

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 442**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2014** **PCT/KR2014/003327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014** **WO14171747**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2014** **E 14785937 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017** **EP 2987854**

54 Título: **Microorganismo que presenta productividad de L-triptófano y método para la producción del L-triptófano mediante la utilización del mismo**

30 Prioridad:

16.04.2013 KR 20130041547

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

22.11.2017

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center 330, Dongho-ro Jung-gu
Seoul 04560, KR

72 Inventor/es:

KIM, HYUNG JOON;
JANG, JU NO;
KIM, KYUNG RIM;
LEE, KEUN CHEOL;
HWANG, YOUNG BIN y
HONG, HYEONG PYO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 643 442 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 que presenta productividad de L-triptófano y método para la producción del L-triptófano mediante la utilización del mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante que presenta una productividad de L-triptófano mejorada y a un método de producción de L-triptófano que utiliza el microorganismo.

Antecedentes de la técnica

El L-triptófano, un tipo de aminoácido esencial, ha sido ampliamente utilizado como aditivo para piensos y alimentos. El L-triptófano es producido generalmente mediante fermentación utilizando microorganismos del género *Corynebacterium*, *Bacillus* o *Escherichia*, y variantes de los mismos. El triptófano se biosintetiza a partir del ácido corísmico, que es un intermediario común de la síntesis de los aminoácidos aromáticos. Específicamente, el L-triptófano es biosintetizado por la acción de cinco enzimas, los cuales son sintetizados por el operón triptófano *trpEDCBA* a partir del ácido corísmico producido mediante la ruta común del ácido shikímico que parte del fosfoenolpiruvato y la D-eritrosa-4-fosfato. En primer lugar, la antranilato sintasa (complejo TrpE-TrpD) actúa sobre el ácido corísmico, sintetizando el ácido antranílico, seguido de la acción sobre éste de la antranilato fosforibosiltransferasa (TrpD) para sintetizar N-(5'-fosforibosil)-antranilato. A continuación, la fosforibosilantranilato isomerasa (TrpC) y la indol-3-glicerol fosfato sintasa (TrpG) actúan sobre el N-(5'-fosforibosil)-antranilato, sintetizando indol-3-glicerol-fosfato, seguido de la acción sobre el mismo de la triptófano sintasa (complejo TrpB-TrpA) para sintetizar L-triptófano (fig. 1; Bonggaerts et al., Metab. Eng. 3:289-300, 2001).

En *E. coli*, una proteína codificada por un complejo de los genes *trpE* y *trpD* forma la antranilato sintasa, sintetizando ácido antranílico. El ácido antranílico sintetizado reacciona con 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) mediante la antranilato fosforibosiltransferasa, codificada por el gen *trpD*, sintetizando de esta manera N-(5'-fosforibosil)-antranilato.

En la presente memoria, la proteína codificada por el gen *trpD* actúa como antranilato sintasa en combinación con la proteína codificada por el gen *trpE* o actúa sola como antranilato fosforibosiltransferasa y una cepa de *E. coli* de tipo salvaje mantiene el equilibrio de dichas dos acciones.

En una cepa de *E. coli* de tipo salvaje, la concentración de PRPP que se utiliza como cofactor en la biosíntesis intracelular de triptófano es de aproximadamente 180 μ M (Bennett et al., Nat. Chem. Biol. 5:595-599, 2009). En una cepa productora de L-triptófano con biosíntesis mejorada del ácido antranílico, la concentración acumulada extracelularmente de ácido antranílico presenta el valor máximo, mientras que la concentración intracelular de PRPP es muy inferior a la concentración de ácido antranílico. La concentración baja de PRPP actúa como factor limitante en la producción de N-(5'-fosforibosil)-antranilato, reduciendo la tasa global de síntesis de L-triptófano e incrementando la acumulación intracelular y extracelular de ácido antranílico. De esta manera, la utilización de una antranilato fosforibosiltransferasa con afinidad más alta para PRPP permite evitar la acumulación intracelular y extracelular del ácido antranílico e incrementa la tasa de biosíntesis de L-triptófano.

Entre los informes previos sobre la mejora de las cepas productoras de L-triptófano, todavía no se encuentra ningún informe de una tecnología de mejora de la ruta de biosíntesis que mantenga simultáneamente el equilibrio entre las actividades de la antranilato sintasa y la antranilato fosforibosiltransferasa.

Según algunos estudios, el valor de K_m de *E. coli* para PRPP es de 50, mientras que el valor de K_m de levadura para PRPP es de aproximadamente 22,4 $\pm$ 2,6 (Hommel et al., Eur. J. Biochem. 180:33-40, 1989). De esta manera, la afinidad de la antranilato fosforibosiltransferasa de levadura para PRPP es más elevada que la de la antranilato fosforibosiltransferasa de *E. coli*. De esta manera, se espera que la utilización de la antranilato fosforibosiltransferasa de levadura presentará mayores efectos sobre la prevención de la acumulación intracelular y extracelular del ácido antranílico e incrementará la biosíntesis del L-triptófano en microorganismos con rutas mejoradas de biosíntesis de L-triptófano.

Durante un intento de mejorar la ruta de biosíntesis del ácido corísmico y la ruta del operón *trp* en *E. coli* para producir una gran cantidad de L-triptófano industrialmente útil, los presentes inventores encontraron que, al mejorar las dos rutas anteriormente indicadas, se acumulaba ácido antranílico intracelular y extracelularmente, y por este motivo, se producía un cultivo anormal. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los presentes inventores continuaron investigando con la esperanza de que la mejora de la expresión de la antranilato fosforibosiltransferasa en microorganismos con una ruta mejorada de biosíntesis del L-triptófano pudiese evitar la acumulación intracelular y extracelular de ácido antranílico e incrementar la biosíntesis de L-triptófano, completando de esta manera la presente invención.

ExposiciónProblema técnico

5 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un microorganismo con productividad mejorada de L-triptófano, de expresión mejorada de antranilato fosforibosiltransferasa de levadura (*trp4*).

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método de producción de L-triptófano que utilice el microorganismo anteriormente indicado.

Solución técnica

Con el fin de llevar a cabo los objetivos anteriormente indicados, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que presenta una productividad mejorada de L-triptófano y que ha sido modificado para expresar antranilato fosforibosiltransferasa de levadura.

La presente invención proporciona además un método para producir L-triptófano, comprendiendo el método las etapas de cultivar el microorganismo del género *Escherichia* y recuperar L-triptófano a partir del cultivo.

Efectos ventajosos

El microorganismo según la presente invención puede producir L-triptófano con un alto rendimiento y, de esta manera, puede utilizarse ventajosamente en la industria farmacéutica y en la industria de los piensos, en particular en el campo de los piensos animales.

Descripción de los dibujos

La fig. 1 es una vista esquemática que muestra la ruta de biosíntesis del L-triptófano en *E. coli* y las proteínas que participan en la misma.

La fig. 2 muestra la homología de secuencia de aminoácidos de las antranilato fosforibosiltransferasas de levadura.

La fig. 3 muestra los vectores pCL-*P_{CJ1}*-*trpD* y pCL-*P_{CJ1}*-*trp4*.

La fig. 4 muestra una comparación entre la productividad de L-triptófano tras 40 horas de fermentación en una cepa parental productora de L-triptófano y en una cepa transformada con el vector pCL-*P_{CJ1}*-*trpD* o pCL-*P_{CJ1}*-*trp4*.

La fig. 5 muestra una comparación entre la acumulación del precursor del triptófano llamado ácido antranílico tras la fermentación en una cepa parental productora de L-triptófano y en una cepa transformada con el vector pCL-*P_{CJ1}*-*trpD* o pCL-*P_{CJ1}*-*trp4*.

La fig. 6 muestra una comparación entre la productividad de L-triptófano a las 40 horas de fermentación en una cepa parental productora de L-triptófano y cepas que presentan un casete de expresión de gen *trp4* insertado en el genoma.

La fig. 7 muestra una comparación entre la acumulación de ácido antranílico tras la fermentación en una cepa parental productora de L-triptófano y cepas que presentan un casete de expresión de gen *trp4* insertado en el genoma.

Modo de la invención

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

La presente invención proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que presenta una productividad mejorada de L-triptófano, que ha sido modificado para expresar antranilato fosforibosiltransferasa de levadura.

La antranilato fosforibosiltransferasa es un enzima que sintetiza fosforibosil antranilato utilizando ácido antranílico y PRPP. En cepas que presentan una productividad mejorada de L-triptófano, la síntesis de ácido corísmico se incrementa mediante una ruta mejorada del ácido shikímico, resultando en un incremento del ácido antranílico. El incremento de la cantidad de ácido antranílico se acumula intracelular y extracelularmente, interfiriendo con la actividad fisiológica normal de las células e inhibiendo de esta manera la producción de L-triptófano.

De esta manera, la presente invención pretende evitar la acumulación intracelular y extracelular de ácido antranílico mediante la mejora de la expresión de la antranilato fosforibosiltransferasa, incrementando de esta manera la biosíntesis de L-triptófano.

En la presente memoria, la presente invención está destinada a incrementar adicionalmente la tasa de síntesis de fosforibosil antranilato mediante la utilización de antranilato fosforibosiltransferasa de levadura con una afinidad más elevada para PRPP respecto a una antranilato fosforibosiltransferasa que está codificada por el gen *trpD* en *E. coli*.

La antranilato fosforibosiltransferasa que se utiliza en la presente invención se deriva de una levadura y puede observarse que las antranilato fosforibosiltransferasas de diversas especies de levadura presentan una homología de secuencias de aminoácidos de 87% o superior (fig. 2). Específicamente, la antranilato fosforibosiltransferasa que se utiliza en la presente invención presenta una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1. Sin embargo, la antranilato fosforibosiltransferasa que se utiliza en la presente invención no se encuentra limitada a la misma, debido a que la secuencia de aminoácidos de un enzima que muestra actividad de antranilato fosforibosiltransferasa puede diferir dependiendo de la especie o cepa de microorganismo. Específicamente, la antranilato fosforibosiltransferasa que se utiliza en la presente invención puede ser una variante mutante o artificial que codifica un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones de la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 o una mutación silenciosa que provoca un cambio en un aminoácido similar, con la condición de que la actividad de la antranilato fosforibosiltransferasa pueda mantenerse o incrementarse. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "varios aminoácidos" se refiere a 2 a 20 aminoácidos, preferentemente 2 a 10 aminoácidos, y más preferentemente 2 a 5 aminoácidos, dependiendo del tipo o posiciones de los residuos aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína. Además, las sustituciones, delecciones, inserciones, adiciones o inversiones de aminoácidos pueden incluir mutantes naturales o variantes artificiales, basadas en diferencias individuales y/o diferencias entre especies del microorganismo que presentan antranilato fosforibosiltransferasa de levadura.

En la presente invención, la mejora de la antranilato fosforibosiltransferasa de levadura puede conseguirse mediante transformación con un vector que comprende un polinucleótido codificante de antranilato fosforibosiltransferasa de levadura o mediante inserción del polinucleótido en el cromosoma.

El polinucleótido codificante de antranilato fosforibosiltransferasa de levadura está representado por la SEC ID nº 9. El polinucleótido puede transformarse en una célula huésped. Para ello, el polinucleótido puede sustituirse con un codón favorecido por la célula huésped, o el extremo N-terminal o C-terminal del mismo puede extenderse o eliminarse, o el codón de inicio del mismo puede modificarse para controlar el nivel de expresión. De esta manera, el polinucleótido de la presente invención puede presentar una secuencia polinucleótida codificante de una proteína que presenta una homología de por lo menos 80%, específicamente de por lo menos 90%, más específicamente de por lo menos 95%, en particular específicamente de por lo menos 97%, respecto a la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1, con la condición de que pueda mantener o potenciar la actividad de la antranilato fosforibosiltransferasa de levadura de la variante de la presente invención. Más específicamente, el polinucleótido de la presente invención puede presentar una secuencia polinucleótida representada por la SEC ID nº 9.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "homología" se refiere a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos. La homología puede determinarse utilizando métodos bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, BLAST 2.0, que calcula parámetros tales como la puntuación, la identidad o la similitud.

Además, la secuencia polinucleótida según la presente invención puede ser una variante codificante de la antranilato fosforibosiltransferasa de levadura, que puede hibridarse con la secuencia polinucleótida de SEC ID nº 9 o una sonda derivada de la secuencia polinucleótida bajo condiciones restrictivas y que normalmente funciona.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "condiciones restrictivas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos. Dichas condiciones restrictivas se describen en detalle en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., editores, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 o en Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., editores, John Wiley & Sons, Inc., New York, que describen, por ejemplo, la hibridación en un tampón de hibridación (3,5 X SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina de suero bovino al 0,02%, NaH_2PO_4 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM) a 65°C. En la presente memoria, SSC es cloruro sódico 0,15 M/citrato sódico 0,15 M (pH 7). Tras la hibridación, la membrana a la que se transfiere ADN se lava con 2 X SSC a temperatura ambiente y después se lava con 0,1-0,5 x SSC/0,1 x SDS a una temperatura de 68°C.

El vector que se utiliza en la presente invención no se encuentra específicamente limitado y puede ser cualquier vector conocido de la técnica, con la condición de que pueda replicarse en un huésped. Entre los ejemplos de vectores que se utilizan comúnmente se incluyen plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos naturales o recombinantes. Por ejemplo, el vector fago o vector cósmido que se utiliza en la presente invención puede ser pWE15, M13, AMBL3, λ MBL4, λ IXII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ T11, Charon4A, Charon21A o similar, y el vector plásmido que se utiliza en la presente invención puede ser de tipo pBR, de tipo pUC, de tipo pBluescriptII, de tipo pGEM, de tipo pTZ, de tipo pCL, de tipo pET o similar. Más preferentemente, puede utilizarse un vector pACYC177, pCL o pCC1BAC.

Además, puede insertarse un nuevo polinucleótido codificante de una proteína diana en un locus genético específico en el cromosoma mediante un fragmento de ADN que comprende un polinucleótido para la inserción en el cromosoma bacteriano. La inserción del nuevo polinucleótido en el cromosoma puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido de la técnica, por ejemplo mediante recombinación homóloga. El polinucleótido para la inserción en el cromosoma según la presente invención puede comprender además un marcador de selección para confirmar si el polinucleótido ha sido insertado en el cromosoma, debido a que puede insertarse en el cromosoma

mediante recombinación homóloga. El marcador de selección puede utilizarse para seleccionar células transformadas, es decir, para confirmar si el polinucleótido de interés ha sido insertado. De esta manera, en la presente invención pueden utilizarse marcadores que confieren fenotipos seleccionables, tales como la resistencia a fármacos, la auxotrofia, la resistencia a agentes citotóxicos o la expresión de proteínas de superficie. En un medio tratado con un agente selectivo, sólo las células que expresan el marcador de selección sobreviven o muestran un fenotipo diferente y de esta manera pueden seleccionarse las células transformadas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “transformación” se refiere a introducir un vector que comprende un polinucleótido codificante de una proteína diana en una célula huésped de manera que sea capaz de expresar una proteína codificada por el polinucleótido en la célula huésped. El polinucleótido transformado puede insertarse y localizarse en el cromosoma de la célula huésped o localizarse fuera del cromosoma, con la condición de que pueda expresarse en la célula huésped. Además, los polinucleótidos incluyen ADN y ARN que codifica la proteína diana. Con la condición de que el polinucleótido pueda introducirse en la célula huésped y expresarse en la misma, puede introducirse en cualquier forma. Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en la célula huésped en forma de un casete de expresión que es un constructo polinucleótido que incluye todos los elementos necesarios para la autoexpresión. El casete de expresión generalmente incluye un promotor que se encuentra operablemente ligado al marco de lectura abierta (en lo sucesivo en la presente memoria abreviado como “ORF”, por sus siglas en inglés) del gen, una señal de terminación de transcripción, un sitio de unión ribosómica y una señal de terminación de la traducción. El promotor que se utiliza en la presente invención no se encuentra específicamente limitado y puede ser cualquier promotor conocido de la técnica, con la condición de que inicie la transcripción del polinucleótido codificante de la proteína diana en la célula huésped. Específicamente, puede utilizarse el promotor de T7, el promotor trc, el promotor tac, el promotor CJ1 (patente coreana nº 0620092), etc. Más específicamente, puede utilizarse el promotor trc o el promotor CJ1.

El casete de expresión puede encontrarse en forma de un vector de expresión autorreplicable. Además, el polinucleótido puede introducirse en la célula huésped por sí solo y ligarse operablemente a la secuencia necesaria para la expresión en la célula huésped.

El microorganismo de la presente invención incluye cualquier organismo procariótico, con la condición de que pueda producir L-triptófano. Por ejemplo, puede incluir un microorganismo perteneciente al género *Escherichia*, el género *Erwinia*, el género *Serratia*, el género *Providencia*, el género *Corynebacterium* o el género *Brevibacterium*. Específicamente, el microorganismo de la presente invención es un microorganismo perteneciente al género *Escherichia*. Más específicamente, es *Escherichia coli*.

Con el fin de que el microorganismo de la presente invención produzca L-triptófano, la actividad de por lo menos un enzima seleccionado de entre el grupo que consiste de antranilato sintasa (trpE), fosfoglicerato deshidrogenasa (serA), 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa (aroG), 3-deshidroquinato sintasa (aroB), shikimato deshidrogenasa (aroE), shikimato quinasa (aroL), 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (aroA), corismato sintasa (aroC), prefenato deshidratasa, corismato mutasa y triptófano sintasa (trpAB), en el microorganismo, puede potenciarse adicionalmente, o la actividad de la corismato mutasa/prefenato deshidratasa o corismato mutasa/prefenato deshidrogenasa en el microorganismo puede atenuarse adicionalmente. Además, el microorganismo de la presente invención puede modificarse de manera que uno o más de antranilato sintasa y fosfoglicerato deshidrogenasa se liberen de la inhibición por retroalimentación por L-triptófano y L-serina.

En un ejemplo específico de la presente invención, se transformó *E. coli* con un vector que comprendía el gen (*trp4*) codificante de la antranilato fosforibosiltransferasa de levadura representada por la SEC ID nº 1 y la cepa construida se denominó CA04-2006 y se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (Korean Culture Center of Microorganisms (361-221, Honje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, Corea del Sur)), una autoridad internacional de depósitos, el 8 de abril de 2013, bajo el número de acceso KCCM11408P.

Además, la presente invención proporciona un método para producir L-triptófano, que comprende las etapas de: cultivar un microorganismo del género *Escherichia* que presenta productividad de L-triptófano, que ha sido modificado para expresar una antranilato fosforibosiltransferasa de levadura que presenta la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1 y recuperar el L-triptófano a partir del cultivo.

El procedimiento de cultivo en la presente invención puede llevarse a cabo en medio adecuado y bajo condiciones de cultivo conocidas de la técnica. Este procedimiento de cultivo puede ser fácilmente modificado por cualquier experto en la materia según el tipo de cepa seleccionada. Entre los ejemplos del procedimiento de cultivo se incluyen, aunque sin limitación, cultivo por lotes, cultivo continuo y cultivo alimentado por lotes.

El medio y las condiciones de cultivo que se utilizan en el cultivo del microorganismo de la presente invención pueden ser cualesquiera de los utilizados generalmente en el cultivo de microorganismos del género *Escherichia*, aunque deben satisfacer correctamente los requisitos del microorganismo de la presente invención.

En una realización específica, el microorganismo de la presente invención puede cultivarse en un medio convencional que contenga fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y similares

adecuados, bajo condiciones aeróbicas, ajustando simultáneamente la temperatura, el pH y similares.

Entre las fuentes de carbono que pueden utilizarse en la presente invención se incluyen carbohidratos, tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, sorbitol, alcoholes y ácidos orgánicos, tales como alcohol de azúcar, glicerol, ácido pirúvico, ácido láctico y ácido cítrico, y aminoácidos, tales como ácido glutámico, metionina y lisina, aunque no se encuentran limitadas a ellos. Además, pueden utilizarse fuentes de nutrientes orgánicos naturales, tales como hidrolizados de almidón, melaza, melaza residual, salvado de arroz, mandioca, bagazo y licor de maceración del maíz, aunque sin limitación de las mismas. Específicamente, pueden utilizarse carbohidratos tales como glucosa y melazas pretratadas estériles (es decir, melazas convertidas en azúcares reducidos), aunque sin limitación a los mismos. Además, pueden utilizarse sin limitación cantidades adecuadas de otras fuentes de carbono. Entre las fuentes de nitrógeno que pueden utilizarse en la presente invención se incluyen fuentes de nitrógeno inorgánico, tales como amonio, sulfato amónico, cloruro amónico, acetato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico; aminoácidos, tales como ácido glutámico, metionina y glutamina, y fuentes de nitrógeno orgánico, tales como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta, licor de maceración del maíz, hidrolizado de caseína, harina de pescado o su producto digerido, torta de soja desgrasada o su producto digerido, etc. Estas fuentes de nitrógeno pueden utilizarse solas o en combinación, aunque sin limitación a las mismas. El medio puede contener, como fuentes de fósforo, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico y las sales correspondientes que contienen sodio. El medio puede contener compuestos inorgánicos puede contener cloruro sódico, cloruro de calcio, cloruro férrico, sulfato de magnesio, sulfato férrico, sulfato de manganeso y carbonato de calcio, aunque sin limitación a los mismos. Además, el medio puede contener aminoácidos, vitaminas y precursores adecuados. Estas fuentes o precursores pueden añadirse al medio por lotes o en continuo.

Pueden añadirse al medio durante el cultivo de una manera adecuada, compuestos tales como hidróxido amónico, hidróxido de potasio, amonio, ácido fosfórico y ácido sulfúrico para ajustar el pH del medio de cultivo. Además, durante el cultivo, puede utilizarse un agente antiespumante, tal como éster de poliglicol de ácido graso, para suprimir la formación de burbujas. Además, con el fin de mantener el medio de cultivo en un estado aeróbico, puede inyectarse en el medio de cultivo oxígeno o gas que contiene oxígeno. Además, con el fin de mantener el medio de cultivo en un estado anaeróbico o no aeróbico, no se inyecta ningún gas, o puede inyectarse gas nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono, al medio de cultivo. El medio de cultivo típicamente se mantiene a una temperatura de entre 27°C y 37°C, y específicamente de entre 30°C y 35°C. El cultivo del microorganismo puede continuarse hasta obtener el nivel deseado de la sustancia útil. Específicamente, el periodo de cultivo puede ser de entre 10 y 100 horas.

El método de la presente invención puede comprender además purificar o recuperar el L-triptófano producido en la etapa de cultivo. El procedimiento de purificación o recuperación puede llevarse a cabo mediante la purificación o recuperación del L-triptófano deseado a partir del medio de cultivo utilizando un método adecuado, por ejemplo un método de cultivo por lotes, continuo o alimentado por lotes.

En lo sucesivo en la presente memoria, la presente invención se describirá en mayor detalle haciendo referencia a ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan con fin ilustrativo y no pretenden ser limitativos del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: construcción de vector recombinante que comprende el promotor CJ1 y el gen *trpD* de *E. coli* o el gen *trp4* de una levadura

1-1: preparación de fragmento de promotor CJ1

Con el fin de obtener un fragmento de ADN que comprende el promotor CJ1, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo abreviada "PCR") utilizando, a modo de molde, el plásmido pECCG117-CJ1 ((patente US nº 8048648) que comprende el promotor CJ1. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un kit de premezcla de PCR HL (BIONEER, en lo sucesivo) y cebadores de SEC ID nº 2 y 3 bajo las condiciones siguientes: 30 ciclos, consistiendo cada uno de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 55°C durante 30 s y alargamiento a 72°C durante 30 s.

El producto de PCR (en lo sucesivo en la presente memoria denominado "fragmento PCJ1") se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y después se recogió una banda con el tamaño deseado mediante elución.

1-2: preparación de fragmentos de los genes *trpD* y *trp4*

Con el fin de obtener el ORF del gen *trpD*, se obtuvo la cepa W3110 derivada de *E. coli* K-12 de tipo salvaje del Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos y con el fin de obtener el ORF del gen *trp4*, se obtuvo una cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) del American Type Culture Collection.

A partir de las cepas se prepararon ADN genómicos utilizando un kit de extracción de ADN genómico (QIAGEN). Utilizando el ADN genómico de *E. coli* a modo de molde, se amplificó un fragmento de ADN (1.607 pb) correspondiente al ORF del gen *trpD* de SEC ID nº 6 mediante PCR utilizando los cebadores de SEC ID nº 4 y nº 5.

Además, utilizando el ADN genómico de una levadura, se amplificó un fragmento de ADN (1.154 pb) correspondiente al ORF del gen *trp4* de SEC ID nº 9 mediante PCR utilizando los cebadores de SEC ID nº 7 y nº 8. Los productos de PCR (en lo sucesivo denominados "fragmento de *trpD*" y "fragmento de *trp4*", respectivamente) se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y después se recogieron mediante elución las bandas que presentaban el tamaño deseado.

1-3: construcción de los vectores recombinantes pCL-P_{CJ1}-trpD y pCL-P_{CJ1}-trp4

El fragmento P_{CJ1} preparado en el Ejemplo 1-1 y un vector pCL1920 se trataron con el enzima de restricción EcoRI y después se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Cada uno de los fragmentos de ADN se ligó en el vector utilizando un kit de ligación rápida de ADN (ROCHE en lo sucesivo) durante 30 minutos y después se transformó en células de *E. coli* DH5α en una placa LB que contenía espectinomicina y se seleccionaron las células transformadas.

Las células seleccionadas se inocularon en 20 ml de medio líquido LB que contenía espectinomicina con un asa de platino y se cultivaron durante la noche, después de lo cual se recolectó un ADN plasmídico utilizando un kit de extracción plasmídica (QIAGEN en lo sucesivo). Se determinó el tamaño del vector recombinante mediante tratamiento con el enzima de restricción EcoRI (datos no mostrados) y se identificó el clon mediante la realización de un PCR utilizando los cebadores de SEC ID nº 2 y nº 3. El vector recombinante se denominó "pCL- P_{CJ1}".

El fragmento de *trpD* o el fragmento de *trp4* preparados en el Ejemplo 1-2 y el vector pCL-P_{CJ1} se trataron con los enzimas de restricción EcoRV y PstI, y después se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se ligó cada uno de los fragmentos de ADN en el vector utilizando un kit de ligación rápida de ADN (ROCHE, en lo sucesivo) durante 30 minutos y después se transformaron en células de *E. coli* DH5α. Las células transformadas se seleccionaron de la manera indicada anteriormente y se recolectó un ADN plasmídico de la manera indicada anteriormente. Se determinaron los tamaños de los vectores recombinantes mediante el tratamiento con los enzimas de restricción EcoRI y PstI (datos no mostrados) y se identificaron los clones mediante la realización de PCR utilizando los cebadores de SEC ID nº 2 y nº 5. Los vectores recombinantes eran "pCL-P_{CJ1}-trpD" y "pCL-P_{CJ1}-trp4", respectivamente (fig. 3).

Ejemplo 2: construcción de cepa productora de L-triptófano transformada con el vector recombinante pCL- P_{CJ1}-trpD or pCL-P_{CJ1}-trp4

Se introdujo cada uno de los vectores recombinantes pCL-P_{CJ1}-trpD y pCL-P_{CJ1}-trp4 construidos en el Ejemplo 1, en una cepa parental productora de L-triptófano utilizando reactivo TSS (por sus siglas en inglés, solución de transformación y almacenamiento) suministrado por EPICENTRE.

En el presente ejemplo, se utilizó *E. coli* KCCM11166P como cepa parental productora de L-triptófano. *E. coli* KCCM11166P es una cepa productora de L-triptófano construida a partir de *E. coli* KCCM10812P (patente coreana nº 10-0792095) y se caracteriza porque el gen *tehB* cromosómico ha sido inactivo y la actividad de la NAD quinasa ha sido incrementada (publicación de patente coreana abierta a inspección pública nº 10-2012-0083795).

Se inoculó un asa de platino de la cepa parental productora de L-triptófano en 4 ml de medio LB y se cultivó durante 3 horas, seguido de centrifugación. Se añadieron 50 ng del vector plásmido pCL-P_{CJ1}-trpD o del vector plásmido pCL-P_{CJ1}-trp4 y 100 µl de reactivo TSS y se mezclaron suficientemente con las células separadas. A continuación, se introdujeron las células en la cepa parental productora de L-triptófano mediante una técnica de transformación en una sola etapa (Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2172-2175, 1989), y las cepas se sembraron en una placa con LB que contenía espectinomicina y se seleccionaron las cepas transformadas. Para confirmar las cepas transformadas, se aisló ADN plasmídico a partir de las cepas transformadas y se trataron con enzimas de restricción y se sometieron a PCR de la manera indicada en el Ejemplo 1-3. Las cepas transformadas se denominaron "Con/pCL-P_{CJ1}-trpD" y "Con/pCL-P_{CJ1}-trp4", respectivamente.

Ejemplo 3: comparación de la productividad de L-triptófano y la actividad fisiológica de diferentes cepas transformadas

Las cepas transformadas que se prepararon en el Ejemplo 2 se cultivaron en matraces Erlenmeyer utilizando el medio de titulación de triptófano mostrado en la Tabla 1, a continuación, y se analizaron las productividades de L-triptófano de las mismas.

Tabla 1: composición del medio producto de L-triptófano (por cada litro)

Componente	Contenido (g/l)
Glucosa	60
KH ₂ PO ₄	0,3
K ₂ HPO ₄	0,6
(NH ₄) ₂ SO ₄	15

Mg ₅ O ₄ ·7H ₂ O	1
Citrato sódico	5
Extracto de levadura	2,5
L-tirosina	0,1
L-fenilalanina	0,15
NaCl	2,5
Carbonato de calcio	40

Se inoculó un asa de platino de cada una de las cepas parental productora de L-triptófano (Con), Con/pCL-P_{CJ1}-trpD y Con/pCL-P_{CJ1}-trp4 cultivadas durante la noche en medio LB sólido en un incubador a 37°C, en 25 ml del medio de titulación mostrado en la Tabla 1, anteriormente, y después se cultivó cada una de las cepas en un incubador a 37°C y a 200 rpm durante 40 horas. Se muestran los resultados en las Tablas 2 y 3, a continuación.

Tabla 2: comparación entre la productividad de triptófano de la cepa productora de L-triptófano y la cepa que expresaba el gen *trpD* o el gen *trp4* en un vector

Cepa	L-triptófano (g/l)	ácido antranílico (mg/l)
Con/pCL	6,9±0,5	722±62
Con/pCL-P _{CJ1} -trpD	8,0±0,4	42±13
Con/pCL-P _{CJ1} -trp4	10,3±2,4	28±1

Tabla 3: comparación entre la actividad fisiológica de la cepa productora de L-triptófano y la cepa que expresaba el gen *trpD* o el gen *trp4* en un vector

Cepa	Densidad celular (DO ₆₀₀)	Tasa de consumo de glucosa (g/l·h ⁻¹)
Con/pCL	18,2±0,7	1,78±0,03
Con/pCL-P _{CJ1} -trpD	19,1±1,4	1,76±0,05
Con/pCL-P _{CJ1} -trp4	20,7±1,5	1,67±0,06

Tal como puede observarse en la Tabla 2, anteriormente, la cepa parental productora de L-triptófano produjo 6,9 g/l de L-triptófano durante 40 horas de cultivo pero las cepas Con/pCL-P_{CJ1}-trp4 y Con/pCL-P_{CJ1}-trp4 produjeron 8,0 g/l y 10,3 g/l de L-triptófano, respectivamente, y de esta manera, mostraron incrementos de productividad de L-triptófano de 1,1 g/l y 3,4 g/l, respectivamente, en comparación con la cepa parental (incrementos de 16% y 49%, respectivamente).

Además, tal como puede observarse en la Tabla 3, anteriormente, las cepas transformadas eran similares a la cepa parental productora de L-triptófano en términos de tasa de consumo de glucosa o crecimiento celular, y la acumulación del producto secundario de la fermentación acetato en la cepa transformada también era similar o inferior a la observada en la cepa parental productora de L-triptófano (datos no mostrados). De esta manera, pudo observarse que las cepas transformadas mostraban una actividad fisiológica sustancialmente similar a la de la cepa parental productora de L-triptófano.

En particular, en la cepa parental productora de L-triptófano, con frecuencia aparece el fenómeno de que no se mantiene la fermentación normal debido a la fermentación anormal que implica la acumulación del ácido antranílico durante la misma. De esta manera, durante la fermentación de la cepa parental productora de L-triptófano resulta importante controlar los factores de fermentación a fin de evitar la acumulación excesiva del ácido antranílico y desventajosamente resulta necesario un seguimiento continuo. De esta manera, una cepa productora de L-triptófano en la que se acumule menos el ácido antranílico se considera importante en el aspecto de que puede reducir la frecuencia de la fermentación anormal. Tal como puede observarse en las Tablas 2 y 3, las cepas transformadas que expresaban el gen *trpD* o el gen *trp4* por parte del vector pCL mostraron una menor acumulación de ácido antranílico que con la cepa productora de L-triptófano.

A partir de una comparación entre las cepas transformadas que expresaban antranilato fosforibosiltransferasa de *E. coli* y antranilato fosforibosiltransferasa de levadura, respectivamente, pudo observarse que la cepa transformada que expresaba el gen *trp4* con afinidad elevada para PRPP era mejor en términos de incremento de la actividad de L-triptófano y de reducción de la acumulación del ácido antranílico.

De esta manera, puede concluirse que, en el caso de que se utilice la cepa transformada que expresa el gen *trp4* para producir L-triptófano, puede producirse el L-triptófano con una productividad más elevada y que la productividad global de L-triptófano puede mantenerse a un nivel elevado mediante el mantenimiento de una estabilidad de la fermentación más elevada.

Ejemplo 4: transformación del vector recombinante pCL-P_{CJ1}-trp4 en cepas productoras de L-triptófano y comparación de la productividad de L-triptófano en diferentes cepas transformadas

Con el fin de examinar si el efecto descrito en el Ejemplo también aparece en otras cepas productoras de L-triptófano, se transformaron los vectores pCL-P_{CJ1}-trp4 en las cepas y se comparó la productividad de L-triptófano entre las cepas transformadas de la misma manera que en el Ejemplo 3.

Las cepas de *E. coli* productoras de L-triptófano utilizadas en el presente ejemplo fueron KCCM10805P (patente coreana nº 0850853) y KCCM10814P (patente coreana nº 0838036). La cepa mutante de *E. coli* KCCM10805P es una cepa de *E. coli* productora de L-triptófano derivada de la cepa de *E. coli* productora de L-triptófano CJ285 (publicación de patente coreana nº 10-2005-0059685) que presenta resistencia al análogo del triptófano llamado hidroxamato de triptófano y que se caracteriza porque el gen *nrfE* que participa en la reducción del nitrito ha sido inactivado mediante recombinación homóloga. La cepa mutante de *E. coli* KCCM10814P es una cepa de *E. coli* productora de L-triptófano derivada de CJ285 y que se caracteriza porque el gen *yjeO* codificante de una proteína requerida para sintetizar una membrana interna ha sido deletado.

4-1: construcción de diversas cepas productoras de L-triptófano transformadas con el vector recombinante pCL-P_{CJ1}-trp4

Se introdujo el vector recombinante pCL-P_{CJ1}-trp4 en las cepas productoras de L-triptófano KCCM10805P y KCCM10814P de la manera indicada en el Ejemplo 2 para construir cepas transformadas. Las cepas transformadas se denominaron "KCCM10805P/pCL-P_{CJ1}-trp4" y "KCCM10814P/pCL-P_{CJ1}-trp4", respectivamente.

4-2: comparación entre la productividad de L-triptófano de diversas cepas productoras de L-triptófano transformadas con el vector recombinante pCL-P_{CJ1}-trp4

Las cepas transformadas construidas en el Ejemplo 4-1, anteriormente, se cultivaron en matraces Erlenmeyer de la manera indicada en el Ejemplo 3 y se compararon las productividades de L-triptófano de las mismas. En la Tabla 4, a continuación, se muestran los resultados de la comparación.

Tabla 4

Cepa	L-triptófano (g/l)	Ácido antranílico (mg/l)
Con/pCL	6,5±0,5	833±100
Con/pCL-P _{CJ1} -trp4	10,2±0,5	45±12
KCCM10805P	8,7±0,3	356±82
KCCM10805P/pCL-P _{CJ1} -trp4	9,6±0,6	67±12
KCCM10814P	8,2±0,9	484±114
KCCM10814P/pCL-P _{CJ1} -trp4	9,8±0,5	63±11

Tal como puede observarse en la Tabla 4, anteriormente, en el caso de que se expresase el gen *trp4* de levadura en las tres cepas productoras de L-triptófano por los vectores, se incrementó la productividad de L-triptófano en aproximadamente 0,9 a 3,7 g/l. Además, se demostró que, al expresar el gen *trp4* de levadura en las tres cepas productoras de L-triptófano por los vectores, se redujo en gran medida la cantidad de ácido antranílico. Lo anterior sugiere que la expresión del gen *trp4* de levadura en la cepa productora de L-triptófano presenta los efectos de incrementar la productividad de L-triptófano de la cepa, suprimiendo simultáneamente la acumulación de ácido antranílico en la cepa.

Ejemplo 5: construcción de cepa productora de L-triptófano recombinante que presenta el promotor CJ1 y el gen *trp4* introducido en el cromosoma de la cepa productora de L-triptófano

En la cepa Con/pCL-P_{CJ1}-trp4 construida en el Ejemplo 3, la cepa transformada puede perder el plásmido durante la división celular y, de esta manera, puede perder el casete de expresión del gen *trp4*. En este caso, la cepa transformada vuelve a ser la cepa productora de L-triptófano, indicando que resulta difícil mantener establemente el casete de expresión del gen *trp4*. Además, existe el riesgo de que el marcador de selección de resistencia a antibiótico en el plásmido pueda introducirse en el genoma de la cepa parental productora de L-triptófano, generando una cepa mutante con resistencia al antibiótico.

Por este motivo, en la presente invención, únicamente se insertó el casete de expresión del gen *trp4* en el locus génico *ybiX* en el genoma de la cepa parental productora de L-triptófano con el fin de resolver dicho problema.

5-1: construcción de vector que comprende el fragmento P_{CJ1}-trp4 y el gen de cloranfenicol acetiltransferasa

Como marcador de selección para confirmar la selección del casete de expresión del gen *trp4* en el genoma, se utilizó el gen de cloranfenicol acetiltransferasa que proporciona resistencia al cloranfenicol. Para ello, se utilizó el

vector pUCprmflox_C (publicación de patente coreana abierta al público nº 2009-0075549) que comprende el gen de cloranfenicol acetiltransferasa.

Utilizando pCL-P_{CJ1}-trp4 construido en el Ejemplo 1-3 como molde, se llevó a cabo una PCR con cebadores de SEC ID nº 10 y nº 11 para preparar un fragmento P_{CJ1}-trp4. El fragmento preparado y el vector pUCprmflox_C se trataron con los enzimas de restricción *KpnI* y *SpeI* y después se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se ligó cada uno de los fragmentos de ADN en el vector utilizando un kit de ligación rápida de ADN (ROCHE, en lo sucesivo) durante 30 minutos y después se transformaron en células de *E. coli* DH5 α . Las células transformadas se seleccionaron en un medio LB sólido que contenía cloranfenicol. La colonia seleccionada se cultivó en medio LB líquido y se recuperó el ADN plasmídico, se trató con un enzima de restricción y se secuenció, confirmando que se había construido correctamente un vector que comprendía el gen P_{CJ1}-trp4 y el gen de cloranfenicol acetiltransferasa. El vector confirmado se denominó "pmlox-Cmt-P_{CJ1}-trp4".

5-2: preparación de fragmento de ADN para insertar un fragmento de ADN que comprende el gen P_{CJ1}-trp4 y el gen de cloranfenicol acetiltransferasa en el locus génico *ybiX*

El gen *ybiX* (ID génico 12930961) es un gen la función del cual no ha sido aclarada y es conocido que la delección del gen conduce a un incremento del nivel intracelular de ATP (Hara et al., FEMS Microbiol.Lett. 297:217-224, 2009). Es conocido que, aunque se deleciona el gen *ybiX* de una cepa de *E. coli*, la actividad fisiológica de la cepa de *E. coli* no resulta muy influenciada. De esta manera, en la presente invención, se insertó el casete de expresión del gen *trp4* en el locus génico *ybiX* en el genoma de la cepa parental productora de L-triptófano.

Se preparó el fragmento del casete de expresión de *trp4* en el locus génico *ybiX* mediante la realización de una PCR utilizando el plásmido pmlox-Cmt-P_{CJ1}-trp4, construido en el Ejemplo 5-1, como molde, y los cebadores de SEC ID nº 12 y nº 13. El fragmento de ADN preparado se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Utilizando el fragmento de ADN sometido a electroforesis como molde, se llevó a cabo nuevamente una PCR con los cebadores de SEC ID nº 14 y nº 15. El fragmento de ADN resultante se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

El fragmento de ADN preparado es un fragmento que comprende una secuencia de 100 pb igual al gen *ybiX* en cada uno de los extremos 5' y 3' y puede insertarse en el locus génico *ybiX* en el genoma de la cepa productora de L-triptófano utilizando la recombinasa. Se midió la concentración del fragmento de ADN preparado utilizando NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC). El fragmento de ADN preparado se denominó "ybiX: :Cm-P_{CJ1}-trp4", y la secuencia del mismo está representada por la SEC ID nº 16.

5-3: inserción del casete de expresión de antranilato fosforibosiltransferasa de levadura de P_{CJ1}-trp4 en el locus génico *ybiX* de la cepa productora de L-triptófano

Se insertó el casete de expresión del gen *trp4* en el locus génico *ybiX* utilizando la recombinasa. Para dicha inserción, se utilizó la técnica de inactivación en una sola etapa utilizando la recombinasa lambda Red desarrollada por Datsenko K.A. et al. (Datsenko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645, 2000).

Se transformó el plásmido vector pKD46 que expresaba la recombinasa lambda Red, en la cepa productora de L-triptófano (KCCM 10812P) de la manera indicada en el Ejemplo 2. La cepa productora de L-triptófano transformada con el vector pKD46 se seleccionó en un medio LB sólido que contenía ampicilina. Con el fin de inducir la expresión de la recombinasa lambda Red, se cultivó la cepa productora de L-triptófano seleccionada que había sido transformada con el vector pKD46, en 20 ml de un medio LB líquido que contenía 5 mM de arabinosa. Tras alcanzar la densidad de las células 5x10⁸ células/ml, se recuperaron las células y se lavaron tres veces con una solución de glicerol frío al 10%.

Se introdujeron mediante electroporación 500 ng del fragmento de ADN ybiX::Cm-P_{CJ1}-trp4 preparado en el Ejemplo 5-2, en la cepa productora de L-triptófano resultante. En la cepa productora de L-triptófano en la que se había introducido un fragmento de ADN, se insertaron el gen de resistencia al cloranfenicol y el casete de expresión del gen *trp4*, en el locus génico *ybiX* mediante recombinación homóloga causada por la recombinasa lambda Red. Debido a que dicha cepa mostraba resistencia al cloranfenicol, se seleccionó en un medio LB sólido que contenía cloranfenicol. La cepa seleccionada se sometió a PCR de colonias utilizando cebadores de SEC ID nº 17 y nº 18 y, como resultado, se confirmó que el fragmento Cm-P_{CJ1}-trp4 había sido insertado en el locus génico *ybiX* de la cepa.

Debido a que el vector pKD46 presenta un origen de replicación sensible a la temperatura, seguidamente se incubó la cepa seleccionada a una temperatura de 40°C o superior para eliminar el vector pKD46 de las células. Se confirmó dicha eliminación por el hecho de que la cepa seleccionada no crecía en un medio LB sólido que contenía ampicilina.

A continuación, con el fin de eliminar el gen de resistencia al cloranfenicol del genoma de la cepa productora de L-triptófano, se introdujo el plásmido pJW168 (Palmeros et al., Gene 247:255-264, 2000) en la cepa de la manera indicada en el Ejemplo 2. Con el fin de expresar la recombinasa Cre a partir del plásmido pJW168 introducido, se sembró isopropil- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) en un medio LB sólido que contenía ampicilina y se seleccionó

una cepa. De la cepa seleccionada, se eliminó el gen de resistencia al cloranfenicol mediante recombinación genética causada por la recombinasa Cre en la posición *loxP* mutante y se confirmó dicha eliminación utilizando cebadores de SEC ID n° 17 y n° 18. La cepa confirmada tal como se ha indicado anteriormente era una cepa productora de L-triptófano en la que se había insertado el casete de expresión del gen *trp4* y se denominó "Con/ybiX::P_{CJ1}-trp4".

Ejemplo 6: comparación de la productividad de L-triptófano y la actividad fisiológica de una cepa transformada en la que se había insertado un casete de expresión del gen *trp4* en el cromosoma

La cepa transformada preparada en el Ejemplo 5 se cultivó en un matraz Erlenmeyer utilizando el medio de titulación de triptófano mostrado en la Tabla 1, anteriormente, y se analizó la productividad de L-triptófano del mismo.

Un asa de platino de cada una de las cepas parentales productoras de L-triptófano (Con) y la cepa Con/ybiX::P_{CJ1}-trp4 cultivada durante la noche en un medio LB sólido en un incubador a 37°C se inoculó en 25 ml del medio de titulación mostrado en la Tabla 1, anteriormente, y después se cultivó en un incubador a 37°C y a 200 rpm durante 40 horas. Los resultados del cultivo se muestran en las Tablas 5 y 6, a continuación.

Tabla 5: comparación entre la productividad de triptófano de la cepa parental productora de L-triptófano y de la cepa en la que se había insertado el casete de expresión del gen *trp4* en el cromosoma

Cepa	L-triptófano (g/l)	Ácido antranílico (mg/l)
Con	6,3±1,5	579±32
Con/ybiX::P _{CJ1} -trp4	9,5±1,2	31±18

Tabla 5: comparación entre la actividad fisiológica de la cepa parental productora de L-triptófano y de la cepa en la que se había insertado el casete de expresión del gen *trp4* en el cromosoma

Cepa	Densidad celular (DO ₆₀₀)	Tasa de consumo de glucosa (g/l·h ⁻¹)
Con	17,7±1,3	1,50±0,08
Con/ybiX::P _{CJ1} -trp4	19,3±1,6	1,54±0,07

Tal como puede observarse en la Tabla 5, anteriormente, la cepa parental produjo 6,3 g/l de L-triptófano durante 40 horas de cultivo, mientras que la cepa Con/ybiX::P_{CJ1}-trp4 produjo 9,2 g/l de L-triptófano y, de esta manera, mostró un incremento de la productividad de L-triptófano de 2,9 g/l (incremento de 46%) en comparación con la cepa parental.

Además, tal como puede observarse en la Tabla 6, anteriormente, la cepa Con/ybiX::P_{CJ1}-trp4 era similar a la cepa parental en términos de tasa de consumo de glucosa y de crecimiento celular, al igual que la cepa transformada en la que se había introducido con el vector el casete de expresión del gen *trp4*. Además, la acumulación del producto secundario de fermentación acetato en la cepa Con/ybiX::P_{CJ1}-trp4 era similar o inferior que la medida en la cepa parental (datos no mostrados).

De esta manera, pudo observarse que la cepa Con/ybiX::P_{CJ1}-trp4 mostraba una actividad fisiológica sustancialmente similar a la de la cepa parental productora de L-triptófano, al igual que la cepa transformada que presentaba la cepa transformada en la que se había introducido con el vector el casete de expresión del gen *trp4*. Además, se observó que la acumulación de ácido antranílico en la cepa Con/ybiX::P_{CJ1}-trp4 durante la fermentación se redujo en gran medida en comparación con la observada en la cepa parental productora de L-triptófano, al igual que el caso de la cepa transformada que presentaba la cepa transformada en la que se había introducido con el vector el casete de expresión del gen *trp4*. Por lo tanto, puede concluirse que, en el caso de que se utilice la cepa Con/ybiX::P_{CJ1}-trp4 para producir L-triptófano, puede producirse L-triptófano con una productividad más elevada y puede mantenerse la productividad global del L-triptófano a un nivel elevado mediante el mantenimiento de una estabilidad de la fermentación más elevada.

Número de acceso

Autoridad de depósito: Korean Culture Center of Microorganisms (Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos).
Número de acceso: KCCM11408P.
Fecha de depósito 8 de abril de 2013.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE
MICROORGANISMOS PARA LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO DE PATENTES,

FORMULARIO INTERNACIONAL

5

A: CJ CheilJedang Corporation
CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEOUL 100-400,
10 REPÚBLICA DE COREA

RECEPCIÓN EN EL CASO DE UN ORIGINAL
expedido con arreglo a la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al pie de la presente página

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación proporcionada por el DEPOSITANTE : <i>Escherichia coli</i> CA04-2006	Número de acceso proporcionado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: KCCM11408P
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O PROPUESTA DE DESIGNACIÓN TAXONÓMICA	
El microorganismo identificado en la sección I., anteriormente, estaba acompañada de: ☐ una descripción científica ☐ una propuesta de designación taxonómica (Señale con una cruz según proceda)	
III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN	
La presente Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado en la sección I., anteriormente, que fue recibida por la misma el 8 de abril de 2013 (fecha del depósito original)¹	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Korean Culture Center of Microorganisms Dirección: 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong Seodaemun-gu SEOUL 120-091 República de Corea	Firma(s) de la persona(s) con poder para representar la Autoridad Depositaria Internacional o de el(los) funcionario(s) autorizado(s): Fecha: 8 de abril de 2013. [Figura sello en el original]

15 ¹ En caso de aplicación de la Regla 6.4(d), dicha fecha es la fecha en la que se adquirió el estatuto de autoridad depositaria internacional; en el caso de un depósito realizado fuera del Tratado de Budapest posteriormente a la adquisición del estatuto de autoridad depositaria internacional convertido a un depósito dentro del Tratado de Budapest, dicha fecha es la fecha en la que el microorganismo ha sido recibido por la autoridad depositaria internacional.

20

Modelo BP/4

Página única

25

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> CJ Cheiljedang Corporation
5	<120> Microorganismos que presentan productividad de L-triptófano y método para la producción de L-triptófano mediante la utilización de los mismos
	<130> 20.126025
10	<140> 14785937.5 <141> 2014-04-16
	<150> KR 10-2013-0041547 <151> 2013-04-16
15	<160> 20
	<170> PatentIn versión 3.5
20	<210> 1 <211> 380 <212> PRT <213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
25	<400> 1
	Met Ser Glu Ala Thr Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Lys Leu Leu Ala Ser 1 5 10 15
	Pro Pro Gln Leu Ser Ser Thr Asp Leu His Asp Ala Leu Leu Val Ile 20 25 30
	Leu Ser Leu Leu Gln Lys Cys Asp Thr Asn Ser Asp Glu Ser Leu Ser 35 40 45
	Ile Tyr Thr Lys Val Ser Ser Phe Leu Thr Ala Leu Arg Val Thr Lys 50 55 60
	Leu Asp His Lys Ala Glu Tyr Ile Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Leu 65 70 75 80
	Arg His Ser Asp Leu Val Asp Leu Pro Leu Pro Lys Lys Asp Glu Leu 85 90 95
	His Pro Glu Asp Gly Pro Val Ile Leu Asp Ile Val Gly Thr Gly Gly 100 105 110
	Asp Gly Gln Asn Thr Phe Asn Val Ser Thr Ser Ala Ala Ile Val Ala 115 120 125
	Ser Gly Ile Gln Gly Leu Lys Ile Cys Lys His Gly Gly Lys Ala Ser 130 135 140
	Thr Ser Asn Ser Gly Ala Gly Asp Leu Ile Gly Thr Leu Gly Cys Asp

ES 2 643 442 T3

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

<210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para Pcj1-F-EcoRI

<400> 2
 cagaattcca ccgcggtt attc 24

<210> 3

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

5 <220>
 <223> cebador para Pcj1-R-EcoRI

10 <400> 3
 gagaattcgt agatatctta atctcctaga ttgggtttc 39

<210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> cebador para trpD-F-EcoRV

20 <400> 4
 atcatggctg acattctgct gctc 24

<210> 5
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador para trpD-R-PstI

30 <400> 5
 cactgcagtt accctcgtgc cgccagtg 28

<210> 6
 <211> 1596
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<400> 6
 atggctgaca ttctgctgct cgataatatc gactctttta cgtacaacct ggcagatcag 60
 ttgcgagca atgggcataa cgtggtgatt taccgcaacc atattccggc gcaaacctta 120
 attgaacgcc tggcgaccat gagcaatccg gtgctgatgc tttctcctgg ccccggtgtg 180
 ccgagcgaag ccggttgat gccggaactc ctcacccgct tgcgtggcaa gctgccatt 240
 attggcattt gcctcggaca tcaggcgatt gtcgaagctt acgggggcta tgcggtcag 300
 gcgggcgaaa ttctccacgg taaagcctcc agcattgaac atgacggtca ggcgatgttt 360
 gccggattaa caaaccgct gccggtggcg cgttatcact cgctggttgg cagtaacatt 420

40

ES 2 643 442 T3

```

ccggcccggtt taaccatcaa cgcccatttt aatggcatgg tgatggcagt acgtcacgat      480
gcggatcgcg tttgtggatt ccagttccat ccggaatcca ttctcaccac ccaggcgct      540
cgctgctgg aacaaacgct ggcctggcg cagcagaaac tagagccagc caacacgctg      600
caaccgattc tggaaaaact gtatcaggcg cagacgctta gccaacaaga aagccaccag      660
ctgttttcag cgggtggtgct tggcgagctg aagccggaac aactggcggc ggcgctggtg      720
agcatgaaaa ttcgcggtga gcacccgaac gagatcgccg gggcagcaac cgcgctactg      780
gaaaacgcag cgccgttccc gcgcccggat tatctgtttg ctgatatcgt cgggtactggc      840
ggtgacggca gcaacagtat caatatttct accgccagtg cgtttgtcgc cgcggcctgt      900
gggctgaaa gggcgaaaca cggcaaccgt agcgtctcca gtaaactctg ttcgtccgat      960
ctgctggcgg cgttcggtat taatcttgat atgaacgccg ataaatcgcg ccaggcgctg     1020
gatgagttag gtgtatgttt cctctttgcg ccgaagtatc acaccggatt ccgccacgcg     1080
atgccgggtc gccagcaact gaaaaccgc accctgttca atgtgctggg gccattgatt     1140
aaccggcgc atccgccgct ggcgttaatt ggtgtttata gtccggaact ggtgctgccg     1200
attgccgaaa ccttgcgcgt gctggggtat caacgcgcgg cgggtggtgca cagcggcggg     1260
atggatgaag ttctattaca cgcgccgaca atcgttgccg aactgcatga cggcgaaatt     1320
aaaagctatc agctcaccgc agaagacttt ggcctgacac cctaccacca ggagcaactg     1380
gcaggcggaa caccggaaga aaaccgtgac attttaacac gtttgttaca aggtaaaggc     1440
gacgccgccc atgaagcagc cgctcgtgcg aacgtcgcca tgtaaatgcg cctgcatggc     1500
catgaagatc tgcaagccaa tgcgcaaacc gttcttgagg tactgcgcag tggttccgct     1560
tacgacagag tcaccgcact ggccggcacga gggtaa                               1596

```

- 5
 - <210> 7
 - <211> 26
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial
- 10
 - <220>
 - <223> cebador para trp4-F-EcoRV
 - <400> 7
 - atcatgtccg aggcgacttt gctatc 26
- 15
 - <210> 8
 - <211> 36
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial
- 20
 - <220>
 - <223> cebador para trp4-R-PstI
 - <400> 8
 - gtctgcagct acaaggagct cacactatct ataaag 36
- 25
 - <210> 9
 - <211> 1143
 - <212> ADN
 - <213> Saccharomyces cerevisiae
- 30
 - <400> 9

ES 2 643 442 T3

atgtccgagg cgactttgct atcttacacc aagaaattat tggcttctcc gccgcaattg	60
agtagcacag acctacacga tgcgttgctg gttatattaa gtcttttgca aaaatgtgat	120
acaaatagcg atgagagtct ttccatctat accaaagttt cgagttttct cacggccttg	180
agagttacta aacttgatca caaggctgaa tacattgctg aagctgcaaa ggctgtgctc	240
agacattccg accttggtga tctaccttta cccaagaagg acgaattaca cccggaagat	300
ggaccagtaa tcttagatat tgtaggtact ggtggtgacg gacagaatac ttttaatggt	360
tccacgtctg ctgctatcgt tgcctccgga attcagggcc taaaaatttg taagcacggg	420
ggtaaagctt ctacatccaa tagtggagct ggtgacctaa ttggaacttt aggctgtgac	480
atgttcaagg ttaattcatc gacagtgcgc aaactttggc ctgataatac gttcatgttt	540
ctacttgctc ctttttttca tcatggaatg ggccacgttt ctaagatacg caaatttctt	600
ggaattccga ctgttttcaa cgtactggga ccacttctac atccagttag ccacgtaaac	660
aagagaatat tgggcgttta ctcaaaggaa cttgcgcctg aatatgccaa ggcagccgct	720
ttggtatata caggaagcga aacttttata gtttggggac atgttgggtt agacgaagta	780
tcacctatag gcaaaactac tgtctggcat attgatccga catcgtccga acttaaattg	840
aagaccttcc aattagaacc ttctatgttt ggtttagaag aacacgagtt gtcgaagtgt	900
gcttcatacg gccctaaaga gaatgcgaga attctaaaag aagaagtctt gtccggcaag	960
taccaccttg gcgacaataa tcctatttat gactacatct tgatgaacac cgccgtgtta	1020
tattgtttta gccaaggcca ccagaactgg aaggaaggga tcattaaggc agaagaaagc	1080
atacattctg gtaatgcatt acgttcttta gaacacttta tagatagtgt gagctccttg	1140
tag	1143

<210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para Pcj1-F-KpnI

<400> 10
 caggtaccca ccgcggtt attc 24

<210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para trp4-R-Spel

<400> 11
 gtactagtct acaaggagct cacactatct ataaag 36

<210> 12
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para Gl-ybiX-Cm-F

ES 2 643 442 T3

	<400> 12		
	tcgcgaacaa ctggaacaag ccgaatgggt ggatggacgc gtcaccaccg ataggcctag	60	
	gatgcatatg	70	
5	<210> 13 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> cebador para Gl-ybiX-trp4-R		
15	<400> 13		
	acaggatctc ttcactttcg ccgtagcggc ttttcagcga ctgaatattg ccaaaacagc	60	
	caagctttac	70	
20	<210> 14 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> cebador para Gl-ybiX-F		
	<400> 14		
	atgatgtacc acattcccgg cgtgttatcg ccacaggacg tcgctcgttt tcgcgaacaa	60	
	ctggaacaag	70	
30	<210> 15 <211> 70 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> cebador para Gl-ybiX-R		
	<400> 15		
40	tcagatctcc gaccattccc gcagcagatt atgataaaga ttaagcagcg acaggatctc	60	
	ttcactttcg	70	
45	<210> 16 <211> 2824 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> ybiX::Cm-PCJ1-trp4		

<400> 16

ES 2 643 442 T3

tcagatctcc gaccattccc gcagcagatt atgataaaga ttaagcagcg acaggatctc	60
ttcacttttcg ccgtagcggc ttttcagcga ctgaatattg ccaaaacagc caagctttac	120
cgttcgtata gcatacatta tacgaagtta tctgccctga accgacgacc gggtcgaatt	180
tgcttttgcga tttctgccat tcatccgctt attatcactt attcaggcgt agcaaccagg	240
cgtttaaggg caccaataac tgccttaaaa aaattacgcc ccgccctgcc actcatcgca	300
gtactgttgt aattcattaa gcattctgcc gacatggaag ccatacaciaa cggcatgatg	360
aacctgaatc gccagcggca tcagcacctt gtgcgcttgc gtataatatt tgcccatggt	420
gaaaacgggg gcgaagaagt tgtccatatt ggccacgttt aaatcaaaac tggtgaaact	480
caccagggga ttggctgaga cgaaaaacat attctcaata aaccctttag ggaaataggc	540
caggttttca ccgtaacacg ccacatcttg cgaatatatg tgtagaaact gccggaaatc	600
gtcgtggtat tcaactcaga gcgatgaaaa cgtttcagtt tgctcatgga aaacggtgta	660
acaagggtga aactatccc atatcaccag ctccacgtct ttcattgcc aacggaattc	720
cggatgagca ttcacagggc gggcaagaat gtgaataaag gccggataaa acttggtctt	780
atTTTTcttt acggtcttta aaaaggccgt aatatccagc tgaacggtct ggttatagg	840
acattgagca actgactgaa atgcctcaaa atgttcttta cgatgccatt gggatatatc	900
aacggtggta tatccagtga tttttttctc catTTtagct tccttagctc ctgaaaatct	960
cgataactca aaaaatacgc ccggtagtga tcttatttca ttatggtgaa agttggaacc	1020
tcttacgtgc cgatcaacgt ctcatTTtgc caaaagttg gccagggct tcccggatc	1080
aacagggaca ccaggattta tttattctgc gaagtgatct tccgtcacag gtatttattc	1140
ggcgcaaagt gcgtcgggtg atgcataact tcgtatagca tacattatac gaacggtacc	1200
catcagatcc ctgcagctac aaggagctca cactatctat aaagtgttct aaagaacgta	1260
atgcattacc agaatgtatg ctttctcttg ccttaatgat cccttccttc cagttctggt	1320
gaccttggtc taaacaatat aacacggcgg tgttcatcaa gatgtagtca taaataggat	1380
tattgtcgcc aaggtggtac ttgccggaca agacttcttc ttttagaatt ctgcgattct	1440
ctttagggcc gtatgaagca cacttcgaca actcgtgttc ttctaaacca aacatagaag	1500

ES 2 643 442 T3

gttctaattg gaaggtcttc aatttaagtt cggacgatgt cggatcaata tgccagacag 1560
tagttttgcc tataggtgat acttcgtcta acccaacatg tccccaaact ataaaagttt 1620
cgcttcctgg atataccaaa gcggctgcct tggcatattc aggcgcaagt tcctttgagt 1680
aaacgoccaa tattctcttg tttacgtggc taactggatg tagaagtggc cccagtacgt 1740
tgaaaacagt cggaattcca agaaatttgc gtatcttaga aacgtggccc attccatgat 1800
gaaaaaaagg agcaagtaga aacatgaacg tattatcagg ccaaagtttg ggcaactgtcg 1860
atgaattaac cttgaacatg tcacagccta aagttccaat taggtcacca gctccactat 1920
tggatgtaga agctttacca ccgtgcttac aaatttttag gccctgaatt ccggaggcaa 1980
cgatagcagc agacgtggaa acattaaaag tattctgtcc gtcaccacca gtacctacaa 2040
tatctaagat tactgggtcca tcttccgggt gtaattcgtc cttcttgggg aaaggtagat 2100
caacaagggtc ggaatgtctg agcacagcct ttgcagcttc cgcaatgtat tcagccttgt 2160
gatcaagttt agtaactctc aaggccgtga gaaaactcga aactttggta tagatggaaa 2220
gactctcatc gctatgtgta tcacattttt gcaaagact taatataacc agcaacgcgt 2280
cgtgtaggtc tgtgtactc aattgcggcg gagaagccaa taatttcttg gtgtaagata 2340
gcaaagtcgc ctccgacatg atatcttaat ctctagatt gggtttcaact caaggtttat 2400
gttcacgcga ggcgcccgcg acggcaggat tgggtgagtgt gtaccaacct caacctgggtg 2460
tcagcaacca ttctggcact cagccccctc gagtgcaga aaaaaggtag ttgagatcat 2520
aaatctccag ctccaccagc tgccctgcaca tgcattatt ttctctctg gttggcagca 2580
tcggatcaga agctcccgac acagtcaatt tcgtcgcat ccctgccatt cctgggtcatt 2640
ccatgtaatg gaataagccc gcgggtggcg acgtcccatg tgcaggtgct ctgcaggcgg 2700
ccgcatatg catcctaggc ctatcggtgg tgacgcgtcc atccaccat tcggcttggt 2760
ccagttgttc gcgaaaacga gcgacgtcct gtggcgataa cacgccggga atgtggtaca 2820
tcat 2824

<210> 17
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador para UP-ybiX-F

<400> 17
cctcaatcaa caagagcggc taccg 25

<210> 18
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador para DOWN-ybiX-R

<400> 18
gcacgcact cttcacattc atccag 26

<210> 19
<211> 383

<212> PRT

<213> *Saccharomyces kudriavzevii*

<400> 19

5

```

Met Leu Glu Ala Ala Leu Leu Ser Leu Thr Lys Lys Leu Leu Val Ser
 1              5              10              15

Pro Pro Lys Leu Thr Ser Thr Asp Leu His Asp Ala Leu Leu Val Ile
      20              25              30

Leu Asp Leu Leu Arg Lys Cys Asp Met Asn Asp Asp Glu Ser Leu Ser
      35              40              45

Ile Tyr Thr Lys Val Ser Ser Phe Leu Thr Ala Leu Arg Val Thr Gln
      50              55              60

Leu Asp His Lys Ala Glu Tyr Ile Ala Glu Ala Ala Lys Ala Val Leu
65              70              75              80

Arg His Ser Asp Leu Val Asp Leu Pro Ser Pro Ala Lys Ser Glu Ser
      85              90              95

His Pro Glu Lys Gly Pro Ile Thr Leu Asp Ile Val Gly Thr Gly Gly
      100              105              110

Asp Gly Gln Asn Thr Phe Asn Val Ser Thr Ser Ala Ala Ile Val Ala
      115              120              125

Ala Gly Ile Pro Gly Leu Lys Ile Cys Lys His Gly Gly Lys Ala Ser
      130              135              140

Thr Ser Asn Ser Gly Ala Gly Asp Leu Ile Gly Thr Leu Gly Cys Asp
145              150              155              160

Ile Ser Lys Val Asn Ser Ser Thr Val Pro Gly Leu Trp Pro Asp Asn
      165              170              175

Thr Phe Leu Phe Leu Leu Ala Pro Phe Phe His His Gly Met Ser His
      180              185              190

```

ES 2 643 442 T3

Val Ser Lys Ile Arg Lys Leu Leu Gly Ile Pro Thr Ile Phe Asn Val
195 200 205

Leu Gly Pro Leu Leu His Pro Ile Ser His Val Asn Lys Arg Ile Leu
210 215 220

Gly Val Tyr Ser Lys Glu Leu Ala Pro Glu Tyr Ala Lys Ala Ala Ala
225 230 235 240

Leu Val Tyr Pro Glu Ser Glu Thr Phe Ile Val Trp Gly His Val Gly
245 250 255

Leu Asp Glu Val Ser Pro Ile Gly Lys Thr Thr Val Trp His Ile Asp
260 265 270

Pro Leu Ser Ser Ala His Ser Asn Asp Gln Leu Lys Thr Phe Gln Leu
275 280 285

Glu Pro Ser Met Phe Gly Leu Lys Glu His Glu Leu Ser Glu Cys Ala
290 295 300

Ser Tyr Gly Pro Lys Glu Asn Ala Arg Ile Leu Arg Glu Glu Ile Leu
305 310 315 320

Ser Gly Lys Tyr His Leu Gly Asp Asn Asn Ala Ile Tyr Asp Tyr Ile
325 330 335

Leu Met Asn Thr Ala Val Leu Tyr Cys Leu Ser Gln Gly His Gln Asn
340 345 350

Trp Lys Glu Gly Ile Ile Lys Ala Glu Glu Ser Ile Gln Ser Gly Asn
355 360 365

Ala Leu His Ser Leu Glu His Phe Ile Thr Ser Val Asn Ser Leu
370 375 380

<210> 20
<211> 384
<212> PRT
<213> Saccharomyces arboricola

<400> 20

Met Ser Glu Ala Thr Leu Leu Ser Phe Thr Lys Lys Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Pro Pro Gln Leu Ser Ser Thr Asp Leu His Asp Ala Leu Leu Val Ile
20 25 30

ES 2 643 442 T3

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

ES 2 643 442 T3

Leu Glu Pro Ser Met Phe Gly Leu Glu Glu His Glu Leu Ser Glu Cys
 290 295 300

Ala Ser Phe Gly Pro Gln Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Glu Asp Ile
 305 310 315 320

Leu Ser Gly Lys Tyr His Leu Gly Asp Ser Asn Ala Val Tyr Asp Tyr
 325 330 335

Ile Leu Met Asn Thr Ala Val Leu Tyr Cys Leu Ser Gln Gly His Gln
 340 345 350

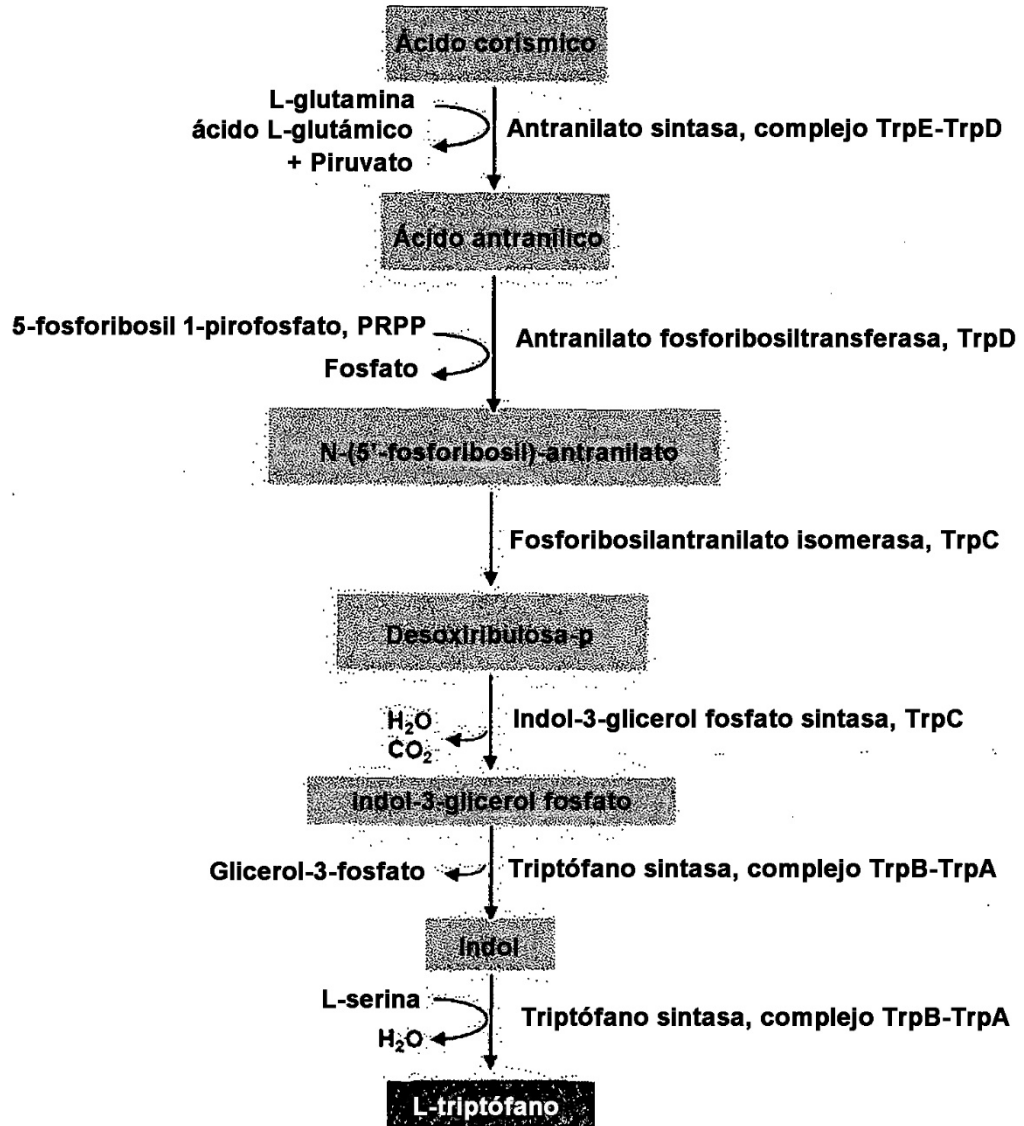
Asn Trp Lys Glu Gly Ile Ile Lys Ala Glu Glu Ser Ile Gln Ser Gly
 355 360 365

Asn Ala Leu Arg Ser Leu Glu His Phe Ile Ala Gly Val Ser Ser Leu
 370 375 380

REIVINDICACIONES

- 5 1. Microorganismo recombinante del género *Escherichia* con productividad mejorada de L-triptófano, en el que el microorganismo recombinante ha sido modificado para expresar antranilato fosforibosiltransferasa de levadura.
- 10 2. Microorganismo recombinante del género *Escherichia* según la reivindicación 1, en el que la antranilato fosforibosiltransferasa de levadura presenta una secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1.
- 15 3. Microorganismo recombinante del género *Escherichia* según la reivindicación 1, en el que la modificación se consigue mediante transformación con un vector que comprende un polinucleótido codificante de la antranilato fosforibosiltransferasa o mediante la inserción del polinucleótido en un cromosoma.
- 20 4. Microorganismo recombinante del género *Escherichia* según la reivindicación 3, en el que el polinucleótido presenta una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID nº 9.
- 25 5. Microorganismo recombinante del género *Escherichia* según la reivindicación 1, en el que el microorganismo del género *Escherichia* es *Escherichia coli*.
6. Método de producción de L-triptófano, que comprende las etapas de:
 - cultivar un microorganismo recombinante del género *Escherichia* que presenta una productividad mejorada de L-triptófano según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y
 - recuperar L-triptófano a partir del cultivo.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

S. cerevisiae MSEATLLSYTKKLIASPPQLSSTDLDHALLVILSLLOKCDTNSDESLSIYT
S. kudriavzevii MLEAALLSLTKKLIIVSPEKLTSTDLDHALLVILDLIRKCDNDDESLSIYT
S. arboricola MSEATLLSETKKLIASPPQLSSTDLDHALLVILDLLOKCDTNNDETLSIYT

S. cerevisiae KVSSFLTALRVTKLDHKAEYIAEAAKAVLRHSDLVDLETPKKDELHPEDGP
S. kudriavzevii KVSSFLTALRVTKLDHKAEYIAEAAKAVLRHSDLVDLESPAKSESHPKGP
S. arboricola KVSSFLTALRVSKLDHKAEYIAEAAKAVLKYSDDLVDLELPANSEKSRLESEP

S. cerevisiae VILDIVGTGGDGQNTFNVSTSAAIIVASGIGLICKHGGKASTSNSGAGDL
S. kudriavzevii IILDIVGTGGDGQNTFNVSTSAAIIVAGIGLICKHGGKASTSNSGAGDL
S. arboricola VALDIVGTGGDGQNTFNVSTSAAIIVASGIGLICKHGGKASTSNSGAGDL

S. cerevisiae IGTLCGDMFKVNSSTVEKLWPDNTFMFLAPFFHHGMCVSKIRKELGIPT
S. kudriavzevii IGTLCGDISKVNSSTVEKLWPDNTFLFLLAPFFHHGMSHVSKIRKELGIPT
S. arboricola IGTLCGDVSKVNSSTVRLWPDNTFLFLLAPFFHHGMCVVARIRKELGIPT

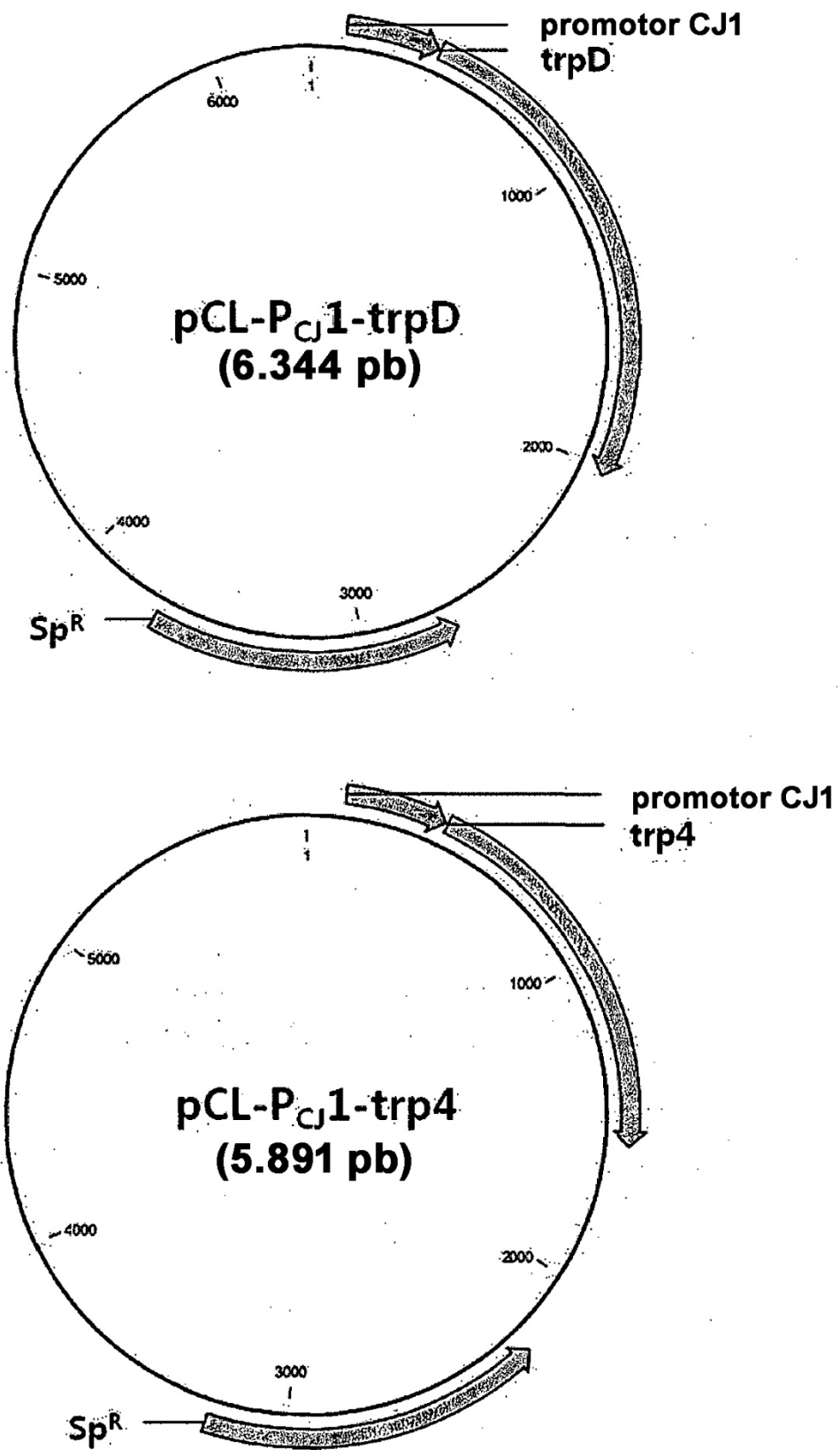
S. cerevisiae VFENVLGPLLHPVSHVVKRILGVYSKELAPEYAKAAALVYFQSETFIVWGHV
S. kudriavzevii IFENVLGPLLHPISHVVKRILGVYSKELAPEYAKAAALVYPESETFIVWGHV
S. arboricola IFENVLGPLLHPVSHVVKRVLGVYSKELAPEYAKAAALVYPESETFIVWGHV

S. cerevisiae GLDEVSPIGKTTVWHIDPIS...SELEKLTFOLEPSMFGLEEHELSECAS
S. kudriavzevii GLDEVSPIGKTTVWHIDFLSSAH.SNDQLKTFOLEPSMFGLEEHELSECAS
S. arboricola GLDEVSPIGKTTVWHINPILSSHNETQMKTFOLEPSMFGLEEHELSECAS

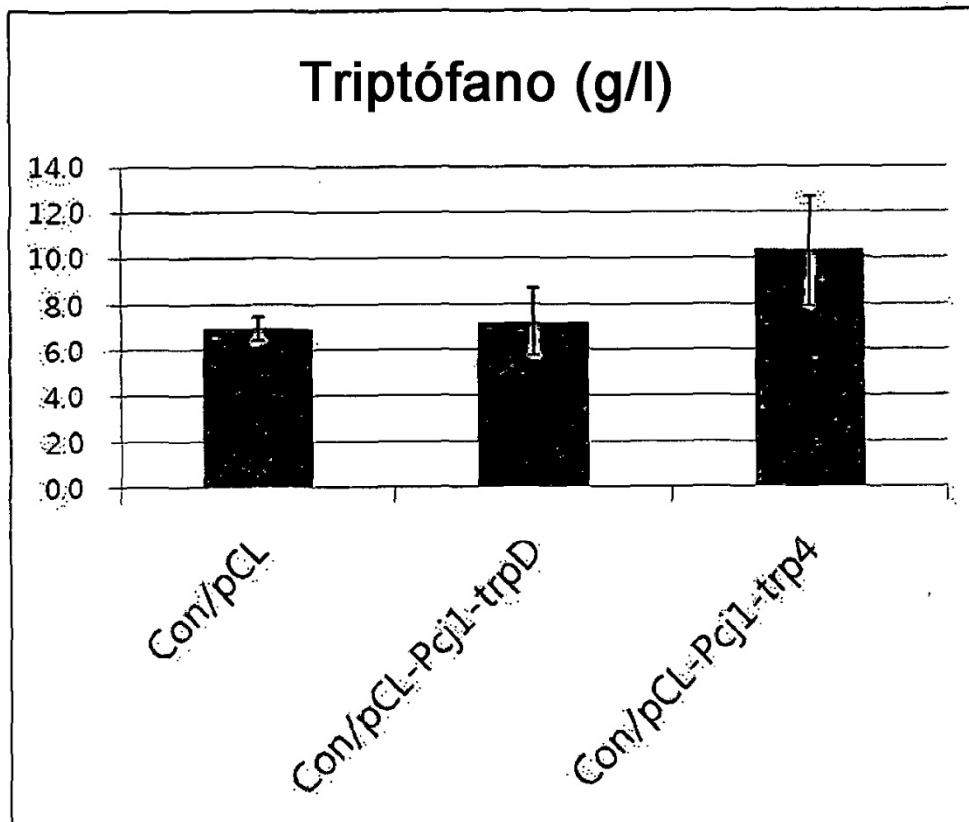
S. cerevisiae YGPRNARILKEEVLSGKYHLGDNNETIDYILMNTAVILYCLSQGHQNWKEG
S. kudriavzevii YGPRNARILREEILSGKYHLGDNNETIDYILMNTAVILYCLSQGHQNWKEG
S. arboricola EGPENARILKEEILSGKYHLGLSNVYDYILMNTAVILYCLSQGHQNWKEG

S. cerevisiae IIAEESIHSIGNALRSLEHFIDSVSSL.
S. kudriavzevii IIAEESIQSIGNALRSLEHFITSVSSL.
S. arboricola IIAEESIQSIGNALRSLEHFIAGVSSL.

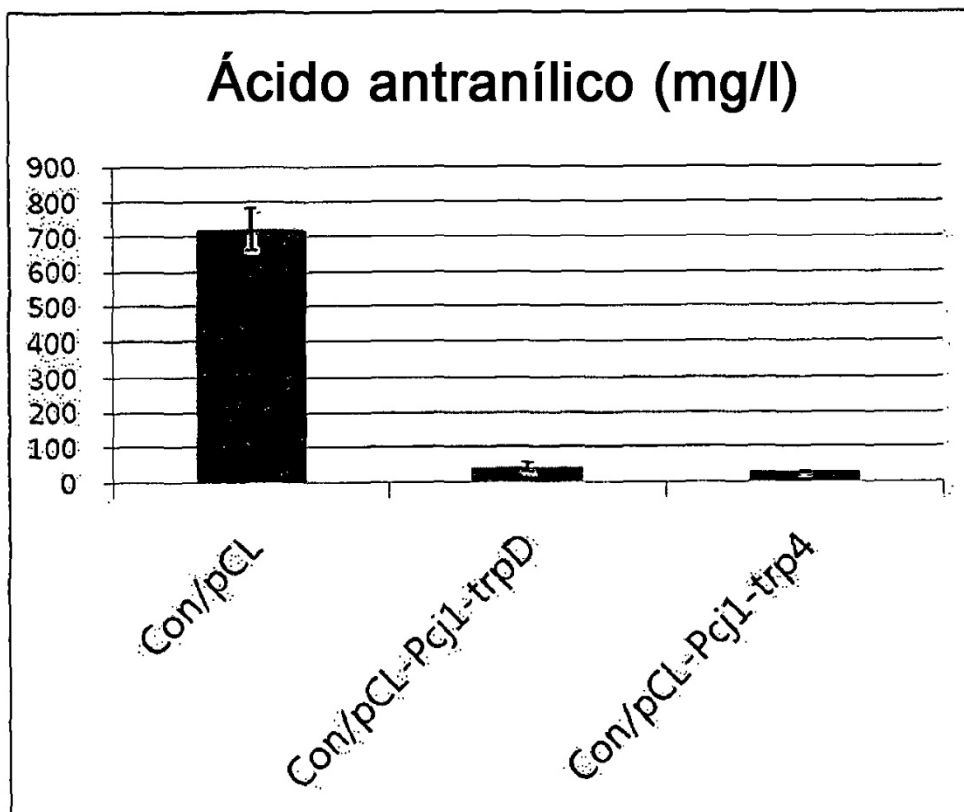
[Fig. 3]



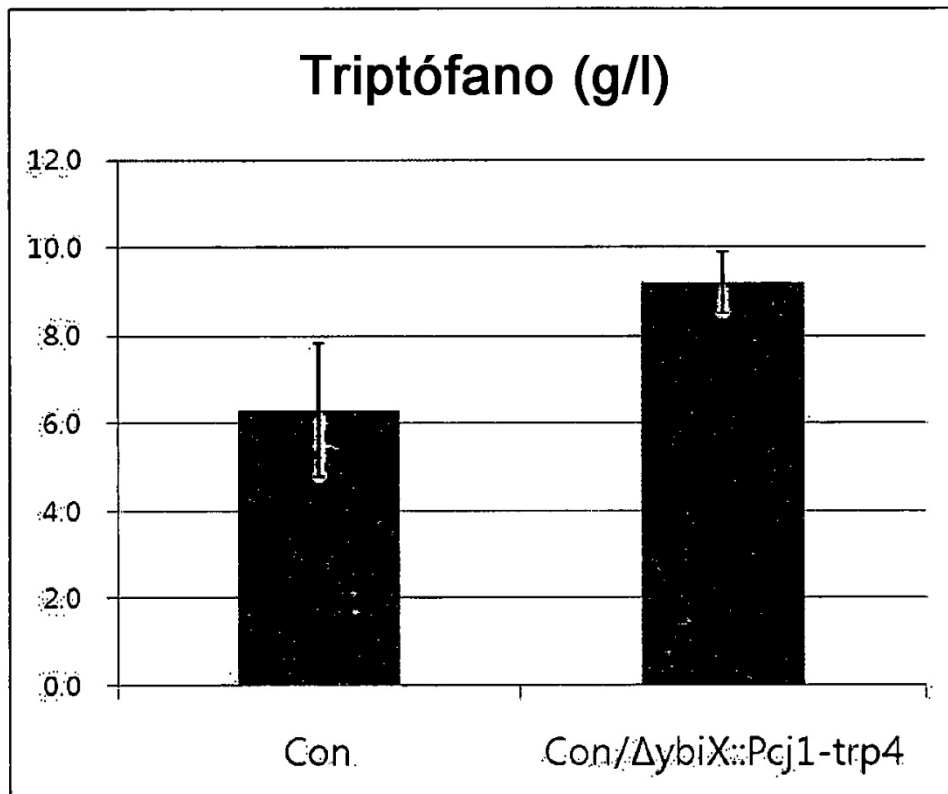
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

