

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 312**

51 Int. Cl.:

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12P 13/04 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2010 PCT/KR2010/000872**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO10093182**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2010 E 10715651 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2239336**

54 Título: **Microorganismo para producir L-aminoácidos y método para producir L-aminoácidos utilizando el mismo**

30 Prioridad:

13.02.2009 KR 20090012048

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2017

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu
Seoul 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**JU, JAE YEONG;
LEE, KWANG HO;
BAE, HYUN AE;
KIM, HYO JIN;
LEE, KEUN CHUL;
HWANG, YOUNG BIN;
CHO, KYU SOO;
PARK, HYE MIN y
KIM, HYUN AH**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 635 312 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Microorganismo para producir L-aminoácidos y método para producir L-aminoácidos utilizando el mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un microorganismo transformado que produce un L-aminoácido con un alto rendimiento utilizando sacarosa como fuente de carbono principal, y a un método para producir un L-aminoácido utilizando dicho microorganismo.

10

Técnica antecedente

Debido a la creciente demanda de producción de biocombustible y a las pérdidas de cultivo causadas por un clima inusual, el precio del azúcar de almidón utilizado como materia prima de la fermentación, ha aumentado rápidamente. Como alternativa, el uso de sacarosa o de melazas que contienen una alta concentración de sacarosa, más baratas que el azúcar de almidón, como fuente de carbono en la fermentación industrial, es ventajoso para asegurar costes competitivos. Aproximadamente el 50 % de la *E. coli* aislada de la naturaleza puede metabolizar sacarosa, pero la cepa K12, la cepa B y la cepa de C de *E. coli* normalmente utilizadas en la fermentación industrial, no tienen la capacidad de asimilar sacarosa. (*Mol. Microbiol.* (1998) 2: 1-8, *Can. J. Microbiol.* (1999) 45: 418-422). Por lo tanto, entre los desafíos más importantes en la industria de la fermentación se encuentra la investigación de genes implicados en la asimilación de sacarosa, el establecimiento de genes relacionados con una asimilación de sacarosa potenciada mediante mejoras y la aplicación de los genes en las cepas de *E. coli* industriales, que no asimilan sacarosa, para la producción de metabolitos deseados.

Para impartir la capacidad de asimilar sacarosa a las cepas de *E. coli* industriales, generalmente se han utilizado métodos de introducción de un gen o un grupo de genes de asimilación de sacarosa procedentes de microorganismos que tienen una capacidad de asimilar sacarosa. Por ejemplo, se conoce bien en la técnica un método para impartir capacidad de asimilar sacarosa a *E. coli* K12 mediante transformación con el regulón *scr* presente en las especies de *Salmonella* que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (*J. Bacteriol.* (1982) 151: 68-76, *Mol. Microbiol.* (1998) 2: 1-8, *J. Microbiol.* (1991) 173: 7464-7470, Patente de Estados Unidos N.º 7.179.623), *Klebsiella pneumoniae* (*J. Gen. Microbiol.* (1988) 134: 1635-1644), *Erwinia amylovora* (*J. Bacteriol.* (2000) 182: 5351-5358). También se conoce la introducción del regulón *csc* procedente de *E. coli* de una cepa distinta a K12 que tiene la capacidad de asimilar sacarosa o de *E. coli* patógena (*Appl. Environ. Microbiol.* (1992) 58: 2081-2088, Patente de Estados Unidos N.º 6.960.455), la introducción de un gen de asimilación de sacarosa que está presente en el plásmido conjugativo *scr53* aislado de *E. coli* AB1281 (Patente de Estados Unidos N.º 4.806.480), y la introducción del regulón *scr* y del operón *sac* procedente de microorganismos gram positivos, *Streptococcus mutants* (*J. Bacteriol.* (1989) 171: 263-271) y *Bacillus subtilis* (*J. Bacteriol.* (1989) 171: 1519-1523).

Convencionalmente, a través de métodos de fermentación se han producido industrialmente L-aminoácidos utilizando cepas de microorganismos aisladas de la naturaleza o mutantes artificiales de dichas cepas bacterianas, que se han modificado de tal forma que se potencia el rendimiento de la producción de L-aminoácidos. Se han notificado muchas técnicas para potenciar los rendimientos de la producción de L-aminoácidos. Por ejemplo, las técnicas para potenciar los rendimientos de producción incluyen el aumento de las actividades de enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos o desensibilización de las enzimas diana de la inhibición por retroalimentación por el L-aminoácido resultante. Sin embargo, los rendimientos de producción de aminoácidos de las cepas productoras de L-aminoácidos pueden mejorarse aumentando la actividad de excreción de L-aminoácidos. Por ejemplo, se han utilizado bacterias que pertenecen al género *Corynebacterium* en el que está aumentada la expresión de un gen de secreción de L-lisina. Además, la expresión de genes que codifican las proteínas de salida que actúan potenciando la secreción de L-cisteína, L-cistina, N-acetilserina o derivados de tiazolidina está regulada para aumentar la actividad de producción de L-aminoácidos.

El sistema de utilización de sacarosa está dividido principalmente en el sistema Scr-PTS y el sistema PTS no Scr. La mayoría de los microorganismos capaces de utilizar sacarosa tienen el sistema Scr-PTS (sacarosa fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato). El sistema Scr-PTS permite una captación eficaz de un bajo nivel de sacarosa, pero el proceso de captación de sacarosa requiere el consumo de PEP (fosfoenolpiruvato) para reducir la reserva intracelular de PEP. El sistema PTS no Scr es un sistema que utiliza sacarosa permeasa del tipo de simporte de protones, ejemplificado por los agrupamientos de genes *csc* bien conocidos que contienen *cscB* que codifica sacarosa permeasa. El regulón *csc* consiste en *cscB* (sacarosa permeasa o sacarosa permeasa del tipo de simporte de protones), *cscK* (fructoquinasa), *cscA* (sacarosa hidrolasa) y *cscR* (regulador transcripcional de sacarosa) y está controlado negativamente por dos operones, *cscKB* y *cscR* (Jahreis K *et al.*, *J. Bacteriol.* (2002) 184:5307-5316).

PEP es un metabolito clave en la ruta metabólica central y funciona como donador de fosfato del sistema PTS de azúcar. PEP también está implicado en la síntesis de ATP catalizada por la piruvato quinasa y funciona como un precursor directo de varios aminoácidos u oxaloacetato (OAA) (*Metab. Eng.* (2002) 4: 124-137, *Microb. Cell Fact.* (2005) 4: 14). En particular, el OAA se utiliza como esqueleto de carbono de aminoácidos tales como treonina, isoleucina, metionina, lisina, asparagina y ácido aspártico (Patente de Estados Unidos N.º 6.960.455). Se sabe que

PEP se consume principalmente a través del sistema PTS de azúcar. Hasta el 50 % del PEP total se consume a través del sistema PTS de glucosa en un medio mínimo que contiene glucosa como fuente de carbono (*Microb. Cell Fact.* (2005) 4: 14). Por lo tanto, si se utiliza un sistema no PTS de azúcar en lugar del sistema PTS de azúcar, la reserva de PEP intracelular puede aumentarse, y el PEP aumentado puede utilizarse para la biosíntesis de productos de fermentación, mejorando de esta manera la productividad y el rendimiento.

En la utilización de sacarosa, el sistema PTS no Scr, que no requiere el consumo de PEP tras la captación de sacarosa, también es más preferido que el sistema Scr-PTS. Prácticamente, Ajinomoto Co. ha introducido métodos para obtener treonina, isoleucina y triptófano utilizando *E. coli* transformada con *cscBKA* procedente de EC3132 (Patente de Estados Unidos N.º 6.960.455). DuPont también ha producido tirosina utilizando *E. coli* K12 transformada con *cscBKAR* procedente de ATCC13281 de *E. coli* y sacarosa (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2007) 74: 1031-1040).

Sin embargo, la manoquinasa (Mak) tiene una actividad quinasa que convierte las hexosas, incluyendo la manosa y la fructosa, en 6-fosfoéster a través del consumo de ATP. En particular, un gen (*mak* o *yajF*) que codifica la Mak de tipo silvestre (Mak-o) de bacterias entéricas se conoce como un gen críptico, y su actividad está aumentada en gran medida por la mutación de la secuencia en la región -35 del promotor de *mak* (Mak+) (Kornberg HL, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (2001) 3: 355-359; Miller BG & Raines RT, Biochemistry (2005) 44: 10776-10783). Mak también puede fosforilar otros sustratos tales como glucosa, sorbosa y glucosamina, además de manosa y fructosa. Sin embargo, no hay informes de que Mak afecta al metabolismo de la sacarosa.

Divulgación

Problema técnico

Para desarrollar microorganismos capaces de utilizar sacarosa con alta eficacia, los presentes inventores investigaron genes que se esperaba que estuvieran implicados en el metabolismo de la sacarosa, y descubrieron que la manoquinasa jugaba un papel importante en el metabolismo de la sacarosa, es decir, aun cuando *E. coli* tenga inactivada la manoquinasa, se introduzca con el regulón *csc* intacto, su tasa de utilización de sacarosa está reducida en comparación con la *E. coli* de tipo silvestre, completando de esta manera la presente invención.

Solución técnica

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tenga mejorada la productividad de L-aminoácidos y la capacidad de asimilar sacarosa, que se prepara impartiendo las actividades de la sacarosa permeasa, la sacarosa hidrolasa y el regulador transcripcional de sacarosa a un microorganismo no asimilativo de sacarosa y aumentando la actividad manoquinasa.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir un L-aminoácido utilizando el microorganismo que pertenece al género *Escherichia*.

Efectos ventajosos

Cuando el microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, que tiene mejorada la productividad de L-aminoácidos y la capacidad de asimilar sacarosa de acuerdo con la presente invención, se utiliza para la producción de L-aminoácidos, la sacarosa puede utilizarse como fuente de carbono principal en lugar del azúcar de almidón normalmente utilizado en la fermentación industrial, haciendo frente de esta manera al rápido aumento en los precios globales del grano además de producir L-aminoácidos con alto rendimiento.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra el regulón *scr*, en el que p representa promotores, Ko1 y Yo2o3 representan operadores y t representa terminadores; y

La FIG. 2 muestra la construcción del plásmido recombinante pAcscBAR'-mak que contiene *cscBAR'*-mak.

Mejor modo

En un aspecto, para conseguir los objetivos anteriores, la presente invención se refiere a un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tiene mejoradas la productividad de L-aminoácidos y la capacidad de asimilar sacarosa, que se prepara impartiendo las actividades de la sacarosa permeasa (*cscB*), la sacarosa hidrolasa (*cscA*) y el regulador transcripcional de sacarosa (*cscR*) a un microorganismo que no asimila sacarosa y aumentando la actividad manoquinasa.

En la presente invención, la sacarosa permeasa es un péptido que tiene la actividad de importar sacarosa extracelular, la sacarosa hidrolasa tiene la actividad de hidrolizar sacarosa para dar glucosa y fructosa y el regulador

transcripcional de sacarosa tiene la actividad de regular la transcripción de genes que codifican la sacarosa permeasa y la sacarosa hidrolasa. Las actividades de la sacarosa permeasa, la sacarosa hidrolasa y el regulador transcripcional de sacarosa están presentes en microorganismos que tienen la capacidad de asimilar sacarosa, pero no están presentes en microorganismos pertenecientes al género *Escherichia*, en particular, cepas industriales tales como la cepa K12, la cepa C y la cepa C de *E. coli*.

Los métodos para impartir las actividades de la sacarosa permeasa, la sacarosa hidrolasa y el regulador transcripcional de sacarosa, a *Escherichia* que no asimila sacarosa, pueden realizarse por una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el método es introducir en un vector los genes que codifican la sacarosa permeasa, la sacarosa hidrolasa y el regulador transcripcional de sacarosa y transformar la *Escherichia* que no asimila sacarosa que tiene productividad de L-aminoácidos con el vector recombinante. El gen que codifica la sacarosa permeasa, el gen que codifica la sacarosa hidrolasa y el gen que codifica el regulador transcripcional de sacarosa pueden proceder de un microorganismo que tiene una capacidad de asimilar sacarosa, preferentemente el género *Escherichia* que tiene una capacidad de asimilar sacarosa, y más preferentemente *E. coli* que tiene una capacidad de asimilar sacarosa. Los ejemplos de *E. coli* que tienen una capacidad de asimilar sacarosa incluyen *E. coli* ATCC9637 (Alterthum F. & Ingram LO, *Appl. Environ. Microbiol.* (1989) 55: 1943-1948) o similares. El gen (*cscB*) que codifica la sacarosa permeasa, el gen (*cscA*) que codifica la sacarosa hidrolasa y el gen (*cscR*) que codifica el regulador transcripcional de sacarosa que se obtienen de *E. coli* ATCC9637 se representa por las SEQ ID NO: 4, 6, y 7, respectivamente.

En una realización específica, los presentes inventores pueden introducir, en un vector, un gen *cscBAR* que codifica la sacarosa permeasa, la sacarosa hidrolasa y el regulador transcripcional de sacarosa, que incluye los genes *cscB*, *cscA* y *cscR* de las SEQ ID NO: 4, 6, y 7 procedentes del regulón *csc* y después transformar la *Escherichia* que no asimila sacarosa que tiene productividad de L-aminoácidos con el vector recombinante.

En la presente invención, manoquinasa se refiere a un péptido que tiene una actividad de convertir hexosa tal como manosa en 6-fosfo-éster utilizando ATP. La presente invención se caracteriza por que la *Escherichia* que no asimila sacarosa tiene la actividad manoquinasa potenciada (o aumentada) en comparación con la actividad intrínseca de la manoquinasa. La "actividad intrínseca" significa una actividad de la *Escherichia* que no asimila sacarosa, que no está modificada por ninguna manipulación o alteración genética. Además, "potenciado" o "aumentado" significa una mejora en la actividad intrínseca de la *Escherichia* que no asimila sacarosa.

El método para potenciar (o aumentar) la actividad manoquinasa puede realizarse por una diversidad de métodos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos del método incluyen, pero sin limitación, un método para aumentar el número de copias de la secuencia de bases que codifica la manoquinasa insertando adicionalmente en un cromosoma un polinucleótido que contiene una secuencia de bases que codifica la manoquinasa, o introduciendo el polinucleótido en un sistema de vector, un método de reemplazo con un promotor fuerte, un método de introducción de mutaciones en el promotor y un método de mutación génica. En una realización específica, para potenciar la actividad manoquinasa del microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tiene productividad de aminoácidos, el gen que codifica la manoquinasa se introduce en un vector para transformar el microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, aumentando de esta manera el número de copias del gen.

El gen que codifica la manoquinasa es cualquier gen que tenga una secuencia de bases que sea operativa en la *Escherichia* que no asimila sacarosa, y preferentemente un gen *mak* que codifica la proteína Mak de tipo silvestre de bacterias entéricas (Mak-o). En una realización específica, se usó preferentemente un polinucleótido que tenía una secuencia de bases de SEQ ID NO: 15 (número de registro GenBank AC000091) procedente de *E. coli*. Sin embargo, será obvio para los expertos en la materia, que el gen que codifica la manoquinasa puede modificarse en alguna medida siempre que conserve su actividad. Los expertos en la materia entenderán fácilmente que la secuencia de bases que conserva una homología de 70 % o más por la modificación artificial es equivalente a la procedente de la secuencia de bases de la presente invención, siempre que conserve la actividad deseada en la presente invención.

En la presente invención, para mejorar adicionalmente la productividad de L-aminoácidos y la capacidad de asimilar sacarosa, puede utilizarse un método para aumentar el número de copias del gen que codifica un péptido que tiene actividades de manoquinasa, sacarosa permeasa, sacarosa hidrolasa y de regulador transcripcional de sacarosa, un método para mejorar un promotor, mutagénesis aleatoria o mutagénesis dirigida. En la realización específica de la presente invención, se indujo mutagénesis aleatoria en el agrupamiento de genes que contenía las secuencias de bases que codificaban la manoquinasa, la sacarosa permeasa, la sacarosa hidrolasa y el regulador transcripcional de sacarosa por tratamiento con hidroxilamina (Sikorski RS & Boeke JD, *Methods Enzymol.* (1991) 194: 302-318).

Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención se refiere a un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* que tiene una productividad de L-aminoácidos mejorada y capacidad de asimilar sacarosa, en el que la mutación en su secuencia de bases o secuencia de aminoácidos se induce por la mutagénesis anterior. Preferentemente, el mutante es un mutante que tiene una o más mutaciones en las secuencias de bases de manoquinasa, sacarosa permeasa, sacarosa hidrolasa y regulador transcripcional de sacarosa. Más preferentemente, el mutante es un mutante que tiene una o más mutaciones en las secuencias de aminoácidos de

manoquinasa, sacarosa permeasa, sacarosa hidrolasa y regulador transcripcional de sacarosa. Preferentemente, el mutante tiene un regulador transcripcional de sacarosa mutado, codificado por la secuencia de bases representada por la SEQ ID NO. 17.

Un microorganismo perteneciente al género *Escherichia* que tiene una productividad de L-aminoácidos mejorada y capacidad de asimilar sacarosa de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse introduciendo el mutante en el vector y transformando con el vector recombinante la *Escherichia* que no asimila sacarosa que tiene productividad de L-aminoácidos. En una realización específica, los presentes inventores utilizaron un plásmido pAcsCBAR'-mak que contenía una secuencia de bases representada por la SEQ ID NO. 18 para transformar la *Escherichia* que no asimila sacarosa en un microorganismo perteneciente al género *Escherichia* que tiene la productividad de L-aminoácidos mejorada y capacidad de asimilar sacarosa.

Como se usa en el presente documento, el término "vector" es un compuesto de ácido nucleico utilizado para la preparación del microorganismo perteneciente al género *Escherichia* de acuerdo con la presente invención, preparado introduciendo los genes que codifican la sacarosa permeasa, la sacarosa hidrolasa, el regulador transcripcional de sacarosa y la manoquinasa en una célula hospedadora, *Escherichia* que no asimila sacarosa, y el vector incluye factores de expresión esenciales típicos para la expresión de la proteína deseada. Específicamente, el vector incluye elementos reguladores de la expresión tales como un promotor, un operador, un codón de iniciación, un codón de terminación y una señal de poliadenilación, que pueden modificarse de diversas formas. Además, el vector puede incluir una secuencia potenciadora o secuencia secretora. Los ejemplos de vectores utilizados comúnmente pueden incluir plásmidos naturales o recombinantes, cósmidos, virus y bacteriófagos. Por ejemplo, el vector de fago o vector de cósmido puede incluir pWE15, M13, λ EMBL3, λ EMBL4, λ FIXII, λ DASHII, λ ZAPII, λ gt10, λ gt11, Charon4A y Charon21A, y el vector de plásmido incluye pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL y plásmidos de tipo pET. Los vectores a utilizar no están limitados particularmente, y puede utilizarse cualquier vector de expresión conocido. Se prefieren los vectores pACYC177, pACYC187, pCL, pECCG117, pUC19, pBR322 y pMW118.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" significa un método en el que un gen se introduce en una célula hospedadora a expresar en la célula hospedadora. Los genes transformados, si están en el estado de expresarse en la célula hospedadora, comprenden cualquiera de los genes insertados en el cromosoma de la célula hospedadora o situados en otras partes del cromosoma. Además, el gen comprende ADN y ARN como polinucleótido capaz de codificar un polipéptido. Siempre que el gen pueda introducirse en la célula hospedadora y expresarse en la misma, el gen se introduce en cualquier tipo. Por ejemplo, el gen puede introducirse en la célula hospedadora en el tipo de casete de expresión que es un expresoma de polinucleótido que comprende en sí mismo elementos enteros para expresar el gen. El casete de expresión comprende un promotor que está conectado operativamente al gen, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión a ribosomas y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en el tipo del vector de expresión capaz de autoclonarse. El gen también puede introducirse en la célula hospedadora por sí misma o en el tipo de expresoma de polinucleótido que se conectará operativamente a la secuencia necesaria para la expresión en la célula hospedadora.

El microorganismo de la presente invención se refiere a un microorganismo perteneciente al género *Escherichia* que tiene productividad de L-aminoácidos mejorada y capacidad de asimilar sacarosa, que se prepara impartiendo las actividades de sacarosa permeasa, sacarosa hidrolasa y regulador transcripcional de sacarosa a un microorganismo que no asimila sacarosa que tiene productividad de L-aminoácidos y aumentando la actividad manoquinasa.

El microorganismo de la presente invención es preferentemente *E. coli*.

En la presente invención, el "L-aminoácido" es L-treonina, O-succinil-homoserina, O-acetil-homoserina, L-metionina, L-lisina, L-homoserina, L-isoleucina, L-valina, L-triptófano o similares. Preferentemente, el L-aminoácido es L-treonina, O-succinil-homoserina, O-acetil-homoserina y L-triptófano.

En una realización específica, los presentes inventores transformaron la cepa ABA5G de *E. coli* que tiene productividad de L-treonina utilizando un vector que tiene una secuencia de bases de SEQ ID NO. 18, que contiene el agrupamiento de genes *cscBAR'-mak* de *E. coli* que tiene productividad de L-treonina. La cepa preparada se denominó *E. coli* CA03-0308, y se depositó en el organismo de depósitos internacional, Korean Culture Center of Microorganisms, que es la Colección de Cultivos Subsidiaria de la Federación Coreana de Colecciones de Cultivo (localizada en 361-221, Hongje-1-dong, Seodaemon-gu, Seúl, Corea) el 23 de diciembre de 2008, con el número de registro asignado KCCM-10978P.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir L-aminoácidos utilizando el microorganismo perteneciente al género *Escherichia* en un medio que contiene sacarosa como fuente de carbono, que comprende las etapas de inocular y cultivar el microorganismo que tiene capacidad de asimilar sacarosa y productividad de L-aminoácidos en un medio de cultivo que contiene total o parcialmente sacarosa como fuente de carbono; y separar los L-aminoácidos del medio de cultivo.

Los procedimientos de cultivo utilizados en la presente invención pueden realizarse en un medio adecuado y en condiciones de cultivo conocidas en la técnica. De acuerdo con las cepas utilizadas, los procedimientos de cultivo pueden ajustarse fácilmente por los expertos en la materia. Los ejemplos de procedimientos de cultivo incluyen tipo discontinuo, tipo continuo y tipo semicontinuo, pero no se limitan a los mismos. Los medios utilizados en el método de cultivo deben cumplir preferentemente los requisitos de una cepa específica.

El medio utilizado en la presente invención contiene sacarosa como fuente principal de carbono. La sacarosa utilizada como fuente principal de carbono puede suministrarse en forma de melazas que contienen una alta concentración de sacarosa, y el medio puede contener una cantidad apropiada de diversas fuentes de carbono sin limitación, además de la sacarosa o las melazas. La fuente de nitrógeno puede utilizarse de forma individual o en combinaciones. Al medio puede añadirse fuentes de fósforo, tales como dihidrogenofosfato potásico, hidrogenofosfato dipotásico o sales correspondientes que contienen sodio. Además, el medio puede contener sales de metales tales como sulfato de magnesio y sulfato ferroso. Por otro lado, el medio puede complementarse con aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Estos medios o precursores pueden añadirse a los cultivos por un método de tipo discontinuo o de tipo continuo.

Durante el cultivo, pueden añadirse, de forma apropiada, hidróxido amónico, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico para ajustar el pH de los cultivos. De manera apropiada, para reducir la formación de espumas en los cultivos, pueden añadirse antiespumantes tales como éster poliglicólico de ácidos grasos. Para mantener los cultivos en estado aerobio se les puede inyectar oxígeno o gases que contengan oxígeno. Para mantener los cultivos en estado anaerobio y microaerobio, no se les puede inyectarse gas o se les puede inyectar gas de nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono. Los cultivos se mantienen a una temperatura de 27 °C a 37 °C, y preferentemente, a una temperatura de 30 °C a 35 °C. El cultivo puede proseguir hasta que se obtenga una cantidad deseada del material deseado, y preferentemente puede proseguir durante 10 a 100 horas.

El método para recoger y recuperar los aminoácidos producidos en la etapa de cultivo que se utiliza en la presente invención, puede realizarse mediante un método apropiado conocido en la técnica, dependiendo de los procedimientos de cultivo, por ejemplo, tipo discontinuo, tipo continuo y tipo semicontinuo, para recoger el aminoácido deseado del medio de cultivo.

Modo para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle haciendo referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos solo tienen fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención.

Ejemplo 1: Establecimiento y clonación del gen de asimilación de sacarosa, regulón *csc*

Un regulón que contenía el gen *cscBKAR* (número de registro GenBank X81461), que codifica el sistema Scr-no PTS que no requiere consumo de PEP (fosfoenolpiruvato) tras la captación de sacarosa, se amplificó por PCR utilizando como molde un ADN genómico de la cepa W de *E. coli* (ATCC9637, Estados Unidos). Para amplificar como un solo polinucleótido, cuatro tipos de genes que están presentes consecutivamente en el genoma, se usó un cebador de SEQ ID NO. 1 que tenía el sitio de restricción *EagI* y un cebador de SEQ ID NO. 2 que tenía el sitio de restricción *XbaI*.

SEQ ID NO. 1: 5'-CTTACGGCCGGAGTACATTTGAGCGACTGT-3'
SEQ ID NO. 2: 5'-CGACTCTAGACTCGTTGGCGAGAACAGAGG-3'

La PCR se realizó en condiciones que incluían desnaturalización a 94 °C durante 3 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 56 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 5 min, y después polimerización a 72 °C durante 7 min. Como resultado, se obtuvo un polinucleótido de 5199 pb. El polinucleótido obtenido se trató con las enzimas de restricción *EagI* y *XbaI*, y después se clonó en un vector pACYC184. Posteriormente, DH5 α de *E. coli* se transformó con el vector y se expandió en una placa de agar MacConkey que contenía sacarosa al 1%. De las colonias, se seleccionaron las de color púrpura intenso, y después se obtuvo un plásmido de las mismas.

Ejemplo 2. Determinación de la secuencia de bases del gen *cscBKAR* obtenido

El plásmido obtenido se denominó pAcsBKAR, y se analizó la secuencia de bases de ADN (SEQ ID NO. 3) de *cscBKAR* clonado en los sitios *EagI* y *XbaI*. Se determinó que las posiciones 141 a 1388 de la secuencia de bases eran *cscB* (SEQ ID NO. 4), las posiciones 1460 a 2374 *cscK* (SEQ ID NO. 5), las posiciones 2590 a 4023 *cscA* (SEQ ID NO. 6) y las posiciones 4031 a 5026 *cscR* (SEQ ID NO. 7).

Ejemplo 3. Construcción de la cepa MG1655 con el gen *mak* deletado

Para investigar genes cruciales implicados en el metabolismo de la sacarosa, se seleccionaron genes candidatos que se esperaba que estuvieran implicados en el metabolismo de la sacarosa, y se construyó la cepa K12 de *E. coli*

mutante que tenía cada gen deletado. Se realizó una inactivación de una etapa (*Proc. Natl. Acad. Sci.* (2000) 97: 6640-6645) para deletar cada gen, construyendo de esta manera la cepa K12 de *E. coli* mutante y se retiró un gen marcador de resistencia a antibióticos. En particular, para construir una cepa con el gen *mak* deletado, se realizó PCR utilizando un par de cebadores de las SEQ ID NO. 8 y 9 y un plásmido pKD4 (Genbank N.º AY048743). El fragmento de ADN obtenido se introdujo por electroporación en una célula competente, la K12 de *E. coli* de tipo silvestre que contenía pKD46 (GenBank N.º AY048746). Después, las cepas que mostraban resistencia a kanamicina se sometieron a PCR, y se examinó la delección del gen *mak*. Se introdujo un plásmido pCP20 para retirar un gen marcador de resistencia a antibióticos.

SEQ ID NO. 8: 5'-GTGCGTATAGGTATCGATTTAGGCGGCACCAAACTGAAGTGATTGCACTGTTGCAGCATTACACGTCTTG-3'
SEQ ID NO. 9: 5'-TTACTCTTGTGGCCATAACCACGCAGCGCCGCGTACGCCGCTGGAATCACCCTTAACGGCTGACATGGGA-3'

Ejemplo 4. Introducción de pAcscBKAR en la cepa MG1655 con el gen *mak* deletado y análisis de la asimilación de sacarosa

De acuerdo con el ejemplo 3, se construyó la cepa K12 de *E. coli* con una delección del gen *mak* que era de esperar que afectara al metabolismo de la sacarosa y después se transformó con el plásmido pAcscBKAR. El transformante con el plásmido pAcscBKAR introducido se cultivó en un medio sólido LB en una incubadora a 33 °C durante una noche. En 25 ml de un medio de titulación que contenía sacarosa como se indica en la Tabla 1, se inoculó un asa de la cepa y después se cultivó en una incubadora a 33 °C a 200 rpm durante 36 horas. Se midió el valor de DO y el consumo de azúcar del medio de cultivo y los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1

Composición	Concentración (por litro)
Sacarosa	70 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5 mg
MgSO ₄ · 4H ₂ O	5 mg
Extracto de levadura	2 g
Carbonato cálcico	30 g
pH	6,8

Tabla 2

Cepa	DO	Consumo de azúcar (g/l)
MG1655/pAcscBKAR	26,0	33,1
MG1655Δmak/pAcscBKAR	24,2	24,9

Como se muestra en la Tabla 2, se observó que la cepa con el regulón *csc* introducido y el gen *mak* deletado utilizaba 24,9 g/l de sacarosa durante 36 horas, y que la cepa de tipo silvestre con el regulón *csc* introducido y sin el gen *mak* deletado, utilizaba 33,1 g/l de sacarosa, lo que indicaba que la tasa de consumo de sacarosa de la cepa con el gen *mak* deletado es aproximadamente 1,3 veces menor que la de la cepa sin el gen *mak* deletado. Por lo tanto, se sugirió que el gen *mak* es un gen crucial en el metabolismo de la sacarosa.

Ejemplo 5. Construcción de pAcscBAR-mak

Para desarrollar cepas que asimilan sacarosa de forma eficaz, se construyó un vector que sobreexpresaba tanto *mak* como el regulón de *csc*. En este momento, *cscK* se excluyó del regulón de *csc*. En primer lugar, se construyó pAcscBAR, y el gen *mak* se clonó en pAcscBAR.

Específicamente, se usó un par de cebadores de SEQ ID NO. 10 y 11 para realizar la PCR en las condiciones del Ejemplo 1 para amplificar un polinucleótido de la región *cscB*, donde se retiró *cscK*. Como resultado, se obtuvo un polinucleótido de 1521 pb.

SEQ ID NO. 10: 5'-CGCGATATCTAGCATATGCCGGGTACCGCACTAGTTGAGAGTAAACGGC GAAGT-3'
SEQ ID NO. 11: 5'-ATTCGGCCGGAGCCCTGCAGGTGCACGAGTACATTTGAGCGACTGT-3'

El polinucleótido obtenido y pAcscBKAR se trataron con las enzimas de restricción *EcoRV* y *EagI*, respectivamente y se conectaron entre sí para construir un plásmido pAcscBAR. La cepa DH5 α de *E. coli* se transformó con el vector y entre las colonias que estaban en medio LB, a través de PCR, se seleccionaron las que contenían pAcscBAR, para obtener un plásmido pAcscBAR. Se analizó la secuencia de bases (SEQ ID NO. 12) de *cscBAR* ligado a los sitios de restricción *XbaI* y *EagI* del plásmido pAcscBAR obtenido y no se encontró ninguna mutación.

Posteriormente, para amplificar el polinucleótido que contenía el gen *mak*, se realizó la PCR utilizando, como molde, el ADN genómico de *E. coli* W3110 y un par de cebadores de SEQ ID NO. 13 y 14 de la misma manera que la indicada en el Ejemplo 1. Se obtuvo un polinucleótido de 1388 pb y el producto de la PCR se clonó en los sitios de restricción *PstI* y *EagI* de pAcscBAR para construir pAcscBAR-*mak*.

SEQ ID NO. 13: 5'-CACTGCAGTGGGGTAAATGCCATCG-3'

SEQ ID NO. 14: 5'-AACGGCCGTCTCGGTGCTCATTACT-3'

La cepa DH5 α de *E. coli* se transformó con pAcscBAR y entre las colonias que estaban en medio LB, a través de PCR, se seleccionaron las que contenían pAcscBAR-*mak* por PCR, para obtener un plásmido pAcscBAR-*mak*. Se analizó la secuencia de bases (SEQ ID NO. 16) de pAcscBAR-*mak* ligado a los sitios de restricción *XbaI* y *EagI* del plásmido pAcscBAR-*mak* obtenido, y no se encontró ninguna mutación.

Ejemplo 6. Introducción de pAcscBAR-*mak* en una cepa productora de treonina

Para confirmar si *E. coli* productora de treonina crecía en sacarosa y producía de forma eficaz treonina por transformación de pAcscBAR-*mak*, se transformó una cepa productora de treonina ABA5G (KFCC 10718) con el plásmido. A partir de las colonias obtenidas por PCR, se seleccionaron colonias que tenían el plásmido que contenía el gen relacionado con la asimilación de sacarosa. Las colonias seleccionadas se incubaron en medio LB sólido en una incubadora a 33 °C durante una noche. En 25 ml de un medio de titulación que contenía sacarosa como se indica en la Tabla 1, se inoculó un asa de la cepa y después se cultivó en una incubadora a 33 °C a 200 rpm durante 36 horas. Posteriormente, se midió el valor de DO y el consumo de azúcar del medio de cultivo y los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Cepa parental	DO	Consumo de azúcar (g/l)	L-treonina (g/l)
pAcscBKAR	9,2	18,7	6,0
pAcscBAR- <i>mak</i>	10,8	27,7	9,7

Como se muestra en la Tabla 3, cuando la cepa ABA5G, que contenía pAcscBKAR, se cultivó durante 30 horas, utilizaba 18,7 g/l de sacarosa y producía 6,0 g/l de L-treonina, pero la cepa ABA5G, que contenía pAcscBAR-*mak*, utilizaba 27,7 g/l de sacarosa y producía 9,7 g/l de L-treonina. Es decir, la tasa de consumo de sacarosa de la cepa ABA5G que contenía pAcscBAR-*mak* era aproximadamente 1,5 veces mayor que la de la cepa ABA5G que contenía pAcscBKAR, y la productividad de treonina de la cepa ABA5G que contenía pAcscBAR-*mak* aumentó a 3,7 g/l más que la de la cepa ABA5G que contenía pAcscBKAR.

Ejemplo 7. Aumento de la actividad de Mak por introducción de *cscBAR-mak*

Para confirmar un aumento o una mejora en la actividad manoquinasa de la cepa ABA5G que contiene pAcscBAR-*mak* en comparación con la cepa parental ABA5G, se midió la actividad fructoquinasa (Copeland L *et al.*, *Plant Physiol.* (1978) 62: 291-294). Esta medición de la actividad fructoquinasa es un método para medir la actividad fructoquinasa de manoquinasa a través de una reacción de acoplamiento utilizando manoquinasa, fosfoglucosa isomerasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y utilizando fructosa como sustrato inicial. El sobrenadante se obtuvo sometiendo a ultrasonido y centrifugación las cepas ABA5G que contenían tanto pAcscBAR como pAcscBAR-*mak* cultivadas en medio LB durante 24 horas, y se usó como un líquido enzimático. La concentración proteica se determinó mediante el ensayo Bradford. La reacción enzimática se mantuvo durante 30 min y se midió el cambio de absorbancia a una DO 340 nm para medir el NADPH producido por la reacción de acoplamiento. La actividad se calculó utilizando el coeficiente de absorción de NADPH de 6,22 cm⁻¹ mM⁻¹. 1 unidad de manoquinasa se define como una cantidad de enzima que cataliza 1 mg de proteína total por 1 min para producir NADPH 1 nM por la medición de actividad enzimática anterior. El resultado se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Cepa parental ABA5G	Unidades (nM/mg/min)
pAcscBAR	0,3
pAcscBAR- <i>mak</i>	3,7

Como se muestra en la Tabla 4, la actividad manquinasa de ABA5G que contiene pAcscBAR-mak aumentó o mejoró aproximadamente 12 veces más que la de ABA5G que contenía solo pAcscBAR.

Ejemplo 8. Introducción de la mutación *cscBAR-mak*

Para mejorar la asimilación de sacarosa y la productividad de treonina, se realizó mutagénesis química aleatoria para obtener un gen mutado que asimila sacarosa por tratamiento de hidroxilamina (Sikorski RS & Boeke JD, *Methods Enzymol.* (1991) 194: 302-318). En primer lugar, se añadieron hidroxilamina 1 M, EDTA 2 mM, cloruro sódico 100 mM y pirofosfato sódico 50 mM para preparar una solución de mutagénesis y después se añadieron 25 µl de ADN diana (0,2 mg/ml) a 1 ml de la solución de mutagénesis. El fragmento de ADN que contenía 5887 pb de *cscBAR-mak*, que se obtuvo a partir del plásmido pAcscBAR-mak utilizando las enzimas de restricción *EagI* y *XbaI*, se usó como ADN diana. Se purificaron 500 µl del fragmento de ADN en la solución de mutagénesis a 75 °C a 30 min, 1 hora, 2 horas y 4 horas utilizando una columna de purificación. El ADN tratado con hidroxilamina y el vector pACYC184 tratado con las enzimas de restricción *EagI* y *XbaI* se ligaron entre sí utilizando una ADN ligasa de T4 y se transformaron en la cepa ABA5G productora de treonina. La cepa transformada se extendió en una placa de agar MacConkey que contenía una concentración baja de sacarosa al 0,1 %, y se cultivó a 37 °C durante un día. De las colonias, se seleccionaron las que tenían un color púrpura intenso.

Las colonias seleccionadas se cultivaron en el medio de titulación de la Tabla 1 y se evaluaron la productividad de la treonina y la tasa de utilización de sacarosa. Finalmente, se seleccionó la cepa que mostraba excelente productividad de treonina y utilización de sacarosa. Se obtuvo un plásmido de la cepa seleccionada y se realizó un análisis de la secuencia de bases. Como resultado, se observó una sustitución de C por T en la posición 388 en el *cscR* de la cepa y, por lo tanto, se produjo una mutación de histidina a tirosina en la posición 130 de la secuencia de aminoácidos. El regulador transcripcional de sacarosa, *cscR*, que tenía la mutación, se codificó mediante la secuencia de bases de SEQ ID NO. 17.

Ejemplo 9. Mejora de la productividad de L-treonina por introducción de pAcscBAR'-mak

El plásmido pAcscBAR'-mak (SEQ ID NO. 18) que contenía la mutación en *cscR* (SEQ ID NO. 17) se transformó en ABA5G para realizar un ensayo de titulación en matraz. La cepa se cultivó en medio LB sólido y en una incubadora a 33 °C durante una noche. En 25 ml de un medio de titulación como se indica en la Tabla 1, se inoculó un asa de la cepa y después se cultivó en una incubadora a 33 °C a 200 rpm durante 30 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Cepa parental ABA5G	DO	Consumo de azúcar (g/l)	L-treonina (g/l)
pAcscBKAR	9,2	18,7	6,0
pAcscBAR-mak	10,8	27,7	9,7
pAcscBAR'-mak	10,3	33,4	12,4

Como se muestra en la Tabla 5, cuando las cepas se cultivaron durante 30 horas, la cepa ABA5G que contenía pAcscBKAR utilizaba 18,7 g/l de sacarosa y producía 6,0 g/l de L-treonina, pero la cepa ABA5G que contenía pAcscBAR'-mak utilizaba 33,4 g/l de sacarosa y producía 12,4 g/l de L-treonina. Es decir, la tasa de utilización de sacarosa y la productividad de treonina de la cepa ABA5G que contenía pAcscBAR'-mak aumentó aproximadamente 1,8 veces y 6,4 g/l más que las de la cepa ABA5G que contenía pAcscBKAR, respectivamente. Además, la tasa de utilización de sacarosa y la productividad de treonina de la cepa ABA5G que contenía pAcscBAR'-mak aumentó aproximadamente 1,2 veces y 2,7 g/l más que las de la cepa ABA5G que contenía pAcscBAR-mak, respectivamente. Por lo tanto, se descubrió que la cepa recombinante que contenía *cscBAR'-mak* mostraba la utilización de sacarosa mejorada y la productividad de L-treonina mejorada. El microorganismo transformado se denominó CA03-0308 y se depositó en el organismo de depósitos internacional, Korean Culture Center of Microorganisms, que es la Colección de Cultivos Subsidiaria de la Federación Coreana de Colecciones de Cultivo (localizada en 361-221, Hongje-1-dong, Seodaemon-gu, Seúl, Corea) el 23 de diciembre de 2008, con el número de registro asignado KCCM-10978P.

Ejemplo 10. Mejora de la productividad de O-succinil-homoserina por introducción de pAcscBAR'-mak

La cepa de producción de O-succinil-homoserina, CJM-11A (KCCM-10922P), desvelada en la Patente de Estados Unidos N.º 2009/0253187, se transformó con pAcscBAR'-mak construido en el Ejemplo 8 y se expandió en una placa de agar MacConkey que contenía una concentración baja de sacarosa al 0,1 %, seguido de cultivo a 37 °C durante un día. De las colonias, se seleccionaron las que tenían un color púrpura intenso.

El transformante seleccionado se cultivó en medio LB sólido y en una incubadora a 33 °C durante una noche. En 25 ml de un medio de titulación como se indica en la Tabla 1, se inoculó un asa de la cepa y después se cultivó en una incubadora a 33 °C a 200 rpm. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Cepa parental CJM-11A	DO	Consumo de azúcar (g/l)	O-succinil-homoserina (g/l)
pAcscBKAR	6,8	30,2	12,3
pAcscBAR-mak	6,8	44,8	18,2
pAcscBAR'-mak	7,5	50,4	20,5

Como se muestra en la Tabla 6, cuando las cepas se cultivaron durante 48 horas, la cepa parental CJM-11A que contenía pAcscBKAR utilizaba 30,2 g/l de sacarosa y producía 12,4 g/l de O-succinil-homoserina, pero la cepa CJM-11A que contenía pAcscBAR'-mak utilizaba 50,4 g/l de sacarosa y producía 20,5 g/l de O-succinil-homoserina, lo que indicaba que la tasa de utilización de sacarosa y la productividad de O-succinil-homoserina aumentaba aproximadamente 1,7 veces y 8,2 g/l más que las de la cepa CJM-11A que contenía pAcscBKAR, respectivamente. Es decir, se descubrió que la cepa recombinante que contenía *cscBAR'-mak* mostraba una mejor utilización de sacarosa y mejor productividad de O-succinil-homoserina.

Ejemplo 11. Mejora de la productividad de O-acetil-homoserina por introducción de pAcscBAR'-mak

La cepa productora de O-acetil-homoserina, CJM-X (KCCM 10921P) desvelada en la Patente de Estados Unidos N.º 2008/0253186 se transformó con pAcscBAR'-mak construido en el Ejemplo 8 y se expandió en una placa de agar MacConkey que contenía una concentración baja de sacarosa al 0,1 %, seguido de cultivo a 37 °C durante un día. De las colonias, se seleccionaron las que tenían un color púrpura intenso.

El transformante seleccionado se cultivó en medio sólido LB y en una incubadora a 33 °C durante una noche. En 25 ml de un medio de titulación como se indica en la Tabla 1, se inoculó un asa de la cepa y después se cultivó en una incubadora a 33 °C a 200 rpm. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Cepa parental CJM-X	DO	Consumo de azúcar (g/l)	O-acetil-homoserina (g/l)
pAcscBKAR	13,5	29,9	10,7
pAcscBAR-mak	12,3	42,9	15,4
pAcscBAR'-mak	13,6	53,5	19,5

Como se muestra en la Tabla 7, cuando las cepas se cultivaron durante 48 horas, la cepa parental, CJM-X que contenía pAcscBKAR utilizaba 29,9 g/l de sacarosa y producía 10,7 g/l de O-acetil-homoserina (en lo sucesivo en el presente documento denominada OAH), pero la cepa CJM-X que contenía pAcscBAR'-mak utilizaba 53,5 g/l de sacarosa y producía 15,4 g/l de OAH, lo que indicaba que la tasa de utilización de sacarosa y la productividad de OAH aumentaba aproximadamente 1,8 veces y 8,8 g/l más que las de la cepa CJM-X que contenía pAcscBKAR, respectivamente. Es decir, se descubrió que la cepa recombinante que contenía *cscBAR'-mak* mostraba una mejor utilización de sacarosa y productividad de OAH.

Ejemplo 12. Mejora de la productividad de L-triptófano por introducción de pAcscBAR'-mak

La cepa productora de L-triptófano, CJ285 (KCCM-10534, depositada en el Korean Culture Center of Microorganisms el 28 de noviembre de 2003) se transformó con pAcscBAR'-mak construido en el Ejemplo 8 y se expandió en una placa de agar MacConkey que contenía una concentración baja de sacarosa al 0,1 %, seguido de cultivo a 37 °C durante un día. De las colonias, se seleccionaron las que tenían un color púrpura intenso.

El transformante seleccionado se cultivó en medio LB sólido y en una incubadora a 37 °C durante una noche. En 25 ml de un medio de titulación que contenía sacarosa como se indica en la Tabla 1, se inoculó un asa de la cepa y después se cultivó en una incubadora a 37 °C a 200 rpm. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Composición	Concentración (por litro)
Sacarosa	60 g
KH ₂ PO ₄	2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O	5 g
NaCl	1 g
Extracto de levadura	2,5 g

Composición	Concentración (por litro)
Carbonato cálcico	40 g

Tabla 9

Cepa parental CJ285	DO	Consumo de azúcar (g/l)	L-triptófano (g/l)
pAcscBKAR	19,6	24,7	4,9
pAcscBAR-mak	22,8	33,2	6,8
pAcscBAR'-mak	24,1	37,1	8,9

Como se muestra en la Tabla 9, cuando las cepas se cultivaron durante 60 horas, la cepa parental, CJ285 que contenía pAcscBKAR utilizaba 24,7 g/l de sacarosa y producía 4,9 g/l de L-triptófano, pero la cepa CJ285 que contenía pAcscBAR'-mak utilizaba 37,1 g/l de sacarosa y producía 8,9 g/l de L-triptófano, lo que indicaba que la tasa de utilización de sacarosa y la productividad de L-triptófano aumentaron aproximadamente 1,5 veces y 4,0 g/l más que las de la cepa CJ285 que contenía pAcscBKAR, respectivamente. Es decir, se descubrió que la cepa recombinante que contenía *cscBAR'-mak* mostraba una mejor utilización de sacarosa y productividad de L-triptófano.

Aplicabilidad industrial

Cuando el microorganismo que pertenece al género *Escherichia*, que tiene mejorada la productividad de L-aminoácidos y la capacidad de asimilar sacarosa de acuerdo con la presente invención, se utiliza para la producción de L-aminoácidos, la sacarosa puede utilizarse como fuente de carbono principal en lugar del azúcar de almidón normalmente utilizado en la fermentación industrial, haciendo frente de esta manera al rápido aumento en los precios globales del grano además de producir L-aminoácidos con alto rendimiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Microorganismos para producir L-aminoácidos y proceso para producir L-aminoácidos utilizando los mismos

<130> OPA10013

<150> KRIO-2009-0012048

<151> 13-02-2009

<160> 18

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> gen

<222> (1)..(30)

<223> cebador para la amplificación de cscBKAR

<400> 1

cttacggccg gagtacattt gagcgactgt

30

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> gen

<222> (1)..(30)

<223> cebador para la amplificación de cscBKAR

ES 2 635 312 T3

	<400> 2	
	cgactctaga ctcgttggcg agaacagagg	30
5	<210> 3	
	<211> 5179	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i> (ATCC9637)	
10	<220>	
	<221> gen	
	<222> (1)..(5179)	
	<223> polinucleótido que contiene el regulón cscBKAR	
15	<400> 3	
	gagtacattt gagcgactgt accagaacat gaatgaggcg tttggattag gcgattatta	60
	gcagggctaa gcattttact attattattt tccggttgag ggatatagag ctatcgacaa	120
	caaccggaaa aagtttacgt ctatattgct gaaggtagag gcgtttccat aactatttgc	180
	tcgcgttttt tactcaagaa gaaaatgcc aatagcaaca tcaggcagac aataccgaa	240
	attgcgaaga aaactgtctg gtagcctgctg tggtaaaga gtatcccagt cggcgttgaa	300
	agcagcaciaa tccaagcga actggcaatt tgaaaaccaa tcagaaagat cgtcgacgac	360
	aggcgcttat caaagtttgc cagcgtgtat ttgaagacgg atatgacaca aagtggaacc	420

tcaatggcat gtaacaactt cactaatgaa ataatccagg ggtaaacgaa cagcgcgcag	480
gaaaggatac gcaacgccat aatcacact ccgataagta atgcattttt tggccctacc	540
cgattcacia agaaaggaat aatcgccatg cacagcgctt cgagtaccac ctggaatgag	600
ttgagataac catacaggcg cgttcctaca tcgtgtgatt cgaataaacc tgaataaaag	660
acaggaaaaa gttgttgatc aaaaatgtta tagaaagacc acgtccccac aataaatatg	720
acgaaaaccc agaagtttcg atccttgaaa actgcgataa aatcctcttt ttttaccct	780
cccgcactcg ccgctacgca ctggtgatcc ttatctttta aacgcattgt gatcatcata	840
aatacagcgc caaatagcga gaccaaccag aagttgatat ggggactgat actaaaaaat	900
atgccggcaa agaacgcgcc aatagcatag ccaaagatc ccagggcgcg cgctgttcca	960
tattcgaaat gaaaatttcg cgccattttt tcggtgaagc tatcaagcaa accgcattccc	1020
gccagatacc ccagccaaa aaacagcgcc ccagaaatta gacctacaga aaaattgctt	1080
tgcagtaacg gttcataaac gtaaatcata aacggtccgg tcaagaccag gatgaaactc	1140
atacaccaga tgagcgggtt cttcagaccg agtttatcct gaacgatgcc gtagaacatc	1200
ataaatagaa tgctggtaaa ctggttgacc gaataaagtg tacctaattc cgtccctgtc	1260
aaccctagat gtcctttcag ccaaatagcg tataacgacc accacagcga ccaggaaata	1320
aaaaagagaa atgagtaact ggatgcaaaa cgatagtacg cttttctgaa tggaatactc	1380
agtgccataa ttacctgcct gtcgttaaaa aattcacgct ctatttagag ataagagcga	1440
cttcgcccgt tactttctac tattccagtt cttgtcgaca tggcagcgct gtcattgccc	1500
ctttcgccgt tactgcaagc gtcgcgaac gttgagcgag atcgataatt cgtcgcattt	1560
ctctctcatc tgtagataat cccgtagagg acagacctgt gagtaacccg gcaacgaacg	1620
catctcccgc ccccgtagta tcgacacaat tcacagacat tccagcaaaa tgggtgaactt	1680
gtcctcgata acagaccacc accccttctg cacctttagt caccaacagc atggcgatct	1740
catactcttt tgccagggcg catatatcct gatcgttctg tgtttttcca ctgataagtc	1800
gccattcttc ttccgagagc ttgacgacat ccgccagttg tagcgctgc cgcaaacaca	1860
agcggagcaa atgctcgtct tgccatagat cttcacgaat attaggatcg aagctgacaa	1920
aacctccggc atgccggatc gccgtcatcg cagtaaatgc gctggtacgc gaaggctcgg	1980
cagacaacgc aattgaacag agatgtaacc attcgccatg tcgccagcag ggcaagtctg	2040
tcgtctctaa aaaaagatcg gcaactggggc ggaccataaa cgtaaatgaa cgttccctt	2100
gatcgttcag atcgacaagc accgtggatg tccggtgaca ttcattctgc ttcagatacg	2160
tgatatcgac tccctcagtt agcagcgttc tttgcattaa cgcacaaaaa ggatcatccc	2220
ccacccgacc tataaaccca cttgttccgc ctaatctggc gattcccacc gcaacgttag	2280
ctggcgcgcc gccaggacaa ggcagtaggc gcccgctga ttctggcaag agatctacga	2340
ccgcatcccc taaaacccat actttggctg acattttttt cccttaaatt catctgagtt	2400
acgcatagtg ataaacctct ttttcgaaa atcgtcatgg atttactaaa acatgcatat	2460
tcgatcacia aacgtcatag ttaacgttaa catttgatg attcatcgca tttatgaaag	2520

ES 2 635 312 T3

taagggactt	tatTTTTata	aaagttaacg	ttaacaattc	accaaatttg	cttaaccagg	2580
atgattaaaa	tgacgcaatc	tcgattgcat	gcggcgcaaa	acgccctagc	aaaacttcat	2640
gagcaccggg	gtaacacttt	ctatccccat	tttcacctcg	cgcctcctgc	cgggtggatg	2700
aacgatccaa	acggcctgat	ctggtttaac	gatcgttatc	acgcgtttta	tcaacatcat	2760
ccgatgagcg	aacactgggg	gccaatgcac	tggggacatg	ccaccagcga	cgatatgatc	2820
cactggcagc	atgagcctat	tgcgctagcg	ccaggagacg	ataatgacaa	agacgggtgt	2880
ttttcaggta	gtgctgtcga	tgacaatggt	gtcctctcac	ttatctacac	cggacacgtc	2940
tggctcgatg	gtgcaggtaa	tgacgatgca	attcgcgaag	tacaatgtct	ggctaccagt	3000
cgggatggta	ttcatctcga	gaaacagggg	gtgatcctca	ctccaccaga	aggaatcatg	3060
cacttccgcg	atcctaaagt	gtggcgtgaa	gccgacacat	ggatggatgg	agtcggggcg	3120
aaagatccag	gcaacacggg	gcagatcctg	ctttatcgcg	gcagttcgtt	gcgtgaatgg	3180
accttcgatc	gcgtactggc	ccacgctgat	gcgggtgaaa	gctatatgtg	ggaatgtccg	3240
gactttttca	gccttggcga	tcagcattat	ctgatgtttt	ccccgcaggg	aatgaatgcc	3300
gagggataca	gttaccgaaa	tcgctttcaa	agtggcgtaa	taccggaat	gtggtcgcca	3360
ggacgacttt	ttgcacaatc	cgggcatttt	actgaacttg	ataacgggca	tgacttttat	3420
gcaccacaaa	gcttttttagc	gaaggatggt	cggcgtattg	ttatcggctg	gatggatatg	3480
tgggaatcgt	caatgccctc	aaaacgtgaa	ggatgggcag	gctgcatgac	gctggcgcg	3540
gagctatcag	agagcaatgg	caaacttcta	caacgcccgg	tacacgaagc	tgagtcgtta	3600
cgccagcagc	atcaatctgt	ctctccccgc	acaatcagca	ataaatatgt	tttgcaggaa	3660
aacgcgcaag	cagttgagat	tcagttgcag	tgggcgtgta	agaacagtga	tgccgaacat	3720
tacggattac	agctcggcac	tggaatgcgg	ctgtatatgt	ataaccaatc	tgagcgactt	3780
gttttgtggc	ggtattaccc	acacgagaat	ttagacggct	accgtagtat	tccccctccg	3840
cagcgtgaca	cgctcgccct	aaggatatatt	atcgatacat	catccgtgga	agtattttatt	3900
aacgacgggg	aagcgggtgat	gagtagtcga	atctatccgc	agccagaaga	acgggaactg	3960
tcgctttatg	cctccacagg	agtggctgtg	ctgcaacatg	gagcactctg	gctactgggt	4020
taacataata	tcaggtggaa	caacggatca	acagcgggca	agggatccgc	gtcactcttc	4080
cccccttcacg	accttcaata	atatgcaatg	cagcttccccg	cccgataatg	tcatgtggaa	4140
gctgaattgt	ggtcagcggc	ggtaaaaaca	gatgcccgc	gccaaccaga	ttatcaaagc	4200
ccattacggc	gacatcctgc	gggattcgta	cccccttcgc	cagaagaacc	tgataagcca	4260
caaaggctgc	gcgatcgta	ccacatatca	gaacatcaaa	atctgggttg	cccggtttga	4320
agtgggcatt	gagtaaacct	gcgagatcgg	tgtagtgatc	atcacctgtt	gccatgtgaa	4380
attgtttcac	ctcagccaga	tctcgttcag	catcacgcca	ggcctgctca	aatccctgcc	4440
gacgataccc	tggttgccaac	gcactttccg	gtagccagaa	gcataacggg	tgacgatagc	4500
ccgccgcgag	caaatgctgt	gttgattcat	attgtgcagt	gtaatcatca	gggatataac	4560
tgggtaacgc	tgggtcatcc	gccacacagt	tcgccaatac	aatattttca	ccatacagag	4620

ES 2 635 312 T3

actcaggcag	cgtgatatgt	cgcagcccca	ttgtagtata	gataatgcc	tccggacggt	4680
gggcaagcag	ctgacgtgcc	gcgcgggcag	cgtcatcttc	agaaaaata	ttgattaaaa	4740
aactattcca	gccgaactcg	ctggcgggtt	gctcaatggc	aagcagaata	tcaacagaga	4800
aaggagtgg	agccgtgtcc	tgcgccagca	cggcgagagt	cgacggctta	cgctccttgag	4860
cgcgcatctt	acgggcggaa	agatcaggaa	cataattcag	ggtctggatt	gcctgcaata	4920
cgcggtcacg	cgttgacgga	cgcacagatt	ctgcattatg	catcaccggg	gagactgtca	4980
tcacgacac	tcccgccagg	cgtgcgacat	cctttaatga	agccataccc	aagccgtttg	5040
ccgtaaaacg	ggcactgtag	cagaaacaga	cgtcactggc	gagatccaac	gccctatcac	5100
ctgacacagc	aatacaataa	aaaataacaa	taattcccg	acaattgtcc	ccagttccgc	5160
ctctgttctc	gccaacgag					5179

<210> 4
 <211> 1248
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* (ATCC9637)

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1248)
 <223> cscB

<400> 4

atggcactga	gtattccatt	cagaaatgcg	tactatcggt	ttgcatccag	ttactcattt	60
ctctttttta	tttctgtgtc	gctgtggtgg	tcgttatacg	ctatttggtc	gaaaggacat	120
ctagggttga	caggacgga	attaggtaca	ctttattcgg	tcaaccagtt	taccagcatt	180
ctatttatga	tgttctacgg	catcgttcag	gataaactcg	gtctgaagaa	accgctcatc	240
tgggtgatga	gtttcatcct	ggtcttgacc	ggaccgttta	tgatttacgt	ttatgaaccg	300
ttactgcaaa	gcaatttttc	tgtaggtcta	attctggggg	cgctgttttt	tggctggggg	360
tatctggcgg	gatgcggttt	gcttgatagc	ttcaccgaaa	aaatggcgcg	aaattttcat	420
ttcgaatatg	gaacagcgcg	cgcctgggga	tcttttggtc	atgctattgg	cgcgttcttt	480
gccggcatat	tttttagtat	cagtcccat	atcaacttct	ggttggtctc	gctatttggc	540
gctgtattta	tgatgatcaa	catgcgtttt	aaagataagg	atcaccagtg	cgtagcggca	600
gatgcgggag	gggtaaaaaa	agaggatttt	atcgcagttt	tcaaggatcg	aaacttctgg	660
gttttcgtca	tatttattgt	ggggacgtgg	tctttctata	acatttttga	tcaacaactt	720
tttctgtct	tttattcagg	tttattcgaa	tcacacgatg	taggaacgcg	cctgtatggt	780
tatctcaact	cattccaggt	ggtactcgaa	gcgctgtgca	tggcgattat	tcctttcttt	840
gtgaatcggg	tagggccaaa	aatgcatta	cttatcggag	ttgtgattat	ggcgttgctg	900
atcctttcct	gcgcgctgtt	cgtaacccc	tggattat	cattagtga	gttggtacat	960
gccattgagg	ttccactttg	tgtcatatcc	gtcttcaaat	acagcgtggc	aaactttgat	1020
aagcgcctgt	cgtcgacgat	ctttctgatt	ggttttcaaa	ttgccagttc	gcttgggatt	1080
gtgctgcttt	caacgccgac	tgggatactc	tttgaccacg	caggctacca	gacagttttc	1140
ttcgcaattt	cgggtattgt	ctgcctgatg	ttgctatttg	gcattttctt	cttgagtaaa	1200
aaacgcgagc	aatagttat	ggaaacgcct	gtaccttcag	caatatag		1248

ES 2 635 312 T3

5	<210> 5		
	<211> 915		
	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i> (ATCC9637)		
10	<220>		
	<221> gen		
	<222> (1)..(915)		
	<223> csck		
15	<400> 5		
	atgtcagcca aagtatgggt tttaggggat gcggtcgtag atctcttgcc agaatcagac	60	
	ggg'gccttac tgccttgtcc tggcggcgcg ccagctaacg ttgcggtggg aatcgccaga	120	
	ttaggcggaa caagtgggtt tataggtcgg gtgggggatg atccttttg tgcgttaatg	180	
20	caaagaacgc tgctaactga gggagtcgat atcacgtatc tgaagcaaga tgaatgtcac	240	
	cggacatcca cgggtgcttgt cgatctgaac gatcaagggg aacgttcatt tacgtttatg	300	
	gtccgccccca gtgccgatct ttttttagag acgacagact tgccctgctg gcgacatggc	360	
	gaatggttac atctctgttc aattgcgttg tctgccgagc cttcgcgtac cagcgcatTT	420	
25	actgcgatga cggcgatccg gcatgccgga ggTTTTgtca gcttcgatcc taatattcgt	480	
	gaagatctat ggcaagacga gcatttgctc cgcttTgttt tgcggcaggc gctacaactg	540	
	gcggatgtcg tcaagctctc ggaagaagaa tggcgactta tcagtggaaa aacacagaac	600	
	gatcaggata tatgcgccct ggcaaaagag tatgagatcg ccatgctgtt ggtgactaaa	660	
	ggtgcagaag gggTggtggT ctgttatcga ggacaagttc accattttgc tggaatgtct	720	
	gtgaattgtg tcgatagcac gggggcgggg gatgcgttcg ttgccgggtt actcacaggT	780	
	ctgtcctcta cgggattatc tacagatgag agagaaatgc gacgaattat cgatctcgct	840	
	caacgttcg gagcgcttgc agtaacggcg aaaggggcaa tgacagcgct gccatgtcga	900	
	caagaactgg aatag	915	
15	<210> 6		
	<211> 1443		
	<212> ADN		
	<213> <i>Escherichia coli</i> (ATCC9637)		
20	<220>		
	<221> gen		
	<222> (1)..(1443)		
	<223> csCA		
25	<400> 6		
	atgattaaaa tgacgcaatc tcgattgcat gcggcgcaaa acgccctagc aaaacttcat	60	
	gagcaccggg gtaacacttt ctatccccat tttcacctcg cgcctcctgc cgggtggatg	120	
	aacgatccaa acggcctgat ctggtttaac gatcgttatc acgcgtttta tcaacatcat	180	
	ccgatgagcg aacactgggg gccaatgcac tggggacatg ccaccagcga cgatatgatc	240	

ES 2 635 312 T3

```

cactggcagc atgagcctat tgcgctagcg ccaggagacg ataatgacaa agacgggtgt      300
ttttcaggta gtgctgtcga tgacaatggt gtcctctcac ttatctacac cggacacgtc      360
tggctcgatg gtgcaggtaa tgacgatgca attcgcgaag tacaatgtct ggctaccagt      420
cgggatggta ttcatctcga gaaacagggg gtgatcctca ctccaccaga aggaatcatg      480
cacttccgcg atcctaaagt gtggcgtgaa gccgacacat ggtggatggg agtcggggcg      540
aaagatccag gcaacacggg gcagatcctg ctttatcgcg gcagttcggt gcgtgaatgg      600
accttcgata gcgtactggc ccacgctgat gcgggtgaaa gctatatgtg ggaatgtccg      660
gactttttca gccttggcga tcagcattat ctgatgtttt ccccgagggg aatgaatgcc      720
gagggataca gttaccgaaa tcgctttcaa agtggcgtaa taccggaat gtggctcgca      780
ggacgacttt ttgcacaatc cgggcatttt actgaacttg ataacgggca tgacttttat      840
gcaccacaaa gcttttttagc gaaggatggg cggcgtattg ttatcggtg gatggatatg      900
tggaatcgt caatgccctc aaaacgtgaa ggatgggcag gctgcatgac gctggcgcg      960
gagctatcag agagcaatgg caaacttcta caacgcccgg tacacgaagc tgagtcgtta     1020
cgccagcagc atcaatctgt ctctccccgc acaatcagca ataaatatgt tttgcaggaa     1080
aacgcgaag cagttgagat tcagttgcag tgggcgtgta agaacagtga tgccgaacat     1140
tacggattac agctcggcac tggaatgcgg ctgtatatg ataaccaatc tgagcgactt     1200
gttttggtggc ggtattaccc acacgagaat ttagacgggt accgtagtat tccccctccg     1260
cagcgtgaca cgctcgccct aaggatatat atcgatacat catccgtgga agtatttatt     1320
aacgacgggg aagcgggtgat gagtagtcga atctatccgc agccagaaga acgggaactg     1380
tcgctttatg cctcccacgg agtggctgtg ctgcaacatg gagcactctg gctactgggt     1440
taa                                                                    1443

```

<210> 7
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* (ATCC9637)

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(996)
 <223> cscR

<400> 7

```

atggcttcat taaaggatgt cgcacgcctg gcgggagtg cgatgatgac agtctccccg      60
gtgatgcata atgcagaatc tgtgcgtcct gcaacgcgtg accgcgtatt gcaggcaatc     120
cagaccctga attatgttcc tgatctttcc gcccgtaaga tgcgcgtcga aggacgtaag     180
ccgtcgactc tcgccgtgct ggcgcaggac acggctacca ctctttctc tgttgatatt     240
ctgcttgcca ttgagcaaac cgccagcgag ttcggctgga atagtttttt aatcaatatt     300
ttttctgaag atgacgtgac ccgcgaggca cgtcagctgc ttgccaccg tccggatggc     360
attatctata ctacaatggg gctgcgacat atcacgtgac ctgagtctct gtatgggtgaa     420

```

ES 2 635 312 T3

	aatattgtat tggcgaactg tgtggcggat gaccacagct taccagtta tatccctgat	480
	gattacactg cacaatatga atcaacacag catttgctcg cggcgggcta tcgtcaaccg	540
	ttatgcttct ggctaccgga aagtgcgttg gcaacagggat atcgtcggca gggatttgag	600
	caggcctggc gtgatgctga acgagatctg gctgaggtga aacaatttca catggcaaca	660
	ggatgatgac actacaccga tctcgcaagt ttactcaatg cccacttcaa accgggcaaa	720
	ccagattttg atgttctgat atgtggtaac gatcgccgag cctttgtggc ttatcaggtt	780
	cttctggcga aggggggtacg aatcccgag gatgtcgccg taatgggctt tgataatctg	840
	gttggcgctg ggcattctgtt ttaccgccc ctgaccacaa ttcagcttcc acatgacatt	900
	atcgggcggg aagctgcatt gcatattatt gaaggtcgtg aagggggaag agtgacgcg	960
	atcccttgcc cgtgttgat ccgttggtcc acctga	996
5	<210> 8 <211> 71 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> gen <222> (1)..(71) <223> cebador para el casete de delección de mak	
15	<400> 8 gtgcgtatag gtatcgattt aggcggcacc aaaactgaag tgattgcact gttgcagcat	60
	tacacgtctt g	71
20	<210> 9 <211> 71 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> gen <222> (1)..(71) <223> cebador para el casete de delección de mak	
30	<400> 9 ttactcttgt ggccataacc acgcagcgcc gcgtacgccg ctggaatcac cacttaacgg	60
	ctgacatggg a	71
35	<210> 10 <211> 55 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> gen <222> (1)..(55) <223> cebador para la amplificación de cscB para construir pAcscBAR	
45	<400> 10 cgcgatattt agcatatgcc ggggtaccgca ctagttgaga agtaaaccggc gaagt	55
	<210> 11 <211> 46 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	

ES 2 635 312 T3

	<220>	
	<221> gen	
	<222> (1)..(46)	
5	<223> cebador para la amplificación de cscB para construir pAcscBAR	
	<400> 11	
	attcggccgg agccctgcag gtgcacgagt acatttgagc gactgt	46
10	<210> 12	
	<211> 4520	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i> (ATCC9637)	
15	<220>	
	<221> gen	
	<222> (1)..(4520)	
	<223> polinucleótido que contiene el regulón cscBAR	
20	<400> 12	
	gagccctgca ggtgcacgag tacatttgag cgactgtacc agaacatgaa tgaggcggtt	60
	ggattaggcg attattagca gggctaagca ttttactatt attattttcc ggttgaggga	120
	tatagagcta tcgacaacaa ccggaaaaag ttacgtcta tattgctgaa ggtacaggcg	180
	tttcataac tatttgctcg cgttttttac tcaagaagaa aatgccaaat agcaacatca	240
	ggcagacaat acccgaaatt gcgaagaaaa ctgtctggta gcctgcgtgg tcaaagagta	300
	tccagtcgg cgttgaaagc agcacaatcc caagcgaact ggcaatttga aaaccaatca	360
	gaaagatcgt cgacgacagg cgcttatcaa agtttgccac gctgtatttg aagacggata	420
	tgacacaaag tggaacctca atggcatgta acaacttcac taatgaaata atccaggggt	480
	taacgaacag cgcgcaggaa aggatacgca acgccataat cacaactccg ataagtaatg	540
	catttttttg ccctaccgga ttcacaaaga aaggaataat cgccatgcac agcgcttcga	600
	gtaccacctg gaatgagttg agataaccat acaggcgcggt tcctacatcg tgtgattcga	660
	ataaacctga ataaaagaca ggaaaaagtt gttgatcaaa aatggttatag aaagaccacg	720
	tccccacaat aaatatgacg aaaaccgaga agtttcgatc cttgaaaact gcgataaaat	780
	cctctttttt tacccctccc gcatctgccg ctacgcaactg gtgatcctta tctttaaaac	840
	gcatgttgat catcataaat acagcgccaa atagcgagac caaccagaag ttgatatggg	900
	gactgatact aaaaaatatg ccggcaaaga acgcgccaat agcatagcca aaagatcccc	960
	aggcgcgcg cgtttccatat tcgaaatgaa aatttcgcg ctttttttcg gtgaagctat	1020
	caagcaaaacc gcatcccgcc agataccccc agccaaaaaa cagcgccccc agaattagac	1080
	ctacagaaaa attgctttgc agtaacggtt cataaacgta aatcataaac ggtccgggtca	1140
	agaccaggat gaaactcata caccagatga gcggtttctt cagaccgagt ttatcctgaa	1200
	cgatgccgta gaacatcata aatagaatgc tggtaaaactg gttgaccgaa taaagtgtac	1260
	ctaattccgt ccctgtcaac cctagatgtc ctttcagcca aatagcgtat aacgaccacc	1320

ES 2 635 312 T3

acagcgacca	ggaaataaaa	aagagaaatg	agtaactgga	tgcaaaacga	tagtacgcat	1380
ttctgaatgg	aatactcagt	gccataatta	cctgcctgtc	gttaaaaaat	tcacgtccta	1440
tttagagata	agagcgactt	cgccgtttac	ttctcaacta	gtgcggtacc	cggcataatgc	1500
tagatatcga	ctccctcagt	tagcagcggt	ctttgcatta	acgcaccaa	aggatcatcc	1560
cccacccgac	ctataaaccc	acttgttccg	cctaactctg	cgattcccac	cgcaacgtta	1620
gctggcgcg	cgccaggaca	aggcagtagg	cgcccgctct	attctggcaa	gagatctacg	1680
accgcatccc	ctaaaaccca	tactttgggt	gacatttttt	tcccttaa	tcattctgagt	1740
tacgcatagt	gataaacctc	tttttcgcaa	aatcgtcatg	gatttactaa	aacatgcata	1800
ttcgcataca	aaacgtcata	gttaacgtta	acatttgtga	tattcatcgc	atttatgaaa	1860
gtaagggact	ttatTTTTAT	aaaagttaac	gttaacaatt	caccaaattt	gcttaaccag	1920
gatgattaaa	atgacgcaat	ctcgattgca	tgcggcgcaa	aacgccctag	caaaacttca	1980
tgagcaccgg	ggtaacactt	tctatcccca	ttttcacctc	gcgccctctg	ccgggtggat	2040
gaacgatcca	aacggcctga	tctggtttaa	cgatcggtat	cacgcgtttt	atcaacatca	2100
tccgatgagc	gaacactggg	ggccaatgca	ctggggacat	gccaccagcg	acgatatgat	2160
ccactggcag	catgagccta	ttgcgctagc	gccaggagac	gataatgaca	aagacgggtg	2220
tttttcaggt	agtgtgtctg	atgacaatgg	tgtcctctca	cttatctaca	ccggacacgt	2280
ctggctcgat	ggtgcaggta	atgacgatgc	aattcgcgaa	gtacaatgtc	tggctaccag	2340
tcgggatggt	attcatctcg	agaaacaggg	tgtgatcctc	actccaccag	aaggaatcat	2400
gcacttccgc	gacctaag	tgtggcgtga	agccgacaca	tgggtgatgg	tagtcggggc	2460
gaaagatcca	ggcaacacgg	ggcagatcct	gctttatcgc	ggcagttcgt	tgctggaatg	2520
gaccttcgat	cgcgctactg	cccacgctga	tgcggttgaa	agctatatgt	gggaatgtcc	2580
ggactttttc	agccttggcg	atcagcatta	tctgatgttt	tccccgcagg	gaatgaatgc	2640
cgagggatac	agttaccgaa	atcgctttca	aagtggcgta	ataccggaa	tgtggtcgcc	2700
aggacgactt	tttgacaaat	ccgggcattt	tactgaactt	gataacgggc	atgactttta	2760
tgcaccacaa	agcttttttag	cgaaggatgg	tcggcggtatt	gttatcggct	ggatggatat	2820
gtgggaatcg	tcaatgccct	caaacgtga	aggatgggca	ggctgcatga	cgctggcgcg	2880
cgagctatca	gagagcaatg	gcaaacttct	acaacgccc	gtacacgaag	ctgagtcgtt	2940
acgccagcag	catcaatctg	tctctcccc	cacaatcagc	aataaatatg	ttttgcagga	3000
aaacgcgcaa	gcagttgaga	ttcagttgca	gtgggcgctg	aagaacagtg	atgccgaaca	3060
ttacggatta	cagctcggca	ctggaatgcg	gctgtatatt	gataaccaat	ctgagcgact	3120
tgttttgtgg	cggtattacc	cacacgagaa	tttagacggc	taccgtagta	ttccctccc	3180
gcagcgtgac	acgctcgccc	taaggatatt	tatcgataca	tcattccgtg	aagtatttat	3240
taacgacggg	gaagcgggtga	tgagtagtcg	aatctatccg	cagccagaag	aacgggaact	3300
gtcgctttat	gcctcccacg	gagtggctgt	gctgcaacat	ggagcactct	ggctactggg	3360
ttaacataat	atcaggtgga	acaacggatc	aacagcgggc	aagggatccg	cgtcactctt	3420

ES 2 635 312 T3

```

cccccttcac gaccttcaat aatatgcaat gcagcttccc gcccgataat gtcattgtga 3480
agctgaattg tggtcagcgg cggtaaaaac agatgcccga cgccaaccag attatcaaag 3540
cccattacgg cgacatcctg cgggattcgt acccccttcg ccagaagaac ctgataagcc 3600
acaaaggctg cgcgatcgtt accacatatc agaacatcaa aatctggttt gcccggtttg 3660
aagtgggcat tgagtaaact tgcgagatcg gtgtagtgat catcacctgt tgccatgtga 3720
aattgtttca cctcagccag atctcgttca gcatcacgcc aggcctgctc aaatccctgc 3780
cgacgatacc ctgttgccaa cgacatttcc ggtagccaga agcataacgg ttgacgatag 3840
cccgccgga gcaaatgctg tgttgattca tattgtgcag tgtaatcatc agggatataa 3900
ctgggtaacg ctgggtcatc cgccacacag ttcgccaata caatattttc accatacaga 3960
gactcaggca gcgtgatatg tcgcagcccc attgtagtat agataatgcc atccggacgg 4020
tgggcaagca gctgacgtgc cgcgcgggca gcgtcatctt cagaaaaaat attgattaaa 4080
aaactattcc agccgaactc gctggcgggtt tgctcaatgg caagcagaat atcaacagag 4140
aaaggagtgg tagccgtgtc ctgcgcagc acggcgagag tcgacggctt acgtccttga 4200
gcgcgcatct tacgggcgga aagatcagga acataattca gggctctggat tgctgcaat 4260
acgcggtcac gcgttgacag acgcacagat tctgcattat gcatcacccg ggagactgtc 4320
atcatcgaca ctcccgccag gcgtgcgaca tcctttaatg aagccatacc caagccgttt 4380
gccgtaaac gggcactgta gcagaaacag acgtcactgg cgagatccaa cgccctatca 4440
cctgacacag caatacaata aaaaataaca ataattcccc gacaattgtc ccagttccg 4500
cctctgttct cgccaacgag 4520

```

<210> 13
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(13)
 <223> cebador para la amplificación de mak liberado de la secuencia de referencia, AP009048 en GeneBank

<400> 13
 cactgcagtg gggtaaatgc catcg 25

<210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(14)
 <223> cebador para la amplificación de mak liberado de la secuencia de referencia, AP009048 en GeneBank

<400> 14
 aacggccgctc tcggtgctca ttact 25

<210> 15
 <211> 1388
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* K12 W3110

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1388)

<223> polinucleótido que contiene el regulón mak, amplificado utilizando la secuencia número 13 and 14

<400> 15

5

```
cactgcagtg gggtaaattgc catcgaggct agctgttttt ccatctcttc tgcacgcagc      60
gaaatctcgc ggctaagacg gtaaaccatt aaattttttga accacagcat gataatttcc      120
acggccttgt cgttaaattt agcgggcatg ataacgaatt gtcggcggcc ttgcattgcc      180
aatccggttg tccgtctcta cgctattgat attgaaaaaa ataaggagag taccgtgcgt      240
ataggatcgc atttaggcgg caccaaaact gaagtgattg cactgggcga tgcaggggag      300
cagttgtacc gccatcgtct gccacgcccg cgtgatgatt accggcagac tattgaaacg      360
atcgccacgt tgggtgatat ggcggagcag gcgacggggc agcgcggaac ggtaggtatg      420
ggcattcctg gctcaatttc gccttacacc ggtgtggtga agaatgcaa ttcaacctgg      480
ctcaacggtc agccattcga taaagactta agcgcgaggt tgcagcggga agtgcggctg      540
gcaaatgacg ctaactgtct ggcggtttca gaagcagtag atggcgcggc agcgggagcg      600
cagacgggat ttgccgtgat tatcggcacg ggatgcggcg cgggcgtggc attcaatggg      660
cgggcgcata tcggcggcaa tggcacggca ggtgagtggg gacacaatcc gctaccgtgg      720
atggacgaag acgaactgcg ttatcgcgag gaagtccctt gttattgcgg taaacaaggt      780
tgtattgaaa cctttatttc gggcacggga ttcgcgatgg attatcgtcg tttgagcggg      840
catgcgctga aaggcagtg aattatccgc ctggttgaag aaagcgatcc ggtagcggaa      900
ctggcattgc gtcgctacga gctgcggctg gcaaaatcgc tggcacatgt cgtgaatatt      960
ctcgatccgg atgtgattgt cctggggggc gggatgagca atgtagaccg tttatatcaa     1020
acggttgggc agttgattaa acaatttgtc ttcggcgggc aatgtgaaac gccggtgcgt     1080
aaggcgaagc acggtgattc cagcggcgta cgcggcgctg cgtggttatg gccacaagag     1140
taaaaaacgt aggcaattgg cgcacatcgc ctgatgcgac gcttgccgcg tcttatcagg     1200
cctacaaaag gtgccagaac cgtaggccgg ataaggcggt cacgccgcat ccggcaataa     1260
gtgctccgat gcctgatgcg acgcttgccg cgtcttatca ggcctgcaaa atgtgccaga     1320
accgcgtagg gcggataagg cgttcacgcc gcatccggca ataagtaatg agcaccgaga     1380
cggccggtt
```

<210> 16

<211> 5887

10

<212> ADN

<213> *Escherichia coli* (ATCC9637) y K12 W3110

<220>

<221> gen

15

<222> (1)..(5887)

<223> polinucleótido que contiene el regulón cscBAR-mak

<400> 16

ES 2 635 312 T3

tctcgggtgct cattaacttat tgccggatgc ggcgtgaacg ccttatccgc cctacgcggt	60
tctggcacat tttgcaggcc tgataagacg cggcaagcgt cgcacagggc atcggagcac	120
ttattgccgg atggggcgtg aacgccttat cgggcctacg gttctggcac cttttgtagg	180
cctgataaga cgcggcaagc gtcgcatcag gcatgatgcg ccaattgcct acgtttttta	240
ctcttgtagc cataaccacg cagcgccgctg tacgcccgtg gaatcacctg gcttcgcctt	300
acgcaccggc gtttcacatt cgccgccgaa gacaaattgt ttaatcaact gcccacccgt	360
ttgatataaa cgggtctacat tgctcatccc gccccccagg acaatcacat ccggatcgag	420
aatattcacg acatgtgcca gcgattttgc cagccgcagc tcgtagcgac gcaatgccag	480
ttccgctacc ggatcgcttt cttcaaccag gcggataatt tcaactgcctt tcagcgcatg	540
tccgctcaaa cgacgataat ccatcgcgaa tcccgtgccc gaaataaagg tttcaataca	600
accttgttta ccgcaataac aagggacttc ctgcgcgataa cgcagttcgt cttcgtccat	660
ccacggtagc ggattgtgtc cccactcacc tgccgtgcca ttgccgccga tatgcgcccg	720
cccattgaat gccacgcccc cgccgcaccc cgtgccgata atcacggcaa ataccgtctg	780
cgctcccgtc gccgcgccat ctactgcttc tgaaaccgcc agacagttag cgtcatttgc	840
cagccgcact tcccgtgca acctcgcgct taagtcttta tcgaatggct gaccgttgag	900
ccaggttgaa ttggcattct tcaccacacc ggtgtaaggc gaaattgagc caggaatgcc	960
catacctacc gttccgcgct gccccgtcgc ctgctccgcc atatcaacca acgtggcgat	1020
cgtttcaata gtctgccggt aatcatcacg cggcgtgggc agacgatggc ggtacaactg	1080
ctcccctgca tcgcccagtg caatcacttc agttttggtg ccgcctaaat cgatacctat	1140
acgcacggta ctctccttat ttttttcaat atcaatagcg tagagacgga caaccggatt	1200
ggcaatgcaa ggccgccgac aattcggtat catgcccgct aaatttaacg acaaggccgt	1260
ggaaattatc atgctgtggt tcaaaaattt aatggtttac cgtcttagcc gcgagatttc	1320
gctgcgtgca gaagagatgg aaaaacagct agcctcgatg gcatttacct cactgcaggt	1380
gcacgagtac atttgagcga ctgtaccaga acatgaatga ggcgtttgga ttaggcgatt	1440
attagcaggg ctaagcattt tactattatt attttccggt tgagggatat agagctatcg	1500
acaacaaccg gaaaaagttt acgtctatat tgctgaaggc acaggcggtt ccataactat	1560
ttgctcgcgt tttttactca agaagaaaat gccaaatagc aacatcaggc agacaatacc	1620
cgaatttgcg aagaaaactg tctggtagcc tgcgtggtca aagagtatcc cagtcggcgt	1680
tgaaagcagc acaatcccaa gcgaactggc aatttgaaaa ccaatcagaa agatcgctga	1740
cgacaggcgc ttatcaaagt ttgccacgct gtatttgaag acggatatga cacaaagtgg	1800
aacctcaatg gcatgtaaca acttcactaa tgaaataatc caggggttaa cgaacagcgc	1860
gcaggaaagg atacgcaacg ccataatcac aactccgata agtaatgcat tttttgccc	1920

tacccgattc	acaaagaaag	gaataatcgc	catgcacagc	gcttcgagta	ccacctggaa	1980
tgagttgaga	taaccataca	ggcgcgttcc	tacatcgtgt	gattcgaata	aacctgaata	2040
aaagacagga	aaaagttggt	gatcaaaaat	gttatagaaa	gaccacgtcc	ccacaataaa	2100
tatgacgaaa	accagaagt	ttcgatcctt	gaaaactgcg	ataaaatcct	ctttttttac	2160
ccctcccgcg	tctgccgcta	cgcactgggtg	atccttatct	ttaaaacgca	tgttgatcat	2220
cataaataca	gcgccaaata	gcgagaccaa	ccagaagttg	atatggggac	tgatactaaa	2280
aaatatgccg	gcaaagaacg	cgccaatagc	atagccaaaa	gatccccagg	cgcgcgctgt	2340
tccatattcg	aaatgaaaat	ttcgcgccat	tttttcgggtg	aagctatcaa	gcaaaccgca	2400
tcccgccaga	tacccccagc	caaaaaacag	cgcgccccaga	attagacctt	cagaaaaatt	2460
gctttgcagt	aacggttcat	aaacgtaaata	cataaacggt	ccggtcaaga	ccaggatgaa	2520
actcatacac	cagatgagcg	gtttcttcag	accgagttta	tcctgaacga	tgccgtagaa	2580
catcataaat	agaatgctgg	taaactgggt	gaccgaataa	agtgtacctt	attccgtccc	2640
tgtcaaccct	agatgtcctt	tcagccaaat	agcgtataac	gaccaccaca	gcgaccagga	2700
aataaaaaag	agaaatgagt	aactggatgc	aaaacgatag	tacgcatttc	tgaatggaat	2760
actcagtgcc	ataattacct	gcctgtcggt	aaaaaattca	cgctctatct	agagataaga	2820
gcgacttcgc	cgtttacttc	tcaactagt	cggtacccgg	catatgctag	atctcgactc	2880
cctcagttag	cagcgttctt	tgcattaacg	caccaaagg	atcatcccc	acccgacctt	2940
taaaccact	tgttcgcct	aatctggcga	ttcccaccgc	aacgttagct	ggcgcgccgc	3000
caggacaagg	cagtaggcgc	ccgtctgatt	ctggcaagag	atctacgacc	gcacccccctt	3060
aaaccatac	tttggttgac	atttttttcc	cttaaattca	tctgagttac	gcatagtgat	3120
aaacctcttt	ttcgcaaaat	cgatcatgat	ttactaaaac	atgcatattc	gatcacaaaa	3180
cgatcatagt	aacgttaaca	tttgtgat	tcacgcatt	tatgaaagta	agggacttta	3240
tttttataaa	agttaacgtt	aacaattcac	caaatttgct	taaccaggat	gattaaaatg	3300
acgcaatctc	gattgcatgc	ggcgcaaaac	gccctagcaa	aacttcatga	gcaccgggggt	3360
aacactttct	atccccattt	tcacctcgcg	cctctgccg	ggtggatgaa	cgatccaaac	3420
ggcctgatct	ggtttaacga	tcgttatcac	gcgttttatc	aacatcatcc	gatgagcgaa	3480
cactgggggc	caatgcactg	gggacatgcc	accagcgacg	atatgatcca	ctggcagcat	3540
gagcctattg	cgtagcgcc	aggagacgat	aatgacaaag	acgggtgttt	ttcaggtagt	3600
gctgtcgatg	acaatggtgt	cctctcactt	atctacaccg	gacacgtctg	gctcgatggt	3660
gcaggtaatg	acgatgcaat	tcgcgaagta	caatgtctgg	ctaccagtcg	ggatggtatt	3720
catctcgaga	aacaggggtg	gatcctcact	ccaccagaag	gaatcatgca	cttcgcgcat	3780
cctaaagtgt	ggcgtgaagc	cgacacatgg	tggtatggtg	tcggggcgaa	agatccaggc	3840
aacacggggc	agatcctgct	ttatcgcggc	agttcgttgc	gtgaatggac	cttcgatcgc	3900
gtactggccc	acgctgatgc	gggtgaaagc	tatatgtggg	aatgtccgga	ctttttcagc	3960
cttggcgatc	agcattatct	gatgttttcc	ccgcagggaa	tgaatgccga	gggatacagt	4020

ES 2 635 312 T3

```
taccgaaatc gctttcaaag tggcgtaata cccggaatgt ggtcgccagg acgacttttt 4080
gcacaatccg ggcattttac tgaacttgat aacgggcatg acttttatgc accacaaagc 4140
tttttagcga aggatggtcg gcgtattgtt atcggctgga tggatatgtg ggaatcgtca 4200
atgccctcaa aacgtgaagg atgggcaggc tgcagacgc tggcgcgga gctatcagag 4260
agcaatggca aactttctaca acgcccggta cacgaagctg agtcgttacg ccagcagcat 4320
caatctgtct ctccccgcac aatcagcaat aaatatgttt tgcaggaaaa cgcgcaagca 4380
gttgagattc agttgcagtg ggcgctgaag aacagtgatg ccgaacatta cggattacag 4440
ctcggcactg gaatgcggct gtatatgat aaccaatctg agcgacttgt tttgtggcgg 4500
tattaccac acgagaattt agacggctac cgtagtattt cctccccga gcgtgacacg 4560
ctcgccctaa ggatatttat cgatacatca tccgtggaag tatttattaa cgacggggaa 4620
gcggtgatga gtagtcgaat ctatccgag ccagaagaac gggaaactgtc gctttatgcc 4680
tcccacggag tggctgtgct gcaacatgga gcactctggc tactgggtta acataatata 4740
aggtggaaca acggatcaac agcgggcaag ggatccgcgt cactcttccc ccttcacgac 4800
cttcaataat atgcaatgca gcttccccgc cgataatgtc atgtggaagc tgaattgtgg 4860
tcagcggcgg taaaaacaga tgcccgacgc caaccagatt atcaaagccc attacggcga 4920
catcctgcgg gattcgtacc ccttctgcca gaagaacctg ataagccaca aaggctgcgc 4980
gatcgttacc acatatcaga acatcaaaat ctggtttgcc cggtttgaag tgggcattga 5040
gtaaacttgc gagatcggtg tagtgatcat cacctgttgc catgtgaaat tgtttcacct 5100
cagccagatc tcgttcagca tcacgccagg cctgtcaaaa tccctgccga cgataccctg 5160
ttgccaacgc actttccggt agccagaagc ataacggttg acgatagccc gccgcgagca 5220
aatgctgtgt tgattcatat tgtgcagtg aatcatcagg gatataactg ggtaacgctg 5280
ggtcacccgc cacacagttc gccaatacaa ttttttcacc atacagagac tcaggcagcg 5340
tgatatgtcg cagccccatt gtagtataga taatgccatc cggacggtgg gcaagcagct 5400
gacgtgccgc gcgggcagcg tcattctcag aaaaaatatt gattaaaaaa ctattccagc 5460
cgaactcgtc ggcggtttgc tcaatggcaa gcagaatata aacagagaaa ggagtggtag 5520
ccgtgtcctg cgccagcacg gcgagagtcg acggcttacg tccttgagcg cgcattctac 5580
gggcggaag atcaggaaca taattcaggg tctggattgc ctgcaatacg cggtcacgcg 5640
ttgcaggacg cacagattct gcattatgca tcacccggga gactgtcatc atcgacactc 5700
ccgccaggcg tgcgacatcc tttaatgaag ccatacccaa gccgtttgcc gtaaaacggg 5760
cactgtagca gaaacagacg tcaactggcg gatccaacgc cctatcacct gacacagcaa 5820
tacaataaaa aataacaata attccccgac aattgtcccc agttccgcct ctgttctcgc 5880
caacgag 5887
```

<210> 17
 <211> 996
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* (ATCC9637)

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(996)
 <223> cscR con tirosina mutada en la posición de aminoácido 388

<400> 17

ES 2 635 312 T3

```

atggcttcat taaaggatgt cgcacgcctg gcgggagtgat cgatgatgac agtctcccgg      60
gtgatgcata atgcagaatc tgtgcgtcct gcaacgcgtg accgcgtatt gcaggcaatc      120
cagaccctga attatgttcc tgatctttcc gcccgtaaga tgcgcgctca aggacgtaag      180
ccgtcgactc tcgccgtgct ggccgaggac acggctacca ctcctttctc tgttgatatt      240
ctgcttgcca ttgagcaaac cgccagcgag ttccggctgga atagtttttt aatcaatatt      300
ttttctgaag atgacgctgc ccgcgcggca cgtcagctgc ttgccaccg tccggatggc      360
attatctata ctacaatggg gctgcgatat atcacgctgc ctgagtctct gtatggtgaa      420
aatattgtat tggcgaactg tgtggcggat gaccagcgt taccagtta tatccctgat      480
gattacactg cacaatatga atcaacacag catttgctcg cggcgggcta tcgtcaaccg      540
ttatgcttct ggctaccgga aagtgcgttg gcaacagggt atcgtcggca gggatttgag      600
caggcctggc gtgatgctga acgagatctg gctgagtgga aacaatttca catggcaaca      660
ggatgatgatc actacaccga tctcgcaagt ttactcaatg cccacttcaa accgggcaaa      720
ccagattttg atgttctgat atgtggtaac gatcgcgcag ctttgtggc ttatcaggtt      780
cttctggcga aggggggtacg aatcccgag gatgtcgccg taatgggctt tgataatctg      840
gttggcgctg ggcattctgt tttaccgccg ctgaccacaa ttcagcttcc acatgacatt      900
atcgggcggg aagctgcatt gcatattatt gaaggtcgtg aagggggaag agtgacgcgg      960
atcccttgcc cgctgttgat ccgttggtcc acctga      996

```

5 <210> 18
 <211> 9129
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli* (ATCC9637) y K12 W3110

10 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(9129)
 <223> pAcscBAR'-mak

15 <400> 18

```

tatggcaatg aaagacggtg agctggtgat atgggatagt gttcaccctt gttacaccgt      60
tttccatgag caaactgaaa cgttttcatc gctctggagt gaataccacg acgatttccg      120
gcagtttcta cacatatatt cgcaagatgt ggcgtgttac ggtgaaaacc tggcctatatt      180
ccctaaaggg ttatttgaga atatgttttt cgtctcagcc aatccctggg tgagtttcac      240
cagttttgat ttaaactgtg ccaatatgga caacttcttc gcccccggtt tcaccatggg      300
caaatatatt acgcaaggcg acaagggtgct gatgccgctg gcgattcagg ttcacatgac      360
cgtctgtgat ggcttccatg tcggcagaat gcttaatgaa ttacaacagt actgcgatga      420
gtggcagggc ggggcgtaat ttttttaagg cagttattgg tgcccttaaa cgcctggtgc      480

```

tacgcctgaa taagtataa taagcggatg aatggcagaa attcgaaaagc aaattcgacc	540
cggtcgtcgg ttccagggcag ggtcgttaaa tagccgctta tgtctattgc tggttttaccg	600
gtttattgac taccggaagc agtgtgaccg tgtgcttctc aaatgcctga ggccagtttg	660
ctcaggctct ccccggtggag gtaataattg acgatatgat catttattct gcctcccaga	720
gcctgataaa aacgggttagc gcttcgttaa tacagatgta ggtgttccac agggtagcca	780
gcagcatcct gcgatgcaga tccggaacat aatggtgcag ggcgcttggt tcggcggtggg	840
tatggtggca gggcccggtg ccgggggact gttgggcgct gccggcacct gtcctacgag	900
ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc ggcgacgata gtcattgcccc gcgcccaccg	960
gaaggagcta ccggacagcg gtgcggactg ttgtaactca gaataagaaa tgaggccgct	1020
catggcggtg actctcagtc atagtatcgt ggtatcacccg gttggttcca ctctctgttg	1080
cgggcaactt cagcagcacg taggggactt ccgcgtttcc agactttacg aaacacggaa	1140
accgaagacc attcatgttg ttgctcaggt cgcagacggt ttgcagcagc agtcgcttca	1200
cgttcgctcg cgtatcgggtg attcattctg ctaaccagta aggcaacccc gccagcctag	1260
ccgggtcctc aacgacagga gcacgatcat gcgcacccgt ggccaggacc caacgctgcc	1320
cgagatgcgc cgcgtgcggc tgcgtggagat ggcgacgcgc atggatatgt tctgccaaag	1380
gttggttttg gcattcacag ttctccgcaa gaattgattg gctccaattc ttggagtggg	1440
gaatccgtta gcgaggtgcc gccggcttcc attcagggtcg aggtggcccc gctccatgca	1500
ccgcgacgca acgcggggag gcagacaagg tataggcgcg cgcctacaat ccatgccaac	1560
ccgttccatg tgctcgccga ggccgcataa atcgccgtga cgatcagcgg tccagtgatc	1620
gaagttaggc tggtaagagc gcgagcgcgt ccttgaagct gtccctgatg gtcgtcatct	1680
acctgcctgg acagcatggc ctgcaacgcg ggcatcccga tgccgccgga agcgagaaga	1740
atcataatgg ggaaggccat ccagcctcgc gtcgcgaacg ccagcaagac gtagccagc	1800
gcgtcgcccg tctcgggtgct cattaattat tgccggatgc ggctggaacg ctttatccgc	1860
cctacgcggt tctggcacat tttgcaggcc tgataagacg cggcaagcgt cgcacaggc	1920
atcgagcac ttattgccgg atgcggcggtg aacgccttat ccggcctacg gttctggcac	1980
cttttgtagg cctgataaga gcgggcaagc gtcgcatcag gcatgatgcg ccaattgcct	2040
acgtttttta ctcttggtggc cataaccacg cagcgccgcg tacgccgctg gaatcacctg	2100
gcttcgcctt acgcaccggc gtttcacatt cgcggccgaa gacaaattgt ttaatcaact	2160
gcccacccgt ttgatataaa cgggtctacat tgcctatccc gccccccagg acaatcacat	2220
ccggatcgag aatattcacg acatgtgcca gcgattttgc cagccgcagc tcgtagcgac	2280
gcaatgccag ttccgctacc ggatcgcttt cttcaaccag gcggataatt tcaactgcctt	2340
tcagcgcagc tccgctcaaa cgacgataat ccacgcgaa tcccgtgccc gaaataaagg	2400
tttcaataca accttggtta ccgcaataac aagggaactc ctgcgataa cgcagttcgt	2460
cttcgtccat ccacggtagc ggattgtgtc cccactcacc tgccgtgcca ttgccgccga	2520
tatgcgcccc cccattgaat gccacgcccc cgcgcacatc cgtgccgata atcacggcaa	2580

ataccgtctg	cgctcccgt	gccgcgccat	ctactgcttc	tgaaaccgcc	agacagttag	2640
cgtcatttgc	cagccgcact	tcccgtgca	acctcgcgct	taagtcttta	tcgaatggct	2700
gaccgttgag	ccaggttgaa	ttggcattct	tcaccacacc	ggtgtaaggc	gaaattgagc	2760
caggaatgcc	catacctacc	gttccgcgct	gccccgtcgc	ctgctccgcc	atatcaacca	2820
acgtggcgat	cgtttcaata	gtctgccggt	aatcatcacg	cggcgtgggc	agacgatggc	2880
ggtacaactg	ctcccctgca	tcgccagtg	caatcacttc	agttttggtg	ccgcctaaat	2940
cgatacctat	acgcacggta	ctctccttat	ttttttcaat	atcaatagcg	tagagacgga	3000
caaccggatt	ggcaatgcaa	ggccgccgac	aattcgttat	catgcccgct	aaatttaacg	3060
acaaggccgt	ggaaattatc	atgctgtggt	tcaaaaattt	aatggtttac	cgtcttagcc	3120
gcgagatttc	gctgcgtgca	gaagagatgg	aaaaacagct	agcctcgatg	gcattttacc	3180
cactgcagggt	gcacgagtac	atttgagcga	ctgtaccaga	acatgaatga	ggcgtttgga	3240
ttaggcgatt	attagcaggg	ctaagcattt	tactattatt	attttccggt	tgagggatat	3300
agagctatcg	acaacaaccg	gaaaaagttt	acgtctatat	tgctgaagggt	acaggcggtt	3360
ccataactat	ttgctcgcgt	tttttactca	agaagaaaat	gccaaatagc	aacatcaggg	3420
agacaatacc	cgaaattgcg	aagaaaactg	tctggtagcc	tgctgggtca	aagagtatcc	3480
cagtcggcgt	tgaaagcagc	acaatcccaa	gcgaactggc	aatttgaaaa	ccaatcagaa	3540
agatcgctga	cgacaggcgc	ttatcaaagt	ttgccacgct	gtatttgaag	acggatatga	3600
cacaaagtgg	aacctcaatg	gcatgtaaca	acttcactaa	tgaaataatc	caggggttaa	3660
cgaacagcgc	gcaggaaagg	atacgcaacg	ccataatcac	aactccgata	agtaatgcat	3720
tttttgcccc	taccgatttc	acaaagaaag	gaataatcgc	catgcacagc	gcttcgagta	3780
ccacctggaa	tgagttgaga	taaccataca	ggcgcgttcc	tacatcggtg	gattcgaata	3840
aacctgaata	aaagacagga	aaaagtgtgt	gatcaaaaat	gttatagaaa	gaccacgtcc	3900
ccacaataaa	tatgacgaaa	acccagaagt	ttcgatcctt	gaaaactgcg	ataaaatcct	3960
ctttttttac	ccctcccgcg	tctgccgcta	cgcactgggtg	atccttatct	ttaaaacgca	4020
tgttgatcat	cataaatata	gcgccaataa	gcgagaccaa	ccagaagttg	atatggggac	4080
tgatactaaa	aaatatgccg	gcaaagaacg	cgccaatagc	atagccaaaa	gatccccagg	4140
cgcgcgctgt	tccatattcg	aaatgaaaat	ttcgcgccat	tttttcggtg	aagctatcaa	4200
gcaaaccgca	tcccgccaga	tacccccagc	caaaaaacag	cgccccccaga	attagacctt	4260
cagaaaaatt	gctttgcagt	aacggttcat	aaacgtaa	ataaacgggt	ccggtcaaga	4320
ccaggatgaa	actcatacac	cagatgagcg	gtttcttcag	accgagttta	tcctgaacga	4380
tgccgtagaa	catcataaat	agaatgctgg	taaactgggt	gaccgaataa	agtgtacctt	4440
attccgtccc	tgtcaaccct	agatgtcctt	tcagccaaat	agcgtataac	gaccaccaca	4500
gcgaccagga	aataaaaaag	agaaatgagt	aactggatgc	aaaacgatag	tacgcatttc	4560
tgaatggaat	actcagtgcc	ataattacct	gcctgtcggt	aaaaaattca	cgtcctatct	4620
agagataaga	gcgacttcgc	cgtttacttc	tcaactagtg	cggtaaccgg	catatgctag	4680

ES 2 635 312 T3

atatacgactc	cctcagtttag	cagcggttctt	tgcattaacg	cacaaaaagg	atcatccccc	4740
acccgaccta	taaaccact	tgttcgcct	aatctggcga	ttcccaccgc	aacgttagct	4800
ggcgcgccgc	caggacaagg	cagtaggcgc	ccgtctgatt	ctggcaagag	atctacgacc	4860
gcatcccccta	aaaccatac	tttggctgac	atTTTTTTcc	cttaaattca	tctgagttac	4920
gcatagtgat	aaacctctt	ttcgcaaaat	cgatcatggat	ttactaaaac	atgcatattc	4980
gatacaaaa	cgatcatagtt	aacgttaaca	tttgtgatat	tcatacgatt	tatgaaagta	5040
agggacttta	TTTTTataaa	agttaacgtt	aacaattcac	caaatttgct	taaccaggat	5100
gattaaaaatg	acgcaatctc	gattgcatgc	ggcgcaaaac	gccctagcaa	aacttcatga	5160
gcaccgggggt	aacactttct	atccccattt	tcacctgcgc	cctcctgccg	ggtggatgaa	5220
cgatccaaac	ggcctgatct	ggtttaacga	tcgttatcac	gcgttttatc	aacatcatcc	5280
gatgagcgaa	cactgggggc	caatgcactg	gggacatgcc	accagcgacg	atatgatcca	5340
ctggcagcat	gagcctattg	cgctagcgcc	aggagacgat	aatgacaaag	acgggtgttt	5400
ttcaggtagt	gctgtcgatg	acaatggtgt	cctctcactt	atctacaccg	gacacgtctg	5460
gctcgatggt	gcaggtaatg	acgatgcaat	tcgcgaagta	caatgtctgg	ctaccagtcg	5520
ggatggtatt	catctcgaga	aacagggtgt	gacccact	ccaccagaag	gaatcatgca	5580
cttcgcgat	cctaaagtgt	ggcgtgaagc	cgacacatgg	tggatggtag	tcggggcgaa	5640
agatccaggc	aacacggggc	agatcctgct	ttatcgcggc	agttcgttgc	gtgaatggac	5700
cttcgatcgc	gtactggccc	acgctgatgc	gggtgaaagc	tatatgtggg	aatgtccgga	5760
ctttttcagc	cttggcgatc	agcattatct	gatgttttcc	ccgcaggga	tgaatgccga	5820
gggatacagt	taccgaaatc	gctttcaaag	tggcgtaata	cccggaatgt	ggtcgccagg	5880
acgacttttt	gcacaatccg	ggcattttac	tgaacttgat	aacgggcatg	acttttatgc	5940
accacaaagc	TTTTtagcga	aggatggtcg	gcgtattgtt	atcggctgga	tggatatgtg	6000
ggaatcgta	atgccctcaa	aacgtgaagg	atgggcaggc	tgcatacgac	tggcgcgcgga	6060
gctatcagag	agcaatggca	aacttctaca	acgcccggta	cacgaagctg	agtcgttacg	6120
ccagcagcat	caatctgtct	ctccccgcac	aatcagcaat	aaatatgttt	tgcaggaaaa	6180
cgcgcaagca	gttgagattc	agttgcagtg	ggcgctgaag	aacagtgatg	ccgaacatta	6240
cggattacag	ctcggcactg	gaatgcggct	gtatattgat	aaccaatctg	agcgacttgt	6300
tttgtggcgg	tattaccac	acgagaattt	agacggctac	cgtagtattc	ccctcccgca	6360
gcgtgacacg	ctcgccctaa	ggatatttat	cgatacatca	tccgtggaag	tatttattaa	6420
cgacggggaa	gcgggtgatga	gtagtcgaat	ctatccgcag	ccagaagaac	gggaactgtc	6480
gctttatgcc	tcccacggag	tggctgtgct	gcaacatgga	gcactctggc	tactgggtta	6540
acataatatc	agggtggaaca	acggatcaac	agcgggcaag	ggatccgcgt	cactcttccc	6600
ccttcacgac	cttcaataat	atgcaatgca	gcttcccgcc	cgataatgtc	atgtggaagc	6660
tgaattgtgg	tcagcgggcg	taaaaacaga	tgcccgacgc	caaccagatt	atcaaagccc	6720
attacggcga	catcctgcgg	gattcgtacc	cccttcgcca	gaagaacctg	ataagccaca	6780

ES 2 635 312 T3

aaggctgctg	gatcggtacc	acatatcaga	acatcaaaat	ctgggtttgcc	cggtttgaag	6840
tgggcattga	gtaaacttgc	gagatcggtg	tagtgatcat	cacctgttgc	catgtgaaat	6900
tgtttcacct	cagccagatc	tcgttcagca	tcacgccagg	cctgctcaaa	tccctgccga	6960
cgataccctg	ttgccaacgc	actttccggt	agccagaagc	ataacggttg	acgatagccc	7020
gccgcgagca	aatgctgtgt	tgattcatat	tgtgcagtgt	aatcatcagg	gatataactg	7080
ggtaacgctg	ggatcatccg	cacacagttc	gccaatacaa	tattttcacc	atacagagac	7140
tcaggcagcg	tgatatatcg	cagccccatt	gtagtataga	taatgccatc	cggacggtgg	7200
gcaagcagct	gacgtgccgc	gcgggcagcg	tcattcttcag	aaaaaatatt	gattaaaaaa	7260
ctattccagc	cgaactcgct	ggcgggtttg	tcaatggcaa	gcagaatatc	aacagagaaa	7320
ggagtggtag	ccgtgtcctg	cgccagcacg	gcgagagtcg	acggcttacg	tccttgagcg	7380
cgcattctac	gggcggaaaag	atcaggaaca	taattcaggg	tctggattgc	ctgcaatacg	7440
cggtcacgcg	ttgcaggacg	cacagattct	gcattatgca	tcacccggga	gactgtcatc	7500
atcgacactc	ccgccaggcg	tgcgacatcc	tttaatgaag	ccatacccaa	gccgtttgcc	7560
gtaaaacggg	cactgtagca	gaaacagacg	tcactggcga	gatccaacgc	cctatcacct	7620
gacacagcaa	tacaataaaa	aataacaata	attccccgac	aattgtcccc	agttccgcct	7680
ctgtttctgc	caacgagtct	agaaatattt	tatctgatta	ataagatgat	cttcttgaga	7740
tcgttttggg	ctgcgcgtaa	tctcttgctc	tgaaaacgaa	aaaaccgcct	tgacgggcgg	7800
tttttcgaag	gttctctgag	ctaccaactc	tttgaaccga	ggtaactggc	ttggaggagc	7860
gcagtcacca	aaacttgtcc	tttcagttta	gccttaaccg	gcgcatgact	tcaagactaa	7920
ctcctctaaa	tcaattacca	gtggctgctg	ccagtgggtg	ttttgcatgt	ctttccgggt	7980
tggactcaag	acgatagtta	ccggataagg	cgacgcgggc	ggactgaacg	gggggttcgt	8040
gcatacagtc	cagcttggag	cgaactgcct	acccggaact	gagtgtcagg	cgtggaatga	8100
gacaaacgcg	gccataacag	cggaatgaca	ccggtaaacc	gaaaggcagg	aacaggagag	8160
cgcacgaggg	agccgccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	atagtcctgt	cgggtttcgc	8220
caccactgat	ttgagcgtca	gatttcgtga	tgcttgtcag	gggggcggag	cctatggaaa	8280
aacggctttg	ccgcggccct	ctcacttccc	tggttaagtat	cttcctggca	tcttccagga	8340
aatctccgcc	ccgttcgtaa	gccatttccg	ctcgccgcag	tcgaacgacc	gagcgtagcg	8400
agtcagttag	cgaggaagcg	gaatatatcc	tgtatcacat	attctgctga	cgcaccggtg	8460
cagccttttt	tctcctgcca	catgaagcac	ttcactgaca	ccctcatcag	tgccaacata	8520
gtaagccagt	atacactccg	ctagcgtgta	tgtccggcgg	tgcttttgcc	gttacgcacc	8580
accccgctcag	tagctgaaca	ggagggacag	ctgatagaaa	cagaagccac	tgagacacct	8640
caaaaacacc	atcatacact	aaatcagtaa	gttggcagca	tcacccgacg	cactttgcgc	8700
cgaataaata	cctgtgacgg	aagatcactt	cgcagaataa	ataaatcctg	gtgtccctgt	8760
tgataccggg	aagccctggg	ccaacttttg	gcgaaaatga	gacgttgatc	ggcacgtaag	8820
aggttccaac	tttcaccata	atgaaataag	atcactaccg	ggcgtatttt	ttgagttatc	8880

ES 2 635 312 T3

gagatTTTca ggagctaagg aagctaaaat ggagaaaaaa atcactggat ataccaccgt	8940
tgatatatcc caatggcatc gtaaagaaca ttttgaggca tttcagtcag ttgctcaatg	9000
tacctataac cagaccgttc agctggatat tacggccttt ttaaagaccg taaagaaaaa	9060
taagcacaag ttttatccgg cttttattca cattcttgcc cgctgatga atgctcatcc	9120
ggaattccg	9129

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo que pertenece al género *Escherichia* con productividad de L-aminoácidos y capacidad de asimilar sacarosa mejoradas, que tiene las actividades de sacarosa permeasa, sacarosa hidrolasa y regulador transcripcional de sacarosa y tiene una actividad manquinasa potenciada en comparación con un microorganismo que no asimila sacarosa que pertenece al género *Escherichia*.
- 10 2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad manquinasa potenciada se consigue por uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en un aumento del número de copias del gen manquinasa, reemplazo de promotor, mutación de promotor y mutación génica.
- 15 3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el aumento del número de copias del gen manquinasa se consigue insertando un polinucleótido que codifica manquinasa en un cromosoma o introduciendo el polinucleótido en un sistema de vector.
- 20 4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el vector contiene una secuencia de bases de SEQ ID NO. 15.
- 25 5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las actividades de sacarosa permeasa, sacarosa hidrolasa y regulador transcripcional de sacarosa se imparten por transformación con un vector que contiene secuencias de bases que codifican sacarosa permeasa, sacarosa hidrolasa y regulador transcripcional de sacarosa.
6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que las secuencias de bases son secuencias de bases de SEQ ID NO. 4, 6 y 7.
- 30 7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el regulador transcripcional de sacarosa se codifica mediante una secuencia de bases de SEQ ID NO. 17.
8. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que para realizar la transformación se utiliza un vector que contiene todas las secuencias de bases que codifican sacarosa permeasa, sacarosa hidrolasa, regulador transcripcional de sacarosa y manquinasa.
- 35 9. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el vector se codifica mediante una secuencia de bases de SEQ ID NO. 18.
- 40 10. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo que pertenece al género *Escherichia* es *E. coli*.
11. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que *E. coli* es *E. coli* CA03-0308 con el número de depósito: KCCM10978P.
- 45 12. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-treonina, O-succinil-homoserina, O-acetil-homoserina, L-metionina, L-lisina, L-homoserina, L-isoleucina, L-valina y L-triptófano.
- 50 13. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-treonina, O-succinil-homoserina, O-acetil-homoserina y L-triptófano.
- 55 14. Un método para producir un L-aminoácido, que comprende las etapas de:
 inocular y cultivar el microorganismo *Escherichia*, que tiene la productividad de L-aminoácidos y la capacidad de asimilar sacarosa mejoradas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en un medio de cultivo que contiene, total o parcialmente, sacarosa como fuente de carbono; y
 separar el L-aminoácido del medio de cultivo obtenido de la etapa anterior.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el L-aminoácido se selecciona del grupo que consiste en L-treonina, O-succinil-homoserina, O-acetil-homoserina, L-metionina, L-lisina, L-homoserina, L-isoleucina, L-valina y L-triptófano.

Figura 1

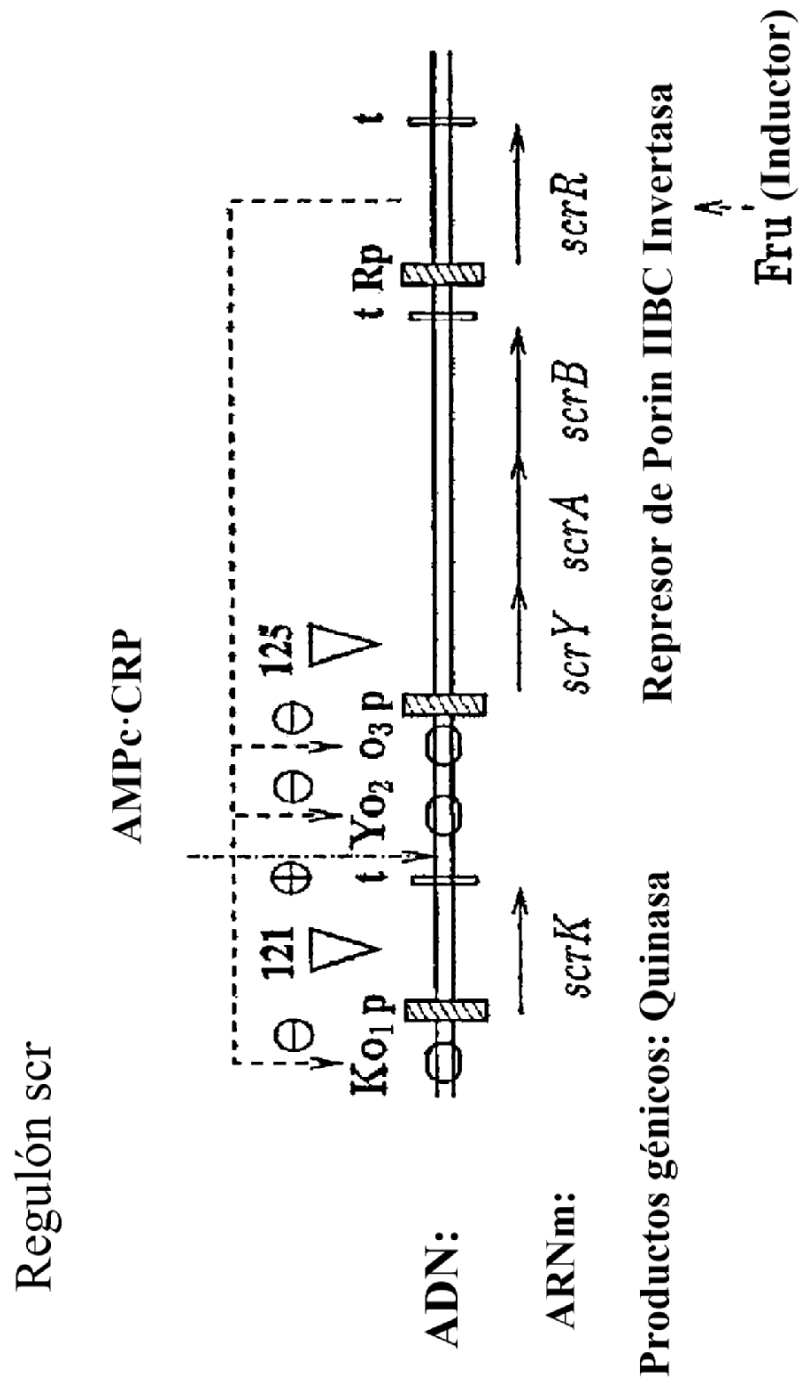


Figura 2

