser His Pro Asp Asp Lys Leu Thr Ile Lys Met
    50                  55                  60
tcc cat gcc ggg tca tcc aaa cag gcg ctg gcg atc ctg caa ggc ctg       540
Ser His Ala Gly Ser Ser Lys Gln Ala Leu Ala Ile Leu Gln Gly Leu
65                  70                  75                  80
cgt gcc gat gtg gtg acc tat aac cag gtc acc gat gtg cag gtg ctg       588
Arg Ala Asp Val Val Thr Tyr Asn Gln Val Thr Asp Val Gln Val Leu
                85                  90                  95
cac gat aaa ggc aaa ctg atc cct gcc gac tgg caa acc cgc ctg ccg       636
His Asp Lys Gly Lys Leu Ile Pro Ala Asp Trp Gln Thr Arg Leu Pro
            100                 105                 110
aat aac agt tcg ccg ttt tac tcc acc atg gcg ttc ctg gtg cgc aag       684
Asn Asn Ser Ser Pro Phe Tyr Ser Thr Met Ala Phe Leu Val Arg Lys
        115                 120                 125
gga aac cca aag cag att cac gac tgg tcc gat tta acc cgt gac gat       732
Gly Asn Pro Lys Gln Ile His Asp Trp Ser Asp Leu Thr Arg Asp Asp
    130                 135                 140
gtg aag ctg att ttt cct aat ccc aaa acc tcg ggc aac gga cgt tat       780
Val Lys Leu Ile Phe Pro Asn Pro Lys Thr Ser Gly Asn Gly Arg Tyr
145                 150                 155                 160
acc tat ctt gct gcc tgg ggc gcc gcc agc aac act gac ggg ggc gat       828
Thr Tyr Leu Ala Ala Trp Gly Ala Ala Ser Asn Thr Asp Gly Gly Asp
                165                 170                 175
cag gct aaa acc cgc gct ttt atg aca aaa ttt ctg aaa aat gtt gaa       876
Gln Ala Lys Thr Arg Ala Phe Met Thr Lys Phe Leu Lys Asn Val Glu
            180                 185                 190
gtc ttc gat acc ggt ggc cga ggt gct acg acc acc ttt gct gaa cgc       924
Val Phe Asp Thr Gly Gly Arg Gly Ala Thr Thr Thr Phe Ala Glu Arg
        195                 200                 205
ggt ctg ggc gat gtg ttg atc agt ttt gag tct gaa gtg aat aac atc       972
Gly Leu Gly Asp Val Leu Ile Ser Phe Glu Ser Glu Val Asn Asn Ile
    210                 215                 220
cgc aac cag tac ggc aaa gac gac tac gaa gtc gtg gtg cct aaa acc      1020
Arg Asn Gln Tyr Gly Lys Asp Asp Tyr Glu Val Val Val Pro Lys Thr
225                 230                 235                 240
gat att ctc gcg gag ttt ccc gtt gcc tgg gta gat aaa aac gtc gag      1068
Asp Ile Leu Ala Glu Phe Pro Val Ala Trp Val Asp Lys Asn Val Glu
                245                 250                 255
cag aat aaa aca gcc gat gca gcg aaa gcc tat ctg acc tgg ctg tat      1116
Gln Asn Lys Thr Ala Asp Ala Ala Lys Ala Tyr Leu Thr Trp Leu Tyr
            260                 265                 270
tct cct gcg gcg cag aaa att att acg gat ttc tat tac cgc gtg aac      1164
Ser Pro Ala Ala Gln Lys Ile Ile Thr Asp Phe Tyr Tyr Arg Val Asn
        275                 280                 285
aat ccg cag tta atg gcg cag caa aaa gcc cgt ttt cct gcc acg aac      1212
Asn Pro Gln Leu Met Ala Gln Gln Lys Ala Arg Phe Pro Ala Thr Asn
    290                 295                 300
```

```
ctg ttt cgt gtt gaa gac att ttt ggc ggc tgg gat aac gtg atg aaa      1260
Leu Phe Arg Val Glu Asp Ile Phe Gly Gly Trp Asp Asn Val Met Lys
305                 310                 315                 320
acc cat ttc gcc agc ggt ggc gag cta gac cag tta tta gcg gcg ggg      1308
Thr His Phe Ala Ser Gly Gly Glu Leu Asp Gln Leu Leu Ala Ala Gly
                325                 330                 335
cgg tgatc atg ttt gca gcc agc caa aaa cgc gtc ctg ccc ggt ttc ggt    1358
Arg       Met Phe Ala Ala Ser Gln Lys Arg Val Leu Pro Gly Phe Gly
                340                 345                 350
ctc agc ctg ggc acc agc ctg ctc ttt acc tgt ctg gtg ctg ctg ctg      1406
Leu Ser Leu Gly Thr Ser Leu Leu Phe Thr Cys Leu Val Leu Leu Leu
            355                 360                 365
cca atc agc gca ctg att atg cag ctg tcg cag atg acg ttg cag caa      1454
Pro Ile Ser Ala Leu Ile Met Gln Leu Ser Gln Met Thr Leu Gln Gln
        370                 375                 380
tac tgg gac gtg gtc acc aat ccg cag ctc atc gcg gcc tat aag gtc      1502
Tyr Trp Asp Val Val Thr Asn Pro Gln Leu Ile Ala Ala Tyr Lys Val
    385                 390                 395
acg ctg ctg tcg gcc ggt gtg gcc tca ctg ttt aat gcc gta ttc ggc      1550
Thr Leu Leu Ser Ala Gly Val Ala Ser Leu Phe Asn Ala Val Phe Gly
400                 405                 410                 415
atg tta atg gcg tgg atc tta acg cgt tac cgt ttt ccg ggc cgc acg      1598
Met Leu Met Ala Trp Ile Leu Thr Arg Tyr Arg Phe Pro Gly Arg Thr
                420                 425                 430
ctg ctc gat ggt ctg atg gat ctg ccg ttt gcg ctg ccg acc gcg gtt      1646
Leu Leu Asp Gly Leu Met Asp Leu Pro Phe Ala Leu Pro Thr Ala Val
            435                 440                 445
gct ggc ctg acg ctg gcc ggt ctg ttt tcc gtg aac ggc tgg tac gga      1694
Ala Gly Leu Thr Leu Ala Gly Leu Phe Ser Val Asn Gly Trp Tyr Gly
        450                 455                 460
caa tgg ttc gcg cat ttt gat atc aag atc tcc tat acc tgg atc ggt      1742
Gln Trp Phe Ala His Phe Asp Ile Lys Ile Ser Tyr Thr Trp Ile Gly
    465                 470                 475
atc gcg ctc gcg atg gcc ttc acc agt att ccg ttt gtg gtg cgt acc      1790
Ile Ala Leu Ala Met Ala Phe Thr Ser Ile Pro Phe Val Val Arg Thr
480                 485                 490                 495
gtg cag ccg gtg ctg gaa gag ctg ggg cct gaa tat gag gaa gcg gct      1838
Val Gln Pro Val Leu Glu Glu Leu Gly Pro Glu Tyr Glu Glu Ala Ala
                500                 505                 510
caa acg ctg ggc gcc acg ccc tgg cag agc ttc cgc cgg gtc gtt ctg      1886
Gln Thr Leu Gly Ala Thr Pro Trp Gln Ser Phe Arg Arg Val Val Leu
            515                 520                 525
cct gaa gtg gca ccg gcc tta ctt gcg ggc acc gcg ctg tcg ttt acc      1934
Pro Glu Val Ala Pro Ala Leu Leu Ala Gly Thr Ala Leu Ser Phe Thr
        530                 535                 540
cgc agc ctg ggc gag ttt ggt gcg gta atc ttt att gcc ggc aac atc      1982
Arg Ser Leu Gly Glu Phe Gly Ala Val Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ile
    545                 550                 555
gct tgg aaa acc gaa gtg acc tcg ctg atg atc ttc gtg cgc ctg cag      2030
Ala Trp Lys Thr Glu Val Thr Ser Leu Met Ile Phe Val Arg Leu Gln
560                 565                 570                 575
gag ttt gac tat ccg gca gcc agc gcc att gcc tcg gtc att ctg gcg      2078
Glu Phe Asp Tyr Pro Ala Ala Ser Ala Ile Ala Ser Val Ile Leu Ala
                580                 585                 590
gca tca ctg ctg tta ctt ttc gct atc aat acc tta caa agc cgc ttt      2126
Ala Ser Leu Leu Leu Leu Phe Ala Ile Asn Thr Leu Gln Ser Arg Phe
            595                 600                 605
ggt cgt cgt ctg gga ggc cat ta atg gca gag att tcg caa ctc aat       2173
Gly Arg Arg Leu Gly Gly His    Met Ala Glu Ile Ser Gln Leu Asn
        610                    615                 620
```

```
cat gcc gac cgc cag cct gtt aac tgg gcc aag tgg ctg ctt att ggt      2221
His Ala Asp Arg Gln Pro Val Asn Trp Ala Lys Trp Leu Leu Ile Gly
        625                 630                 635
att ggt gcg ctg ata tcc ttg ctg ctg ctg gtc gtg ccg atg gtg tcc      2269
Ile Gly Ala Leu Ile Ser Leu Leu Leu Leu Val Val Pro Met Val Ser
    640                 645                 650
atc ttc tgg gag gcc ctg cat aaa gga ctg ggc gtc acc tta agt aat      2317
Ile Phe Trp Glu Ala Leu His Lys Gly Leu Gly Val Thr Leu Ser Asn
655                 660                 665                 670
ctg acc gac agc gac atg ctc cat gcc ata tgg ctc acg gtg ctg gtc      2365
Leu Thr Asp Ser Asp Met Leu His Ala Ile Trp Leu Thr Val Leu Val
                675                 680                 685
gca ttg att acc gtg ccg gtg aat tta gtg ttc ggc acg ctg ctg gcc      2413
Ala Leu Ile Thr Val Pro Val Asn Leu Val Phe Gly Thr Leu Leu Ala
            690                 695                 700
tgg ctg gtg aca cgc ttt acc ttt ccg gga cgt cag ctg ctt ttg acg      2461
Trp Leu Val Thr Arg Phe Thr Phe Pro Gly Arg Gln Leu Leu Leu Thr
        705                 710                 715
ctg ttc gat att ccc ttt gcg gta tcg cct gtg gtc gcc ggt ctg atg      2509
Leu Phe Asp Ile Pro Phe Ala Val Ser Pro Val Val Ala Gly Leu Met
    720                 725                 730
tat ctc ctg ttc tgg ggc att aac ggc ccg gcg ggc ggc tgg ctg gat      2557
Tyr Leu Leu Phe Trp Gly Ile Asn Gly Pro Ala Gly Gly Trp Leu Asp
735                 740                 745                 750
gcc cat aat att cag gtg atg ttc tcc tgg cct ggc atg gtg ctg gtc      2605
Ala His Asn Ile Gln Val Met Phe Ser Trp Pro Gly Met Val Leu Val
                755                 760                 765
acc gtc ttc gtt acc tgt ccg ttt gtg gtg cgc gaa ctg gtg ccg gtg      2653
Thr Val Phe Val Thr Cys Pro Phe Val Val Arg Glu Leu Val Pro Val
            770                 775                 780
atg ctg agc cag ggc agt cat gaa gat gaa gcc gcg gtg ctg tta ggt      2701
Met Leu Ser Gln Gly Ser His Glu Asp Glu Ala Ala Val Leu Leu Gly
        785                 790                 795
gcc tcg ggc tgg cag atg ttc cgt cgc gtg acg ctg ccg aat att cgc      2749
Ala Ser Gly Trp Gln Met Phe Arg Arg Val Thr Leu Pro Asn Ile Arg
    800                 805                 810
tgg gcc atg ctg tat ggc gtc gtg ctg acc aac gcc cgc gcg att ggt      2797
Trp Ala Met Leu Tyr Gly Val Val Leu Thr Asn Ala Arg Ala Ile Gly
815                 820                 825                 830
gag ttt ggc gcg gtt tcc gtg gtt tcg ggt tct att cgc ggt gaa acc      2845
Glu Phe Gly Ala Val Ser Val Val Ser Gly Ser Ile Arg Gly Glu Thr
                835                 840                 845
tac act tta ccg ctt cag gtt gaa tta ctg cat cag gat tac aac acg      2893
Tyr Thr Leu Pro Leu Gln Val Glu Leu Leu His Gln Asp Tyr Asn Thr
            850                 855                 860
gtg ggc gcc ttt act gcc gca gcc tta ctg acc gtg atg gca atc gtg      2941
Val Gly Ala Phe Thr Ala Ala Ala Leu Leu Thr Val Met Ala Ile Val
        865                 870                 875
acg ctg ttt ctg aaa agc att gtg caa tgg cgt tta gag caa cag cac      2989
Thr Leu Phe Leu Lys Ser Ile Val Gln Trp Arg Leu Glu Gln Gln His
    880                 885                 890
aaa cgc ctg caa ctg gag gac aat cat gag cat tgagattaac cagatcaaca    3042
Lys Arg Leu Gln Leu Glu Asp Asn His Glu His
895                 900                 905
aatcctttgg tcgcacagcg gtgctgaacg atatctcact ggatattcct tctggccaga    3102
tggtggcctt actggggccg tccggttccg gtaaaaccac gctgctgcgc atcattgctg    3162
gactggaaca tcagaacagc ggtcagattc gttttcacga ccacgatgtc agccgcctgc    3222
acgcccgcga tcgccaggtc ggatttgtct tccagcacta tgcgctgttc cgtcatatga    3282
cggtcttcga caatattgcc tttggcctga ccgtgctgcc gcgccgtgag cgtccgtcca    3342
gtgcggaaat taaaaaacgc gtcacgcgcc tgctggagat ggtgcagctt tcccatctgg    3402
```

```
cgaaccgttt cccggcccag ctttcgggag ggcagaagca gcgcgtcgcg ctggcaagag   3462
ccctggccgt ggaaccgcaa atcctgttgc tggatgagcc ctttggtgcg ctggacgctc   3522
aggtgcgtaa agagctgcgc cgttggttac gtcagctgca cgaagaattg aagttcacca   3582
gcgtgttcgt cacccacgat caggaagagg cgatggaagt ggccgatcgc gtggtggtga   3642
tgagccaggg cagcatcgaa caggtgggga cgccggatga agtctggcgc gatcccgcca   3702
cgcgcttcgt gctggaattc ctgggtgagg ttaaccgctt cgacggtgaa gtgcatggtt   3762
ctcagttcca tgtcggggcg caccactggc cgttaggcta tacctctgca catcagggcg   3822
cggtcgatct gttcctgcgc ccgtgggaaa tcgacgtttc gcgcagaagt agcctggaaa   3882
cgccgctgcc cgttcaggtc ttagaagtga gtcctcgtgg tcacttctgg cagctggtgg   3942
tgcagccaac gggatggcag agcgagccct tctcgctggt ctttgacggt gaacagaccg   4002
cgccgttgcg cggcgagcgc ctgttcgtgg ggctgcagca ggccagactg taccagggcg   4062
cgacaccgtt acgggcggtt gcctttgcac acagcgcctg ataggttgag tgaatgttaa   4122
acgcccggag gcgcttcccg cgatccgggc tttttaatgg caaggtttgt aacctgtaga   4182
cctgataaga cgcgcaagcg tcgcatcagg caacaccacg tatggataga gatcgtgagt   4242
acattagaac aaacaatagg caatacgcct ctggtgaagt tgcagcgaat ggggccggat   4302
aacggcagtg aagtgtggtt aaaactggaa ggcaataacc cggcaggttc ggtgaaagat   4362
cgtgcggcac tttcgatgat cgtcgaggcg gaaaagcgcg g                       4403
```

<210> 44
<211> 337
<212> PRT
<213> Pantoea ananatis

<400> 44

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

```
        275                 280                 285
Asn Pro Gln Leu Met Ala Gln Gln Lys Ala Arg Phe Pro Ala Thr Asn
    290                 295                 300
Leu Phe Arg Val Glu Asp Ile Phe Gly Gly Trp Asp Asn Val Met Lys
305                 310                 315                 320
Thr His Phe Ala Ser Gly Gly Glu Leu Asp Gln Leu Leu Ala Ala Gly
                325                 330                 335
Arg
```

<210> 45
<211> 277
<212> PRT
<213> Pantoea ananatis

<400> 45

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

<210> 46
<211> 291
<212> PRT
<213> Pantoea ananatis

<400> 46
Met Ala Glu Ile Ser Gln Leu Asn His Ala Asp Arg Gln Pro Val Asn
1 5 10 15
Trp Ala Lys Trp Leu Leu Ile Gly Ile Gly Ala Leu Ile Ser Leu Leu
20 25 30
Leu Leu Val Val Pro Met Val Ser Ile Phe Trp Glu Ala Leu His Lys
35 40 45
Gly Leu Gly Val Thr Leu Ser Asn Leu Thr Asp Ser Asp Met Leu His
50 55 60
Ala Ile Trp Leu Thr Val Leu Val Ala Leu Ile Thr Val Pro Val Asn
65 70 75 80
Leu Val Phe Gly Thr Leu Leu Ala Trp Leu Val Thr Arg Phe Thr Phe
85 90 95
Pro Gly Arg Gln Leu Leu Leu Thr Leu Phe Asp Ile Pro Phe Ala Val
100 105 110
Ser Pro Val Val Ala Gly Leu Met Tyr Leu Leu Phe Trp Gly Ile Asn
115 120 125
Gly Pro Ala Gly Gly Trp Leu Asp Ala His Asn Ile Gln Val Met Phe
130 135 140
Ser Trp Pro Gly Met Val Leu Val Thr Val Phe Val Thr Cys Pro Phe
145 150 155 160
Val Val Arg Glu Leu Val Pro Val Met Leu Ser Gln Gly Ser His Glu
165 170 175
Asp Glu Ala Ala Val Leu Leu Gly Ala Ser Gly Trp Gln Met Phe Arg
180 185 190
Arg Val Thr Leu Pro Asn Ile Arg Trp Ala Met Leu Tyr Gly Val Val
195 200 205
Leu Thr Asn Ala Arg Ala Ile Gly Glu Phe Gly Ala Val Ser Val Val
210 215 220
Ser Gly Ser Ile Arg Gly Glu Thr Tyr Thr Leu Pro Leu Gln Val Glu
225 230 235 240
Leu Leu His Gln Asp Tyr Asn Thr Val Gly Ala Phe Thr Ala Ala Ala
245 250 255
Leu Leu Thr Val Met Ala Ile Val Thr Leu Phe Leu Lys Ser Ile Val
260 265 270
Gln Trp Arg Leu Glu Gln Gln His Lys Arg Leu Gln Leu Glu Asp Asn
275 280 285
His Glu His
290

<210> 47
<211> 1403
<212> ADN
<213> Pantoea ananatis

<220>
<221> CDS
<222> (15)..(1103)

<400> 47
actggaggac aatc atg agc att gag att aac cag atc aac aaa tcc ttt 50
Met Ser Ile Glu Ile Asn Gln Ile Asn Lys Ser Phe
1 5 10
ggt cgc aca gcg gtg ctg aac gat atc tca ctg gat att cct tct ggc 98
Gly Arg Thr Ala Val Leu Asn Asp Ile Ser Leu Asp Ile Pro Ser Gly
15 20 25
cag atg gtg gcc tta ctg ggg ccg tcc ggt tcc ggt aaa acc acg ctg 146
Gln Met Val Ala Leu Leu Gly Pro Ser Gly Ser Gly Lys Thr Thr Leu
30 35 40

```
ctg cgc atc att gct gga ctg gaa cat cag aac agc ggt cag att cgt      194
Leu Arg Ile Ile Ala Gly Leu Glu His Gln Asn Ser Gly Gln Ile Arg
45                  50                  55                  60
ttt cac gac cac gat gtc agc cgc ctg cac gcc cgc gat cgc cag gtc      242
Phe His Asp His Asp Val Ser Arg Leu His Ala Arg Asp Arg Gln Val
                65                  70                  75
gga ttt gtc ttc cag cac tat gcg ctg ttc cgt cat atg acg gtc ttc      290
Gly Phe Val Phe Gln His Tyr Ala Leu Phe Arg His Met Thr Val Phe
            80                  85                  90
gac aat att gcc ttt ggc ctg acc gtg ctg ccg cgc cgt gag cgt ccg      338
Asp Asn Ile Ala Phe Gly Leu Thr Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Pro
        95                  100                 105
tcc agt gcg gaa att aaa aaa cgc gtc acg cgc ctg ctg gag atg gtg      386
Ser Ser Ala Glu Ile Lys Lys Arg Val Thr Arg Leu Leu Glu Met Val
    110                 115                 120
cag ctt tcc cat ctg gcg aac cgt ttc ccg gcc cag ctt tcg gga ggg      434
Gln Leu Ser His Leu Ala Asn Arg Phe Pro Ala Gln Leu Ser Gly Gly
125                 130                 135                 140
cag aag cag cgc gtc gcg ctg gca aga gcc ctg gcc gtg gaa ccg caa      482
Gln Lys Gln Arg Val Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala Val Glu Pro Gln
                145                 150                 155
atc ctg ttg ctg gat gag ccc ttt ggt gcg ctg gac gct cag gtg cgt      530
Ile Leu Leu Leu Asp Glu Pro Phe Gly Ala Leu Asp Ala Gln Val Arg
            160                 165                 170
aaa gag ctg cgc cgt tgg tta cgt cag ctg cac gaa gaa ttg aag ttc      578
Lys Glu Leu Arg Arg Trp Leu Arg Gln Leu His Glu Glu Leu Lys Phe
        175                 180                 185
acc agc gtg ttc gtc acc cac gat cag gaa gag gcg atg gaa gtg gcc      626
Thr Ser Val Phe Val Thr His Asp Gln Glu Glu Ala Met Glu Val Ala
    190                 195                 200
gat cgc gtg gtg gtg atg agc cag ggc agc atc gaa cag gtg ggg acg      674
Asp Arg Val Val Val Met Ser Gln Gly Ser Ile Glu Gln Val Gly Thr
205                 210                 215                 220
ccg gat gaa gtc tgg cgc gat ccc gcc acg cgc ttc gtg ctg gaa ttc      722
Pro Asp Glu Val Trp Arg Asp Pro Ala Thr Arg Phe Val Leu Glu Phe
                225                 230                 235
ctg ggt gag gtt aac cgc ttc gac ggt gaa gtg cat ggt tct cag ttc      770
Leu Gly Glu Val Asn Arg Phe Asp Gly Glu Val His Gly Ser Gln Phe
            240                 245                 250
cat gtc ggg gcg cac cac tgg ccg tta ggc tat acc tct gca cat cag      818
His Val Gly Ala His His Trp Pro Leu Gly Tyr Thr Ser Ala His Gln
        255                 260                 265
ggc gcg gtc gat ctg ttc ctg cgc ccg tgg gaa atc gac gtt tcg cgc      866
Gly Ala Val Asp Leu Phe Leu Arg Pro Trp Glu Ile Asp Val Ser Arg
    270                 275                 280
aga agt agc ctg gaa acg ccg ctg ccc gtt cag gtc tta gaa gtg agt      914
Arg Ser Ser Leu Glu Thr Pro Leu Pro Val Gln Val Leu Glu Val Ser
285                 290                 295                 300
cct cgt ggt cac ttc tgg cag ctg gtg gtg cag cca acg gga tgg cag      962
Pro Arg Gly His Phe Trp Gln Leu Val Val Gln Pro Thr Gly Trp Gln
                305                 310                 315
agc gag ccc ttc tcg ctg gtc ttt gac ggt gaa cag acc gcg ccg ttg     1010
Ser Glu Pro Phe Ser Leu Val Phe Asp Gly Glu Gln Thr Ala Pro Leu
            320                 325                 330
cgc ggc gag cgc ctg ttc gtg ggg ctg cag cag gcc aga ctg tac cag     1058
Arg Gly Glu Arg Leu Phe Val Gly Leu Gln Gln Ala Arg Leu Tyr Gln
        335                 340                 345
ggc gcg aca ccg tta cgg gcg gtt gcc ttt gca cac agc gcc tga         1103
Gly Ala Thr Pro Leu Arg Ala Val Ala Phe Ala His Ser Ala
    350                 355                 360

taggttgagt gaatgttaaa cgcccggagg cgcttcccgc gatccgggct ttttaatggc   1163
aaggtttgta acctgtagac ctgataagac gcgcaagcgt cgcatcaggc aacaccacgt   1223
atggatagag atcgtgagta cattagaaca aacaataggc aatacgcctc tggtgaagtt   1283
gcagcgaatg gggccggata acggcagtga agtgtggtta aaactggaag gcaataaccc   1343
ggcaggttcg gtgaaagatc gtgcggcact ttcgatgatc gtcgaggcgg aaaagcgcgg   1403
```

<210> 48
<211> 362
<212> PRT
<213> Pantoea ananatis

<400> 48
Met Ser Ile Glu Ile Asn Gln Ile Asn Lys Ser Phe Gly Arg Thr Ala
1 5 10 15
Val Leu Asn Asp Ile Ser Leu Asp Ile Pro Ser Gly Gln Met Val Ala
20 25 30
Leu Leu Gly Pro Ser Gly Ser Gly Lys Thr Thr Leu Leu Arg Ile Ile
35 40 45
Ala Gly Leu Glu His Gln Asn Ser Gly Gln Ile Arg Phe His Asp His
50 55 60
Asp Val Ser Arg Leu His Ala Arg Asp Arg Gln Val Gly Phe Val Phe
65 70 75 80
Gln His Tyr Ala Leu Phe Arg His Met Thr Val Phe Asp Asn Ile Ala
85 90 95
Phe Gly Leu Thr Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Pro Ser Ser Ala Glu
100 105 110
Ile Lys Lys Arg Val Thr Arg Leu Leu Glu Met Val Gln Leu Ser His
115 120 125
Leu Ala Asn Arg Phe Pro Ala Gln Leu Ser Gly Gly Gln Lys Gln Arg
130 135 140
Val Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ala Val Glu Pro Gln Ile Leu Leu Leu
145 150 155 160
Asp Glu Pro Phe Gly Ala Leu Asp Ala Gln Val Arg Lys Glu Leu Arg
165 170 175
Arg Trp Leu Arg Gln Leu His Glu Glu Leu Lys Phe Thr Ser Val Phe
180 185 190
Val Thr His Asp Gln Glu Glu Ala Met Glu Val Ala Asp Arg Val Val
195 200 205
Val Met Ser Gln Gly Ser Ile Glu Gln Val Gly Thr Pro Asp Glu Val
210 215 220
Trp Arg Asp Pro Ala Thr Arg Phe Val Leu Glu Phe Leu Gly Glu Val
225 230 235 240
Asn Arg Phe Asp Gly Glu Val His Gly Ser Gln Phe His Val Gly Ala
245 250 255
His His Trp Pro Leu Gly Tyr Thr Ser Ala His Gln Gly Ala Val Asp
260 265 270
Leu Phe Leu Arg Pro Trp Glu Ile Asp Val Ser Arg Arg Ser Ser Leu
275 280 285
Glu Thr Pro Leu Pro Val Gln Val Leu Glu Val Ser Pro Arg Gly His
290 295 300
Phe Trp Gln Leu Val Val Gln Pro Thr Gly Trp Gln Ser Glu Pro Phe
305 310 315 320
Ser Leu Val Phe Asp Gly Glu Gln Thr Ala Pro Leu Arg Gly Glu Arg
325 330 335
Leu Phe Val Gly Leu Gln Gln Ala Arg Leu Tyr Gln Gly Ala Thr Pro
340 345 350
Leu Arg Ala Val Ala Phe Ala His Ser Ala
355 360

<210> 49
<211> 1779
<212> ADN
<213> Pantoea ananatis

<220>
<221> CDS
<222> (301)..(1536)

<400> 49

```
gtcaaaaccc tcaaaaaata aagcaccggg cgcacaacag ggcgcccgct ttttttgatt      60
taaaaaaact tttctcacca ggctgaaatt tggtgactta tgtcacataa ccgtcatcgg     120
cagcgggttc gttcttctcg atgcggccaa cccacgattt tgtctggcaa agtacgtcct     180
ctgagccctg ccatgctggc ggtcaggcaa tcgtttgtat tgccgcaggc gatttttttg     240
atattttgac agacggctga ctgcgttcag tcctcgttga attctgaata gggttgggaa     300
atg gca aag gta tca ctg gaa aaa gac aaa att aag ttc ctg ctg gtg       348
Met Ala Lys Val Ser Leu Glu Lys Asp Lys Ile Lys Phe Leu Leu Val
1               5                   10                  15
gaa ggt gtc cat cag agc gcg ctg gaa aat ctt cgt gct gca ggt tac       396
Glu Gly Val His Gln Ser Ala Leu Glu Asn Leu Arg Ala Ala Gly Tyr
            20                  25                  30
acc aat att gaa ttc cac aaa ggc gca ctg gat gcc gag gcg tta aaa       444
Thr Asn Ile Glu Phe His Lys Gly Ala Leu Asp Ala Glu Ala Leu Lys
        35                  40                  45
gct tcc gct cgc gat gcg cat ttt atc ggt atc cgt tcc cgt tcc caa       492
Ala Ser Ala Arg Asp Ala His Phe Ile Gly Ile Arg Ser Arg Ser Gln
    50                  55                  60
ctg acc gaa gag att ttt gcc gct gca gaa aaa ctg gta gcg gtg ggc       540
Leu Thr Glu Glu Ile Phe Ala Ala Ala Glu Lys Leu Val Ala Val Gly
65                  70                  75                  80
tgt ttc tgt atc gga acg aat cag gtt gat tta aat gcc gca gcg aaa       588
Cys Phe Cys Ile Gly Thr Asn Gln Val Asp Leu Asn Ala Ala Ala Lys
                85                  90                  95
cgc ggt atc ccg gtt ttt aac gca cct ttc tca aat acg cgc tct gtg       636
Arg Gly Ile Pro Val Phe Asn Ala Pro Phe Ser Asn Thr Arg Ser Val
            100                 105                 110
gcc gag ctg gtt att ggc gag atg ctg ctg atg ctg cgc ggt gtt ccg       684
Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Met Leu Leu Met Leu Arg Gly Val Pro
        115                 120                 125
gaa gcg aat gcc aaa gcg cac cgt ggt atc tgg aat aaa atc gcc aaa       732
Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Ile Trp Asn Lys Ile Ala Lys
    130                 135                 140
ggc tct ttt gaa gcg cgc ggt aaa aag ctg ggt atc att ggc tat ggc       780
Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
145                 150                 155                 160
cat atc ggt atg caa ctg ggc gtg ctg gca gaa agt ctg ggc atg cac       828
His Ile Gly Met Gln Leu Gly Val Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met His
                165                 170                 175
gtt tac ttc tat gac atc gaa aac aag ctg ccg ttg ggc aac gca tca       876
Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Ser
            180                 185                 190
cag gtt cgt agc ctg acg cag ttg cta aat atg agt gac gtt gtc agc       924
Gln Val Arg Ser Leu Thr Gln Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
        195                 200                 205
ctg cat gtc ccg gaa acc gcc tct acg caa aat atg att tct gcc aat       972
Leu His Val Pro Glu Thr Ala Ser Thr Gln Asn Met Ile Ser Ala Asn
    210                 215                 220
gag ctg gct cag atg aag cct ggc ggc ctg ctg ata aat gcc tca cgc      1020
Glu Leu Ala Gln Met Lys Pro Gly Gly Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
```

```
225                 230                 235                 240
ggc acc gtg gta gat att cct gct ttg tgc gaa gcg ctg gcc agc aag     1068
Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Glu Ala Leu Ala Ser Lys
                245                 250                 255
cag gtt ggt ggc gct gcg att gat gtg ttc cct gta gag ccg gcg acc     1116
Gln Val Gly Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Val Glu Pro Ala Thr
            260                 265                 270
aac agc gat ccg ttt gtt tcc cca ctg agc gaa ttc gac aac gtt atc     1164
Asn Ser Asp Pro Phe Val Ser Pro Leu Ser Glu Phe Asp Asn Val Ile
        275                 280                 285
ctg acg ccg cac atc ggg gga tcg acg gaa gaa gct cag gag aat atc     1212
Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Glu Glu Ala Gln Glu Asn Ile
    290                 295                 300
ggg att gaa gtc gcg ggc aag ctg gcg aaa tat tcg gat aac ggt tca     1260
Gly Ile Glu Val Ala Gly Lys Leu Ala Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
305                 310                 315                 320
acg ctg tcc gcc gtc aat ttc ccg gaa gtg tca ttg ccg atg cac ggc     1308
Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Met His Gly
                325                 330                 335
att agc gcc agt cgt ctg ctg cat att cac gaa aac cgt ccg ggc gtt     1356
Ile Ser Ala Ser Arg Leu Leu His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val
            340                 345                 350
ctc acc gcg atc aac cag att ttc gct gaa caa ggc atc aac att gcc     1404
Leu Thr Ala Ile Asn Gln Ile Phe Ala Glu Gln Gly Ile Asn Ile Ala
        355                 360                 365
gct cag tac ctg caa acc tct ccg atg atg ggt tat gtg gtc atc gac     1452
Ala Gln Tyr Leu Gln Thr Ser Pro Met Met Gly Tyr Val Val Ile Asp
    370                 375                 380
att gat gct gag cac gaa ctg gca gag aaa gct ctg caa ctg atg aag     1500
Ile Asp Ala Glu His Glu Leu Ala Glu Lys Ala Leu Gln Leu Met Lys
385                 390                 395                 400
gcg att ccg gga acg att cgc gcc cgc ctg ctt tac tgatcccacg          1546
Ala Ile Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
                405                 410
ctgtcaccta cccgggcaca caagcatgcc cgggtttatt catcccatag ccacagtttt   1606
gatggcgtca gcacggccgg caaaggaatg tcccacgccg ctgtaggcag cgcgtcaacc   1666
cgctgacagt catgagcgat gcccaccggt aaaaacccat gctgtttcca gttctgtaag   1726
gtgcgatcgt agaagccgcc ccccattcct aaacgctgtc cggcgcgatc gaa          1779
```

<210> 50
<211> 412
<212> PRT
<213> Pantoea ananatis

<400> 50

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

```
Ala Glu Leu Val Ile Gly Glu Met Leu Leu Met Leu Arg Gly Val Pro
        115                 120                 125
Glu Ala Asn Ala Lys Ala His Arg Gly Ile Trp Asn Lys Ile Ala Lys
    130                 135                 140
Gly Ser Phe Glu Ala Arg Gly Lys Lys Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly
145                 150                 155                 160
His Ile Gly Met Gln Leu Gly Val Leu Ala Glu Ser Leu Gly Met His
                165                 170                 175
Val Tyr Phe Tyr Asp Ile Glu Asn Lys Leu Pro Leu Gly Asn Ala Ser
            180                 185                 190
Gln Val Arg Ser Leu Thr Gln Leu Leu Asn Met Ser Asp Val Val Ser
        195                 200                 205
Leu His Val Pro Glu Thr Ala Ser Thr Gln Asn Met Ile Ser Ala Asn
    210                 215                 220
Glu Leu Ala Gln Met Lys Pro Gly Gly Leu Leu Ile Asn Ala Ser Arg
225                 230                 235                 240
Gly Thr Val Val Asp Ile Pro Ala Leu Cys Glu Ala Leu Ala Ser Lys
                245                 250                 255
Gln Val Gly Gly Ala Ala Ile Asp Val Phe Pro Val Glu Pro Ala Thr
            260                 265                 270
Asn Ser Asp Pro Phe Val Ser Pro Leu Ser Glu Phe Asp Asn Val Ile
        275                 280                 285
Leu Thr Pro His Ile Gly Gly Ser Thr Glu Glu Ala Gln Glu Asn Ile
    290                 295                 300
Gly Ile Glu Val Ala Gly Lys Leu Ala Lys Tyr Ser Asp Asn Gly Ser
305                 310                 315                 320
Thr Leu Ser Ala Val Asn Phe Pro Glu Val Ser Leu Pro Met His Gly
                325                 330                 335
Ile Ser Ala Ser Arg Leu Leu His Ile His Glu Asn Arg Pro Gly Val
            340                 345                 350
Leu Thr Ala Ile Asn Gln Ile Phe Ala Glu Gln Gly Ile Asn Ile Ala
        355                 360                 365
Ala Gln Tyr Leu Gln Thr Ser Pro Met Met Gly Tyr Val Val Ile Asp
    370                 375                 380
Ile Asp Ala Glu His Glu Leu Ala Glu Lys Ala Leu Gln Leu Met Lys
385                 390                 395                 400
Ala Ile Pro Gly Thr Ile Arg Ala Arg Leu Leu Tyr
                405                 410
```

<210> 51
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P11

<400> 51
agctgagtcg acccccagga aaaattggtt aataac 36

<210> 52
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P12

<400> 52
agctgagcat gcttccaact gcgctaatga cgc 33

<210> 53
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P13

<400> 53
agctgatcta gaaaacagaa tttgcctggc ggc 33

<210> 54
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P14

<400> 54
agctgaggat ccaggaagag tttgtagaaa cgc 33

<210> 55
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P15

<400> 55
agctgagtcg acgtgttcgc tgaatacggg gt 32

<210> 56
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P16

<400> 56
agctgatcta gagaaagcat caggattgca gc 32

<210> 57
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P17

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(25)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(28)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (46)..(46)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (49)..(49)
<223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)..(51)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 57
atcgtgaaga tcttttccag tgttnannag ggtgccttgc acggtnatna ngtcactgg 59

<210> 58
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P18

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(20)
<223> n es a, c, g, o t

<400> 58
tggaaaagat cttcannnnn cgctgacctg cg 32

<210> 59
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P19

<400> 59
tccgctcacg atttttttca tcgctggtaa ggtcatttat cccccaggaa aaattggtta 60

<210> 60
<211> 63
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P20

<400> 60
tttcacaccg ctcaaccgca gggcataacc ggcccttgaa gcctgctttt ttatactaag 60
ttg 63

<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P21

<400> 61
ctttgtccct ttagtgaagg 20

<210> 62
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P22

<400> 62
agctgatcta gaagctgact cgagttaatg gcctcccaga cgac 44

<210> 63
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P23

<400> 63
agctgagtcg acatggcaaa ggtatcactg gaa 33

<210> 64
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P24

<400> 64
gagaacgccc gggcgggctt cgtgaatatg cagc 34

<210> 65
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P25

<400> 65
agctgatcta gacgtgggat cagtaaagca gg 32

<210> 66
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador P26

<400> 66
aaaaccgccc gggcgttctc ac 22

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un L-aminoácido que comprende cultivar una bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y presenta una capacidad de producir L-aminoácido en un medio para producir y acumular el L-aminoácido en el cultivo, y recoger el L-aminoácido del cultivo, en el que la bacteria presenta de manera inherente una actividad de una glucosa deshidrogenasa que utiliza pirroloquinolina quinona como una coenzima, pero la bacteria ha sido modificada de manera que se reduce la actividad de la glucosa deshidrogenasa (GCD) inactivando un gen *gcd* que codifica la glucosa deshidrogenasa.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el gen *gcd* es un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o una variante del mismo.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el L-aminoácido se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido L-glutámico, L-lisina, L-treonina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano y L-cisteína.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el L-aminoácido es el ácido L-glutámico o la L-cisteína.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el L-aminoácido es el ácido L-glutámico, y la actividad o las actividades de uno o más tipos de enzimas seleccionados de entre el grupo que consiste en citrato sintasa, metilcitrato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa y glutamato deshidrogenasa son aumentadas en la bacteria.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el L-aminoácido es la L-cisteína, y la actividad o las actividades de uno o más seleccionados de entre el grupo que consiste en 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, serina acetiltransferasa y sistema de transporte de sulfato/tiosulfato son aumentadas, y/o la expresión de un gen *yeaS* es aumentada.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la bacteria es una bacteria que pertenece a un género seleccionado de entre los géneros *Pantoea, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Providencia, Salmonella, Serratia, Morganella* y *Yersinia*.

Fig. 1

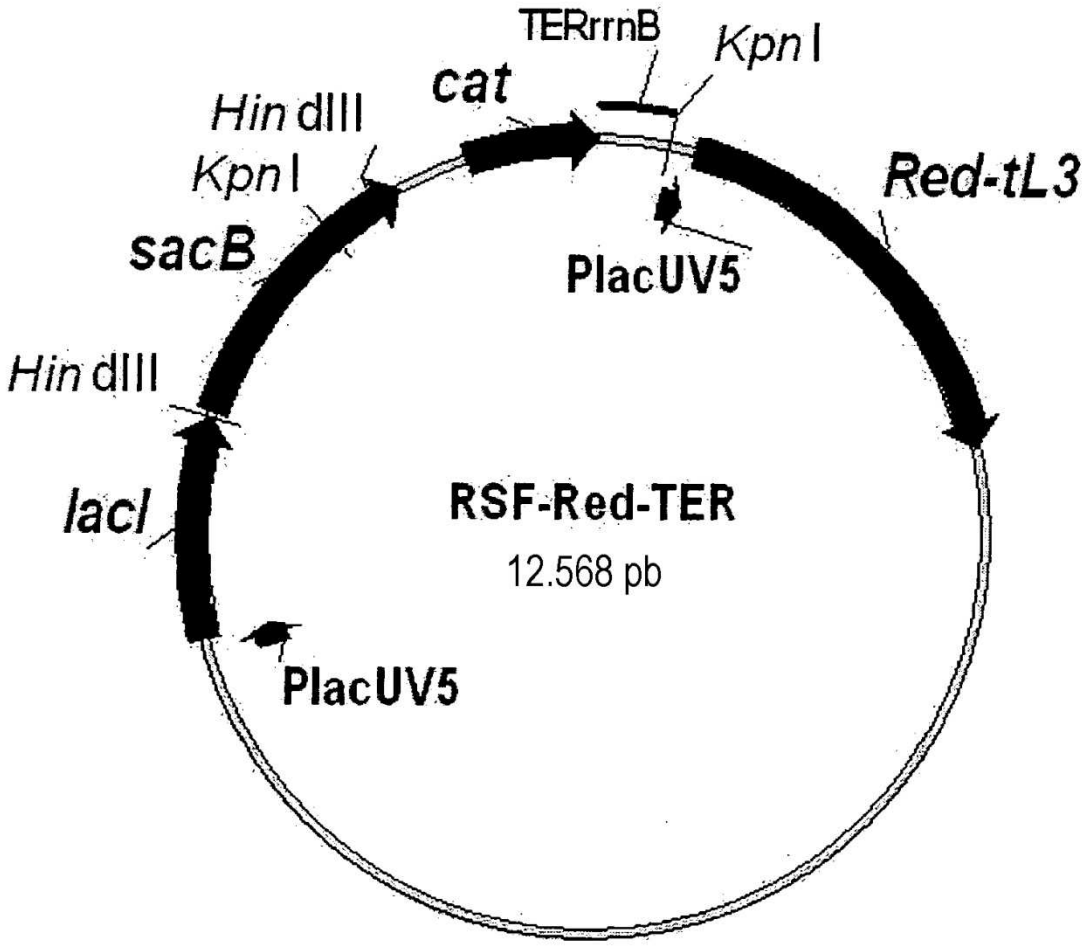
TERrrnB
Kpn I
cat
Hin dIII
Kpn I
Red-tL3
sacB
PlacUV5
Hin dIII
lacI
RSF-Red-TER
12.568 pb
PlacUV5

Fig. 2

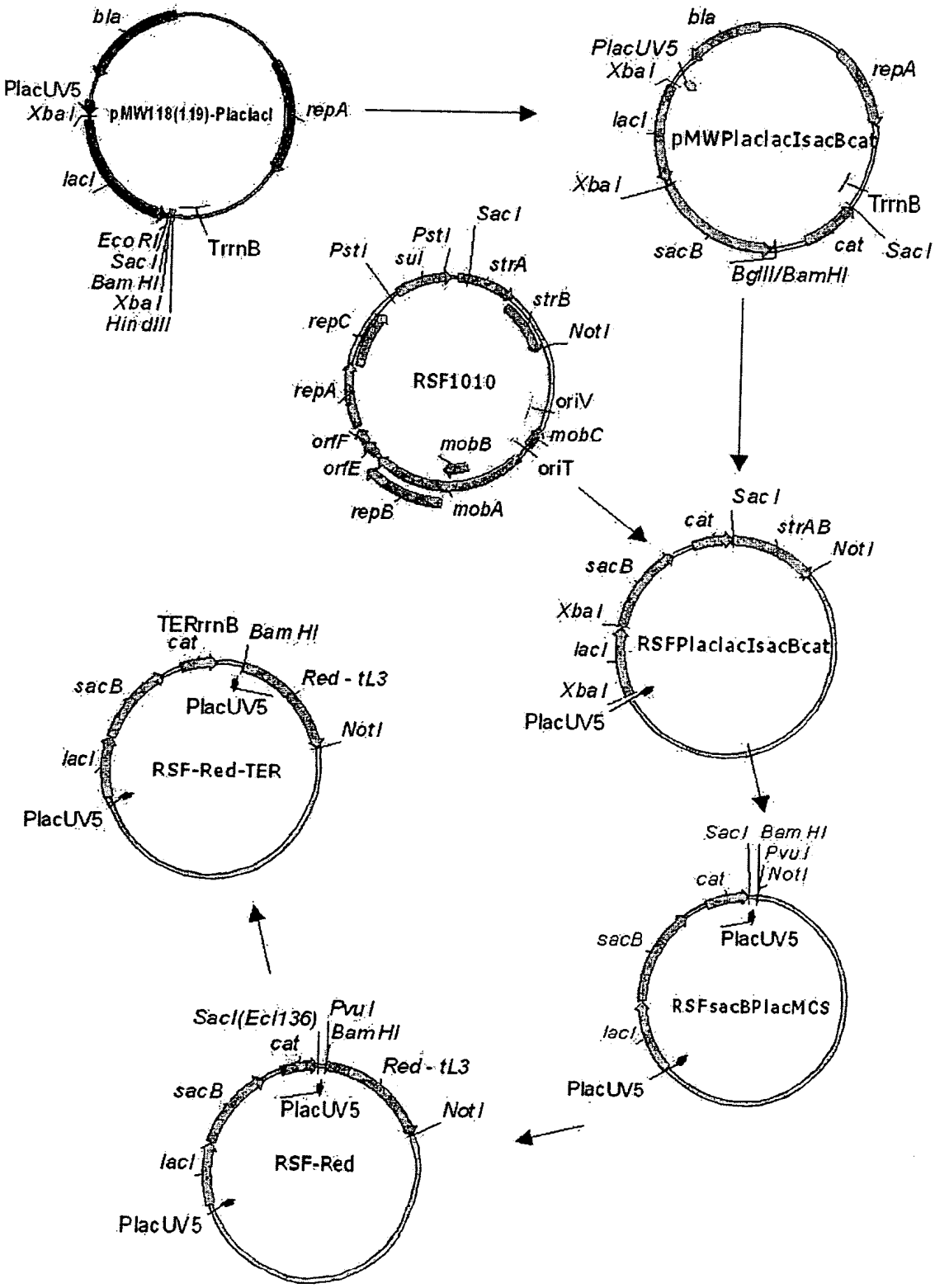
bla
PlacUV5
XbaI
pMW118(119)-PlacIacI
repA
lacI
EcoRI
SacI
BamHI
XbaI
HindIII
TrrnB
bla
PlacUV5
XbaI
repA
lacI
pMWPlacIacIsacBcat
XbaI
TrrnB
sacB
cat
SacI
BglII/BamHI
SacI
PstI
PstI
sul
strA
strB
repC
NotI
repA
RSF1010
oriV
orfF
mobB
mobC
orfE
oriT
repB
mobA
SacI
cat
strAB
NotI
sacB
XbaI
lacI
RSFPlacIacIsacBcat
XbaI
PlacUV5
TERrrnB
cat
BamHI
sacB
Red - tL3
PlacUV5
NotI
lacI
RSF-Red-TER
PlacUV5
SacI
BamHI
PvuI
NotI
cat
sacB
PlacUV5
RSFsacBPlacMCS
lacI
PlacUV5
SacI(Ecl136)
PvuI
BamHI
cat
Red - tL3
sacB
PlacUV5
NotI
lacI
RSF-Red
PlacUV5

Fig. 3

Secuencia del promotor Pnlp nativo

-35(Pnlp2) -10(Pnlp2)

aaaacgtgaggaaatacctggattttcc**tggtta**ttttgccgcaggtcagcg**tatcgt**g

-35(Pnlp1) -10(Pnlp1) inicio de transcrip.

aagatcttttccagtg**ttcagt**agggtgccttgcacggt**aattatg**tcactggttattaa

M S

ccaatttttcctgggggataa**atg**agc