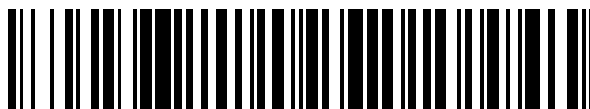


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 918 459**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 13/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2015 PCT/KR2015/006350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15199406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2015 E 15811391 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2022 EP 3159401**

54 Título: **Microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano y método para producir L-triptófano mediante el uso del mismo**

30 Prioridad:

23.06.2014 KR 20140076698

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

15.07.2022

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
Dongho-ro 330, Ssangnim-dong, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**CHEONG, KI YONG;
KIM, KYUNG RIM;
LEE, SEOK MYUNG;
LEE, KWANG HO;
LEE, KEUN CHEOL y
HONG, HYEONG PYO**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 918 459 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 del género *Escherichia* que produce L-triptófano y método para producir L-triptófano mediante el uso del mismo

Campo Técnico

La presente solicitud se refiere a un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano y un método para producir L-triptófano mediante el uso de este microorganismo.

Antecedentes de la Técnica

El L-triptófano, que es un aminoácido esencial, se ha usado ampliamente como un aditivo para piensos, etc., y además como materia prima para productos farmacéuticos, tales como soluciones de infusión e ingredientes de alimentos saludables. El L-triptófano se puede producir por un método de síntesis química, un método de reacción enzimática, un método de fermentación, etc., pero en la actualidad se usa principalmente el método de fermentación directa mediante el uso de un microorganismo.

Con respecto a la dirección del desarrollo de una cepa productora de L-triptófano, el desarrollo progresó inicialmente mediante la selección de mutaciones (patente coreana núm. 1987-0001813), o por métodos para superar la inhibición por retroalimentación del triptófano por parte de las enzimas en las rutas de biosíntesis junto con la ingeniería genética, o por el aumento de la síntesis de enzimas en procesos metabólicos, tales como el aumento de la expresión de las enzimas de biosíntesis de triptófano.

Mientras tanto, previamente se describe un método para mejorar los L-aminoácidos mediante el uso de la ruta de *Entner-Doudoroff* (patente de Estados Unidos núm. 7432085). La patente de Estados Unidos núm. 7432085 se refiere a un método para mejorar la producción de un L-aminoácido que se produce por una ruta de biosíntesis que utiliza ácido pirúvico como un intermediario, al aumentar las actividades de las enzimas involucradas en la ruta de *Entner-Doudoroff*, y específicamente, una característica clave de la patente es aumentar la actividad de 6-fosfogluconato deshidratasa o 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa.

Sin embargo, los presentes inventores han confirmado por primera vez que, en el caso del L-triptófano, a diferencia de otros L-aminoácidos, cuando las actividades de 6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa en la ruta de *Entner-Doudoroff* se inactivan, la capacidad de producir L-triptófano se puede mejorar significativamente, de esta manera se completa la presente invención con respecto al microorganismo del género *Escherichia* con una capacidad mejorada de producir L-triptófano y un método para producir L-triptófano mediante el uso del microorganismo.

Descripción

Problema Técnico

Un objetivo de la presente solicitud es proporcionar un microorganismo que produce L-triptófano.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir eficazmente L-triptófano mediante el uso del microorganismo que produce L-triptófano.

Solución Técnica

Para lograr los objetivos anteriores, en un aspecto, la presente solicitud proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano mediante la inactivación de las actividades endógenas de la 6-fosfogluconato deshidratasa (edd) y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (eda).

La invención proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano, en donde se inactivan las actividades endógenas de la 6-fosfogluconato deshidratasa (Edd) y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (Eda). La invención proporciona además un método para preparar L-triptófano, que comprende: cultivar el microorganismo del género *Escherichia* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un medio; y recuperar L-triptófano del medio de cultivo o del microorganismo que se cultiva.

Como se usa en la presente descripción, el término "L-triptófano", se refiere a un L-aminoácido aromático, que es un α -aminoácido y un aminoácido esencial que no se sintetiza *in vivo* que tiene una fórmula química de $C_{11}H_{12}N_2O_2$.

Como se usa en la presente descripción, el término "ruta de *Entner-Doudoroff*" se refiere a una ruta metabólica del carbono presente en un microorganismo del género *Escherichia*, que es una ruta que cataliza la conversión de fuentes de carbono que se introducen en la ruta metabólica del carbono en gliceraldehído-3-fosfato y piruvato a

través de una reacción enzimática en serie de dos etapas por la 6-fosfogluconato deshidratasa y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa.

Como se usa en la presente descripción, el término "6-fosfogluconato deshidratasa (Edd; EC 4.2.1.12)" se refiere a una enzima involucrada en la ruta de *Entner-Doudoroff*, que cataliza la reacción de conversión de 6-fosfo-D-gluconato en 2-dihidro-3-desoxi-6-fosfo-D-gluconato. Específicamente, la enzima puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, pero cualquier secuencia que tenga la actividad de la enzima se puede incluir sin limitación. Adicionalmente, en una modalidad ilustrativa, el gen que codifica la 6-fosfogluconato deshidratasa se puede representar por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, pero cualquier secuencia que codifique la enzima se puede incluir sin limitación.

Como se usa en la presente descripción, el término "2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (Eda; EC 4.1.2.14)" se refiere a una enzima involucrada en la ruta de *Entner-Doudoroff*, que cataliza la reacción de conversión de 2-dihidro-3-desoxi-6-fosfo-D-gluconato en gliceraldehído-3-fosfato y piruvato. Específicamente, la enzima puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, pero cualquier secuencia que tenga la actividad de la enzima se puede incluir sin limitación. Adicionalmente, en una modalidad ilustrativa, el gen que codifica la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa se puede representar por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 4, pero cualquier secuencia que codifique la enzima se puede incluir sin limitación.

Cada una de las enzimas que se describieron anteriormente se pueden incluir sin limitación, además de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 1 a 3, cualquier secuencia de aminoácidos que tenga una homología del 70 % o mayor, específicamente 80 % o mayor, más específicamente 90 % o mayor, incluso más específicamente 95 % o mayor, aún incluso más específicamente 98 % o mayor, y aún más específicamente 99 % o mayor, con cada una de las secuencias de aminoácidos enumeradas anteriormente, siempre que la enzima exhiba un efecto sustancialmente igual o correspondiente a cada una de las enzimas. Adicionalmente, es obvio que cualquier enzima modificada que tenga la homología que se describió anteriormente y tenga el efecto correspondiente a cada enzima puede pertenecer al alcance de la presente solicitud, aunque la enzima puede tener una secuencia de aminoácidos con una eliminación parcial, modificación, sustitución o adición.

Adicionalmente, los genes que codifican cada una de las enzimas pueden incluir además sin limitación, además de las secuencias de nucleótidos representadas por la SEQ ID NO 2 o 4, cualquier secuencia génica que codifique las enzimas, que tenga una homología del 80 % o mayor, específicamente 90 % o mayor, más específicamente 95 % o mayor, incluso más específicamente 98 % o mayor, y aún incluso más específicamente 99 % o mayor, con cada una de las secuencias de nucleótidos enumeradas anteriormente, siempre que la secuencia codifique una enzima que tenga un efecto sustancialmente igual o correspondiente a cada una de las enzimas. Adicionalmente, es obvio que cualquier secuencia de nucleótidos que tenga las homologías anteriores puede pertenecer al alcance de la presente solicitud, aunque la secuencia puede tener una eliminación parcial, modificación, sustitución o adición en esta.

Como se usa en la presente descripción, el término "homología" se refiere a un porcentaje de identidad entre dos fracciones de polinucleótidos o de polipéptidos. La correspondencia de secuencia de una fracción con respecto a la otra se puede determinar mediante una práctica conocida en la técnica. Por ejemplo, la homología se puede determinar directamente mediante la alineación de la información de la secuencia (por ejemplo, parámetros tales como la puntuación, la identidad y la similitud) de dos moléculas polinucleotídicas o dos moléculas polipeptídicas mediante el uso de un programa informático (por ejemplo, BLAST 2.0) que esté fácilmente disponible y que sea capaz de alinear la información de la secuencia. Adicionalmente, la homología se puede determinar mediante la hibridación de los polinucleótidos bajo la condición de formar una cadena doble estable en las regiones homólogas y luego digerir la cadena hibridada con una nucleasa específica de cadena simple para determinar el tamaño de los fragmentos digeridos.

Como se usa en la presente descripción, el término "actividad endógena" se refiere a un estado activo de una enzima en un microorganismo en un estado natural o antes de la modificación.

Como se usa en la presente descripción, el término "debilitamiento de la actividad de una enzima en comparación con su actividad endógena" se refiere a un concepto que incluye un caso donde hay una disminución en la actividad de una enzima en un microorganismo en comparación con la que originalmente poseía en su estado natural o antes de la modificación, un caso donde el nivel de expresión total de la proteína es inferior al de la cepa de tipo salvaje o al de la cepa antes de la modificación del microorganismo se debe a la inhibición de la expresión o inhibición de la traducción del gen que codifica el mismo, o una combinación de estos.

Como se usa en la presente descripción, el término "inactivación" se refiere a un caso donde el gen que codifica una enzima en un microorganismo no se expresa en absoluto y un caso donde el gen se expresa pero no exhibe actividad en comparación con la cepa de tipo salvaje o la cepa antes de la modificación del microorganismo.

El debilitamiento o inactivación de una actividad enzimática se puede lograr mediante varios métodos que se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de los métodos pueden incluir un método para sustituir el gen que codifica la enzima en el cromosoma con un gen mutado de modo que la actividad enzimática se pueda reducir, lo que incluye

el caso cuando se elimina la actividad enzimática; un método para introducir una modificación en la secuencia de control de la expresión del gen que codifica la enzima en el cromosoma; un método para sustituir la secuencia de control de la expresión del gen que codifica la enzima con una secuencia que tiene una actividad débil o nula; un método para eliminar una parte o la totalidad de un gen que codifica la enzima en el cromosoma; un método para introducir un oligonucleótido antisentido (por ejemplo, ARN antisentido), que inhibe la traducción del ARNm a una enzima por una unión complementaria al transcrito del gen en el cromosoma; un método para hacer imposible la unión del ribosoma mediante la formación de una estructura secundaria mediante la adición artificial de una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) y su secuencia complementaria en el extremo frontal de la secuencia SD del gen que codifica la enzima; un método de ingeniería genética de transcripción inversa (RTE), que añade un promotor de manera que se transcriba inversamente en el extremo 3' del marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia correspondiente, etc., e incluye además una combinación de estos, pero no se limitan a ellos.

Específicamente, el método para eliminar parte o la totalidad de un gen que codifica una enzima se puede realizar mediante la sustitución del polinucleótido que codifica una proteína diana endógena dentro del cromosoma con un polinucleótido o un gen marcador que tiene una eliminación parcial en la secuencia de ácido nucleico, mediante el uso de un vector para la inserción cromosómica en la bacteria. En una modalidad ilustrativa del método para eliminar parte o la totalidad de un gen, el gen se puede eliminar por recombinación homóloga.

Como se usa en la presente descripción, el término "parte", aunque puede variar en dependencia de los tipos de polinucleótidos, se puede referir específicamente a de 1 nucleótido a 300 nucleótidos, más específicamente de 1 nucleótido a 100 nucleótidos, e incluso más específicamente de 1 nucleótido a 50 nucleótidos, pero no se limitan particularmente a ello.

Como se usa en la presente descripción, el término "recombinación homóloga" se refiere a la recombinación genética que se produce a través del entrecruzamiento en los loci de la cadena genética que tienen una homología mutua.

Específicamente, la secuencia de control de la expresión se puede modificar por la inducción de una modificación de la secuencia de control de la expresión a través de la eliminación, inserción, sustitución conservativa o no conservativa, o una combinación de estas en la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de control de la expresión; o mediante la sustitución con un promotor más débil, etc. La secuencia de control de la expresión puede incluir un promotor, una secuencia operadora, una secuencia que codifica una región de unión a ribosomas y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

Además, la secuencia génica en el cromosoma puede modificarse mediante la inducción de una modificación en la secuencia por eliminación, inserción, sustitución conservativa o no conservativa, o una combinación de estas en la secuencia génica para debilitar aún más la actividad enzimática; o mediante la sustitución con una secuencia génica que se mejoró para tener una actividad más débil o una secuencia génica que se mejoró para no tener actividad.

En una modalidad ilustrativa de la presente solicitud, se confirmó que la inactivación de la actividad se puede realizar mediante al menos un método de mutación seleccionado del grupo que consiste en una mutación por inserción que se realiza mediante la inserción de al menos un par de bases en el gen que codifica la 6-fosfogluconato deshidratasa y en el gen que codifica la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa; una mutación por eliminación que se realiza al tener una eliminación en al menos un par de bases dentro del gen; y una mutación de transición o transversión de un par de bases que se realiza mediante la introducción de un codón sin sentido o un codón diferente en el gen.

En la presente solicitud, el microorganismo del género *Escherichia* puede ser específicamente *Escherichia coli*, pero no se limita a ello.

Específicamente, la cepa original del microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano mediante la inactivación de las actividades de *edd* y *eda* puede no estar particularmente limitada siempre que el microorganismo pertenezca al género *Escherichia*. Por ejemplo, el microorganismo que produce L-triptófano puede ser un microorganismo en el que, para aumentar la ruta de biosíntesis, las actividades del gen en la ruta competitiva, el regulador en la ruta direccional del operón triptófano y el gen para introducir y descomponer el triptófano se debilitaron o inactivaron, y/o se sobreexpresó la actividad del operón triptófano. Los métodos para debilitar o inactivar la actividad son los mismos que se explicaron anteriormente, y los métodos que se conocen en la técnica se incluyen sin limitación. Adicionalmente, los métodos para sobreexpresar la actividad del operón triptófano que se conocen en la técnica se incluyen sin limitación. Por ejemplo, los métodos pueden incluir un método de introducción adicional de un polinucleótido, que incluye parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos del gen del operón o una región de control de la expresión que se introduce desde el exterior, en el cromosoma; un método para aumentar el número de copias mediante la introducción en un sistema vector; un método para aumentar la actividad del operón mediante la sustitución de la secuencia de control de la expresión que controla la expresión del gen con otra secuencia de control de la expresión, una modificación que tiene una mutación inducida en parte o la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la región de control de la expresión y una introducción de una modificación del propio gen, etc., pero no se limitan a ellos. Específicamente, el microorganismo puede ser *E. coli*, en la que parte o la totalidad del gen *pheA*, el gen *trpR*, el gen *mtr* y el gen *tnaAB* se elimina y/o el operón triptófano se sobreexpresa.

En la presente solicitud, el gen *edd*, el gen *eda*, el gen *pheA*, el gen *trpR*, el gen *mtr*, el gen *tnaAB* y el operón triptófano, y las secuencias de proteínas que estos codifican se pueden obtener de una base de datos conocida, por ejemplo, GenBank de NCBI, pero no se limitan a ello. Adicionalmente, los detalles específicos con respecto al gen *pheA*, el gen *trpR*, el gen *mtr* y el gen *tnaAB* se pueden encontrar en la descripción de la patente coreana núm. 10-0792095.

A partir de las modalidades ilustrativas de la presente solicitud, se confirmó que, con respecto a la inactivación de las actividades de 6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa en diversas cepas originales, cualquier microorganismo del género *Escherichia*, independientemente de su cepa original, mejoró significativamente la producción de L-triptófano cuando las actividades de 6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa se inactivaron juntas.

La presente solicitud proporciona un método para preparar L-triptófano, que incluye el cultivo de un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano mediante la inactivación de las actividades endógenas de la 6-fosfogluconato deshidratasa (*edd*) y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (*eda*) de la presente solicitud; y recuperar L-triptófano del medio de cultivo o del microorganismo que se cultiva.

El medio y otras condiciones de cultivo que se usan para cultivar el microorganismo de la presente solicitud particularmente no se limitan, sino que se pueden usar cualquier medio convencional para el cultivo de microorganismos del género *Escherichia*. Específicamente, el microorganismo de la presente solicitud se puede cultivar en un medio convencional que contiene fuentes apropiadas de carbono, fuentes de nitrógeno, fuentes de fósforo, compuestos inorgánicos, aminoácidos y/o vitaminas, etc., en condiciones aeróbicas mientras se ajusta la temperatura, el pH, etc.

Los ejemplos de las fuentes de carbono a usar en la presente solicitud pueden incluir carbohidratos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, sorbitol, etc.; alcoholes tales como alcoholes de azúcar, glicerol, piruvato, lactato, citrato, etc.; y aminoácidos tales como ácido orgánico, ácido glutámico, metionina, lisina, etc. Adicionalmente, nutrientes orgánicos naturales tales como hidrolizado de almidón, melaza, melaza de caña, salvado de arroz, almidón de yuca, melaza de caña de azúcar, licor de maceración de maíz, etc., y específicamente, carbohidratos tales como glucosa y melaza pretratada estéril (es decir, melaza convertida en un azúcar reductor), etc. Además, se pueden usar sin limitación diversas otras fuentes de carbono en una cantidad adecuada. Estas fuentes de carbono se pueden usar solas o en una combinación de dos o más.

Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno a usar en la presente solicitud pueden incluir compuestos inorgánicos, tales como amoniaco, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, nitrato de amonio, etc.; aminoácidos, tales como ácido glutámico, metionina, glutamina, etc.; y fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta, licor de maceración de maíz, hidrolizado de caseína, pescado o productos de descomposición de este, y torta de soja desgrasada o productos de descomposición de esta, etc. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar solas o en combinación de dos o más.

Los ejemplos de las fuentes de fósforo a usar en la presente solicitud pueden incluir fosfato monobásico de potasio, fosfato dipotásico dibásico, las correspondientes sales que contienen sodio, etc., pero no se limitan a ello. Los ejemplos de compuestos inorgánicos pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de hierro, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, carbonato de calcio, etc., y adicionalmente se pueden incluir aminoácidos, vitaminas y/o precursores adecuados para un medio de cultivo. Estos medios o precursores se pueden añadir a un cultivo mediante un cultivo discontinuo o un cultivo continuo.

En la presente solicitud, el pH de un cultivo se puede ajustar durante el cultivo por la adición de forma adecuada al cultivo de un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico. Durante el periodo de cultivo, se puede añadir un agente antiespumante, tal como éster de poliglicol de ácido graso, para evitar la generación de espuma. Adicionalmente, se puede inyectar en el cultivo oxígeno o un gas que contenga oxígeno para mantener un estado aeróbico del cultivo; o se puede inyectar gas nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono sin la inyección de un gas para mantener un estado anaeróbico o microaeróbico del cultivo.

La temperatura del cultivo generalmente puede estar en un intervalo de 27 °C a 40 °C, y específicamente, de 30 °C a 37 °C, pero no se limita a ello. El cultivo se puede continuar hasta que se obtenga la cantidad de materiales útiles deseados, y específicamente de 10 horas a 100 horas, pero no se limita a ello.

El L-triptófano se puede recuperar mediante un método adecuado que se conoce en la técnica, por ejemplo, cultivo discontinuo, cultivo continuo o cultivo discontinuo alimentado, etc., de acuerdo con el método de cultivo de la presente solicitud.

La recuperación además puede incluir una etapa de purificación.

Los L-aminoácidos se pueden liberar en el medio de cultivo que se cultiva o se pueden contener en los microorganismos.

Efectos Ventajosos de la Invención

La presente solicitud proporciona un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano mediante la inactivación de la actividad endógena de la 6-fosfogluconato deshidratasa y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa y, de este modo, la presente solicitud proporciona un efecto que el L-triptófano se puede producir con mayor rendimiento y con mayor eficiencia y rentabilidad mediante el uso del microorganismo.

Modos para llevar a cabo la invención

A continuación, la presente solicitud se describirá en detalle con ejemplos acompañantes. Sin embargo, los ejemplos que se describen en la presente descripción son solo para fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la presente solicitud.

Ejemplo Comparativo 1: Preparación de una cepa original ($\Delta pheA \Delta trpR \Delta mtr \Delta tnaAB/pCL1920-Ptrc-trpO$)

(1) Preparación de una cepa de tipo salvaje en la que se inactivan las proteínas que codifican los genes *pheA*, *trpR*, *mtr* y *tnaAB*

Para aumentar la ruta de biosíntesis del triptófano por la cepa original, el gen *pheA*, que es un gen en la ruta competitiva; el gen *trpR*, que es un regulador del operón triptófano y de la ruta direccional; el gen *mtr*, que es un gen para introducir triptófano; y los genes *tnaA* y *tnaB*, que son genes para introducir y descomponer triptófano, se inactivaron todos, y de esta manera se examina mejor la capacidad de producir triptófano del microorganismo de la presente solicitud. La corismato mutasa/prefenato hidratasa que codifica el gen *pheA*; el represor transcripcional *trpR* que codifica el gen *trpR*; el triptófano/indol: simportador de H^+ por el gen *mtr*; y la triptofanasa y el triptófano: simportador de H^+ que codifica los genes *tnaA* y *tnaB* en forma de un operón se inactivaron todos por recombinación homóloga de los genes en *E. coli W3110* (ATCC® 39936™). Para este fin, se emplea el método de inactivación de una sola etapa mediante el uso de la recombinasa lambda Red que desarrollaron Datsenko KA y otros, y la inactivación se realizó en base al método que se describe en la patente coreana núm. 10-0792095. Las secuencias de los cebadores que se usan en el Ejemplo Comparativo 1 que se describe en la presente descripción, y el Ejemplo Comparativo 2 y los Ejemplos 1 y 3 que se describen a continuación se muestran en la Tabla 3 más abajo.

Específicamente, aproximadamente 1100 pares de fragmentos génicos se amplificaron por PCR mediante el uso del gen *pKD3* como molde, junto con una parte del gen *pheA* que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 6 y los cebadores 1 y 2 que tienen una secuencia de nucleótidos parcial del gen de resistencia al cloranfenicol del gen *pKD3*. Luego, los fragmentos de ADN que se obtienen por PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, se eluyeron y se usaron como molde para la segunda PCR. Para obtener los fragmentos de ADN 5' y 3' del gen *pheA* en *E. coli*, se amplificaron por PCR aproximadamente 250 pares de fragmentos génicos mediante el uso del cromosoma de *E. coli W3110* como molde, junto con los cebadores 3 y 4 y los cebadores 5 y 6. Luego, los fragmentos de ADN que se obtienen por PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, se eluyeron y se usaron como molde para la segunda PCR.

En lo anterior, las secuencias de nucleótidos de 18 pares entre el cebador 1 y el cebador 4 son complementarias y las secuencias de nucleótidos de 20 pares entre el cebador 2 y el cebador 5 son complementarias, y de este modo los fragmentos que se obtienen por el cebador 1 y el cebador 2, los que se obtienen por el cebador 3 y el cebador 4, y los que se obtienen por el cebador 5 y el cebador 6 se pueden unir como un solo fragmento. Los fragmentos de PCR que se obtienen de este modo se amplificaron 5 veces por PCR sin usar ningún cebador, se trataron con los cebadores 3 y 6 y se amplificaron de nuevo 25 veces por PCR. Como un resultado, se amplificaron fragmentos génicos con un tamaño de aproximadamente 1600 pares de bases.

Luego, *E. coli W3110*, que se transformó con pKD46, se preparó en células competentes de acuerdo con el método que desarrollaron Datsenko KA y otros, se introdujeron fragmentos génicos con un tamaño de aproximadamente 1600 pares de bases que se obtienen por PCR y se sembró en medio LB sólido que contiene cloranfenicol (30 mg/L). Después de confirmar por PCR que el gen *pheA* en la cepa que se obtiene de este modo era inactiva al tener un tamaño de 1600 pares de bases, se preparó la cepa *E. coli W3110 ΔpheA*.

De igual modo, las proteínas que codifica el gen *trpR* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 8, el gen *mtr* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 10, y los genes *tnaA* y *tnaB* que tienen las secuencias de SEQ ID NO: 12 y 14 se inactivan mediante el uso de los cebadores de la Tabla 3, se construye de esta manera una cepa *W3110 ΔpheA ΔtrpR Δmtr ΔtnaAB*.

(2) Preparación de vectores que se introducen con genes que exhiben la capacidad de producir triptófano

Para proporcionar la capacidad de producir triptófano a la cepa de tipo salvaje, *W3110ΔpheAΔtrpRΔmtrΔtnaAB*, que se preparó anteriormente, se insertó al vector *pCL1920* el promotor de *Ptrc* y el gen del operón triptófano y, de esta manera, se preparó *pCL1920-Ptrc-trpO*.

Específicamente, para insertar el promotor de *Ptrc* en el vector *pCL1920*, se recuperó el plásmido *pCL1920*, se trató con *HindIII* y *PstI*, y se preparó el promotor de *Ptrc* por PCR con la repetición de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 30 segundos mediante el uso de *pTrcHis B* (Invitrogen, EE. UU.) como molde junto con los cebadores 23 y 24. Los fragmentos del promotor de *Ptrc* que se obtienen de este modo se escindieron con *HindIII* y *PstI* y se ligaron con el vector *pCL1920*, se construye de esta manera un vector *pCL1920-Ptrc*.

Luego, para la construcción del vector *pCL1920_Ptrc_trpO*, se preparó el vector *pCL1920-Ptrc* por tratamiento con *PstI* y fosfatasa alcalina, y se amplificó el gen del operón triptófano a partir del ADN cromosómico de *E. coli KCCM10812P* (patente coreana núm. 10-0792095). El gen *trpE*, que es el primer gen del gen del operón correspondiente, tiene una forma de inhibición por retroalimentación. Para la amplificación se realizó PCR mediante el uso del ADN cromosómico de *E. coli KCCM10812P* como molde, junto con los cebadores 25 y 26 con la repetición de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 58 °C durante 30 segundos, y polimerización a 72 °C durante 5 minutos. Los fragmentos de ADN que se obtienen de este modo se trataron con *PstI* y se ligaron con el vector *pCL1920-Ptrc* que se preparó anteriormente, y el vector que se obtuvo como resultado se denomina *pCL1920_Ptrc_trpO* (SEQ ID NO: 15).

(3) Preparación de una cepa a la que se inserta un vector que contiene el operón triptófano

Después de preparar células competentes de la cepa que se prepara en el Ejemplo Comparativo 1 (1), se introdujo a la cepa el vector que se preparó en el Ejemplo Comparativo 1 (2) y, de esta manera, se preparó una cepa de tipo salvaje *W3110 ΔpheAΔtrpRΔmtrΔtnaAB/pCL1920-Ptrc-trpO* que produce triptófano.

Ejemplo 1: Preparación de una cepa *ΔeddΔeda* a partir de la cepa original del Ejemplo Comparativo 1

En la cepa de tipo salvaje *W3110 ΔpheAΔtrpRΔmtrΔtnaAB/pCL1920-Ptrc-trpO* que se preparó en el Ejemplo Comparativo 1, el grupo de genes *edd-eda* se eliminó simultáneamente mediante recombinación homóloga y, de esta manera, se preparó una cepa en la que se inactivaron tanto la 6-fosfogluconato deshidratasa como la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, codificadas por el gen *edd* (SEQ ID NO: 2) y el gen *eda* (SEQ ID NO: 4).

Específicamente, para la preparación de la cepa anterior, se usó el método de inactivación de una sola etapa, que es una tecnología de generación de mutantes mediante el uso de la recombinasa lambda Red que desarrollaron Datsenko KA y otros. Como marcador para confirmar la inserción en un gen, se usa el gen de cloranfenicol de *pUCprmfloxC* (publicación de solicitud de patente coreana núm. 2009-007554). Se amplificaron aproximadamente 1200 pares de fragmentos génicos por PCR con la repetición de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto, mediante el uso de *pUCprmfloxC* como molde junto con los cebadores 27 y 28 que tienen una parte del grupo de genes *edd-eda* y una secuencia de nucleótidos parcial del gen de resistencia al cloranfenicol del gen *pUCprmfloxC*.

Adicionalmente, los fragmentos de ADN que se obtienen por amplificación por PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, se eluyeron y se usaron como molde para la segunda PCR. La segunda PCR se diseñó para obtener 20 pares de secuencias de nucleótidos complementarias en las regiones 5' y 3' de los primeros fragmentos de ADN, y se amplificaron aproximadamente 1300 pares de fragmentos génicos por PCR con la repetición de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto, mediante el uso del primer producto de PCR como molde junto con los cebadores 29 y 30, a los que se añadieron las regiones 5' y 3' del grupo de genes *edd-eda*. Los fragmentos de ADN que se obtienen de este modo se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, se eluyeron y se usaron para la recombinación.

La bacteria *E. coli* que se transformó con *pKD46* de acuerdo con el método que desarrollaron Datsenko KA y otros, se preparó en un estado competente, y en esta se introdujo para su transformación el fragmento génico con un tamaño de 1300 pares de bases que se obtuvo por PCR. La cepa que se obtiene de este modo se selecciona de un medio LB que contiene cloranfenicol, y el producto de PCR que se obtiene mediante el uso de los cebadores 31 y 32 tenía un tamaño de 1626 pares de bases, lo que confirmó que el grupo de genes *edd-eda* se eliminó.

A la primera cepa recombinante que tiene resistencia al cloranfenicol, después de eliminar *pKD46*, se introdujo *pJW168*, se elimina de esta manera el gen marcador de cloranfenicol de la bacteria (Gene, (2000) 247, 255 - 64). La bacteria que se obtiene finalmente fue un producto que se amplifica por PCR, que se obtiene mediante el uso de los cebadores 31 y 32, que tiene un tamaño de 580 pares, de este modo se confirma que se realizó la eliminación deseada. Adicionalmente, después de preparar la cepa en un estado competente, la cepa se transformó mediante la introducción en esta del vector que se preparó en el Ejemplo Comparativo 1, se prepara de esta manera una cepa *W3110ΔpheAΔtrpRΔmtrΔtnaABΔeddΔeda/pCL1920-Ptrc-trpO* que produce triptófano.

Ejemplo 2: Confirmación de la capacidad de producir triptófano de la cepa *ΔeddΔeda*

La evaluación del título se realizó mediante el uso de la cepa que se preparó en el Ejemplo Comparativo 1 y el Ejemplo 1. Para la evaluación del título, la bacteria se inoculó con un asa de platino, se cultivó en medio LB sólido durante la noche y se inoculó con un asa de platino en cada matraz con 25 ml de medio de título que tiene la composición que se muestra en la Tabla 1 más abajo. Después de la inoculación, la cepa se cultivó a 37 °C a una velocidad de 200 rpm durante 42 horas, y los resultados que se obtienen se muestran en la Tabla 2 más abajo. Todos los resultados usados representan el valor promedio de los resultados que se obtienen en tres matraces diferentes.

Tabla 1

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	30 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Citrato de sodio	5 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	40 g
Citrato de sodio	5 g
Fenilalanina	0,15 g
Tirosina	0,1 g
pH	6,8 g

Tabla 2

Cepa	DO	Consumo de glucosa (g/l)*	L-triptófano (g/l)**
<i>W3110ΔpheAΔtrpRΔmtr ΔtnaAB/pCL1920-Ptrc-trpO</i>	30,1	24,7	0,78
<i>Ejemplo 1 (W3110ΔpheAΔtrpRΔmtrΔtnaABΔeddΔeda/pCL1920-Ptrc-trpO)</i>	29,5	25,1	1,03
* valor que se mide en el punto de tiempo de 22 horas			
** valor que se mide en el punto de tiempo de 42 horas			

Como resultado del experimento anterior, como se mostró en la Tabla 2 anterior, cuando se eliminó el grupo de genes *edd-eda* sugerido en la presente solicitud, no hubo una diferencia significativa en el consumo de glucosa en comparación con el de la cepa original del Ejemplo Comparativo 1, sin embargo, se demostró que la cantidad de producción de triptófano aumenta en aproximadamente un 32 % en comparación con la de la cepa original. Se cree que este resultado se debe al hecho de que la reacción procedió a ribulosa 5-fosfato sin pérdida de 6-fosfogluconato, que es un sustrato, por la eliminación en la ruta de *Entner Doudoroff* y, de este modo, no solo aumentó la cantidad de NADPH sino también la cantidad de 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) y eritrosa 4-fosfato (E4P), se mejora de esta manera la capacidad de producir triptófano.

Ejemplo 3: Preparación de una cepa *ΔeddΔeda* a partir de la cepa original depositada

La cepa *E. coli* *KCCM11166P* productora de L-triptófano (patente coreana núm. 10-1261147) que se depositó en el Centro de Cultivo de Microorganismos de Corea (KCCM) se trató de la misma manera que en el Ejemplo 1 y, de esta manera, se preparó una cepa *KCCM11166PΔeddΔeda*, en la que se eliminó el grupo de genes *edd-eda*.

Tabla 3

Gen	Número del cebador	Secuencia (5' → 3')	SEQ ID NO
<i>pheA</i>	1	AGGCAACACTATGACATCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	16
	2	GGTCGCCATTAACAACGTGGCATATGAATATCCTCCTTA G	17
	3	TATTGAGTGTATCGCCAAC	18
	4	CGATGTCATAGTGTGCGC	19
	5	CCACGTTGTTAATGGCGACC	20
	6	TTCATTGAACGGGTGATTTC	21
<i>trpR</i>	7	TCCGCACGTTTATGATATGCTATCGTACTCTTTAGCGAG TACAACCGGGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	22
	8	GCCACGTCTTATCAGGCCTACAAAATCAATCGCTTTTCA GCAACACCTCTCATATGAATATCCTCCTTAG	23
	9	GCGCCGGGCGTATCGACGCA	24
	10	GCATATCATAAACGTGCGGA	25
	11	TGTAGGCCTGATAAGACGTG	26
	12	AAGGGGCGATCGGCGTGTTT	27
<i>mtr</i>	13	ATGGCAACACTAACCACCACCCAAACGTCACCGTCGCT GCTTGGCGGCGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	28
	14	TTACTGATACACCGGCAGTAAATTAAAGCTCGATAAAA TATGCACCAGTGCATATGAATATCCTCCTTAG	29
	15	GCAGCCGTTACATTGGTAAC	30
	16	GTGGTGGTTAGTGTGCGCAT	31
	17	TACTGCCGGTGTATCAGTAA	32
	18	TCAAACCGTCAGCACGGCTG	33
<i>tnaAB</i>	19	ATGAAGGATTATGTAATGGAAAACCTTTAAACATCTCCCT GAACCGTTCCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	34
	20	TTAGCCAAATTTAGGTAACACGTTAAAGACGTTGCCGA ACCAGCACAAAACATATGAATATCCTCCTTAG	35
	21	TTAAGCGAAATCACCGGGGAA	36
	22	ATGTCCGAGCACTGGCGC	37

Gen	Número del cebador	Secuencia (5' → 3')	SEQ ID NO
<i>pCL1920 -Ptrc-trp O</i>	23	CCCAAGCTTGCTGTTGACAATTAATCAT	38
	24	AAAAGCTGCAGCTGTTTCTGTGTGAAAT	39
	25	AAAAGCTGCAGATGCAACACAAAAACCGACT	40
	26	AAAAGCTGCAGTTAACTGCGCGTCGCCGCTTTC	41
<i>edd-eda</i>	27	AAACGCGTTGTGAATCATCCTGCTCTGACAACTCAATTT CAGGAGCCTTTGCCGCCAGCTGAAGCTTTAC	42
	28	ACAGCACGCTTTTCAGCGCCAGGTAGTCACGGTAGTTA GCCGGAGAAATATAGTGGATCTGATGGGTACC	43
	29	TGCCCTATGAGCTCCGGTTACAGGCGTTTCAGTCATAAA TCCTCTGAATGAAACGCGTTGTGAATCATCC	44
	30	ATCGCCCGCTTCCAGCGCATCTGCCGGAACCAGCCAGG AACCACCGATGCACAGCACGCTTTTCAGCGCC	45
	31	CATGATCTTGCGCAGATTGTA	46
	32	CATGATCTTGCGCAGATTGTA	47

Ejemplo 4: Confirmación de la capacidad de producir triptófano de la cepa $\Delta edd\Delta eda$

La evaluación del título se realiza mediante el uso de la cepa depositada *KCCM11166P* y la cepa que se preparó en el Ejemplo 3.

Para la evaluación del título, la bacteria se inoculó con un asa de platino, se cultiva en medio LB sólido durante la noche y se inoculó con un asa de platino en cada matraz con 25 ml de medio de título que tiene la composición que se muestra en la Tabla 4 más abajo. Después de la inoculación, la cepa se cultivó a 37 °C a una velocidad de 200 rpm durante 42 horas, y los resultados que se obtienen se muestran en la Tabla 5 más abajo. Todos los resultados usados representan el valor promedio de los resultados que se obtienen en tres matraces diferentes.

Tabla 4

Composición	Concentración (por litro)
Glucosa	60 g
K ₂ HPO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g
NaCl	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
Citrato de sodio	5 g
Extracto de levadura	2 g
Carbonato de calcio	40 g
Citrato de sodio	5 g
Fenilalanina	0,15 g
Tirosina	0,1 g
pH	6,8 g

Tabla 5

Cepa	DO	Consumo de glucosa (g/l)*	L-triptófano (g/l)**
<i>KCCM11166P</i>	22,9	31,0	5,7
<i>KCCM11166PΔeddΔeda</i>	23,6	30,7	6,9
* valor que se mide en el punto de tiempo de 33 horas			
** valor que se mide en el punto de tiempo de 48 horas			

Como resultado del experimento anterior, como se mostró en la Tabla 5 anterior, cuando se eliminó el grupo de genes *edd-eda* sugerido en la presente solicitud, no hubo una diferencia significativa en el consumo de glucosa en comparación con el de la cepa original, sin embargo, se demostró que la cantidad de producción de triptófano aumenta en aproximadamente un 21 % en comparación con la de la cepa original. Se cree que este resultado se debe a la mejora en la capacidad de producir triptófano, como se mencionó en el Ejemplo 2 anterior.

Los presentes inventores han confirmado que la cepa que se basa en *KCCM11166P*, en la que se inactivó el grupo de genes *edd-eda*, tiene una capacidad de producir triptófano mejorada, denominaron a la cepa "*CA04-2800*" y la depositaron en el KCCM el 15 de noviembre de 2013, y se le asignó el número de depósito *KCCM11473P*.

Los resultados anteriores sugieren que la inactivación simultánea de las actividades de *edd-eda* en un microorganismo del género *Escherichia* que tiene la ruta de *Entner-Doudoroff* puede mejorar la capacidad de producir triptófano, en comparación con el microorganismo sin la inactivación de las actividades de *edd-eda*.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano y método para producir L-triptófano mediante el uso del mismo

<130> OPA15164-PCT

<150> KR 10-2014-0076698

<151> 2014-06-23

<160> 47

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 603

<212> PRT

ES 2 918 459 T3

<213> Escherichia coli

<220>

<221> PÉPTIDO

5 <222> (1)..(603)

<223> edd

<400> 1

10 Met Asn Pro Gln Leu Leu Arg Val Thr Asn Arg Ile Ile Glu Arg Ser
1 5 10 15

15 Arg Glu Thr Arg Ser Ala Tyr Leu Ala Arg Ile Glu Gln Ala Lys Thr
20 20 25 30

Ser Thr Val His Arg Ser Gln Leu Ala Cys Gly Asn Leu Ala His Gly
35 40 45

20 Phe Ala Ala Cys Gln Pro Glu Asp Lys Ala Ser Leu Lys Ser Met Leu
50 55 60

Arg Asn Asn Ile Ala Ile Ile Thr Ser Tyr Asn Asp Met Leu Ser Ala
65 70 75 80

25 His Gln Pro Tyr Glu His Tyr Pro Glu Ile Ile Arg Lys Ala Leu His
85 90 95

Glu Ala Asn Ala Val Gly Gln Val Ala Gly Gly Val Pro Ala Met Cys
30 100 105 110

Asp Gly Val Thr Gln Gly Gln Asp Gly Met Glu Leu Ser Leu Leu Ser
115 120 125

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

Phe Asp Gly Ala Leu Phe Leu Gly Val Cys Asp Lys Ile Val Pro Gly
145 150 155 160

40 Leu Thr Met Ala Ala Leu Ser Phe Gly His Leu Pro Ala Val Phe Val
165 170 175

Pro Ser Gly Pro Met Ala Ser Gly Leu Pro Asn Lys Glu Lys Val Arg
45 180 185 190

Ile Arg Gln Leu Tyr Ala Glu Gly Lys Val Asp Arg Met Ala Leu Leu
195 200 205

50 Glu Ser Glu Ala Ala Ser Tyr His Ala Pro Gly Thr Cys Thr Phe Tyr
210 215 220

Gly Thr Ala Asn Thr Asn Gln Met Val Val Glu Phe Met Gly Met Gln
225 230 235 240

55 Leu Pro Gly Ser Ser Phe Val His Pro Asp Ser Pro Leu Arg Asp Ala
245 250 255

60 Leu Thr Ala Ala Ala Ala Arg Gln Val Thr Arg Met Thr Gly Asn Gly
260 265 270

Asn Glu Trp Met Pro Ile Gly Lys Met Ile Asp Glu Lys Val Val Val
275 280 285

65 Asn Gly Ile Val Ala Leu Leu Ala Thr Gly Gly Ser Thr Asn His Thr
290 295 300

ES 2 918 459 T3

	Met	His	Leu	Val	Ala	Met	Ala	Arg	Ala	Ala	Gly	Ile	Gln	Ile	Asn	Trp	305	310	315	320
5	Asp	Asp	Phe	Ser	Asp	Leu	Ser	Asp	Val	Val	Pro	Leu	Met	Ala	Arg	Leu	325	330	335	
	Tyr	Pro	Asn	Gly	Pro	Ala	Asp	Ile	Asn	His	Phe	Gln	Ala	Ala	Gly	Gly	340	345	350	
10	Val	Pro	Val	Leu	Val	Arg	Glu	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	His	Glu	355	360	365	
	Asp	Val	Asn	Thr	Val	Ala	Gly	Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Tyr	Thr	Leu	Glu	370	375	380	
15	Pro	Trp	Leu	Asn	Asn	Gly	Glu	Leu	Asp	Trp	Arg	Glu	Gly	Ala	Glu	Lys	385	390	395	400
	Ser	Leu	Asp	Ser	Asn	Val	Ile	Ala	Ser	Phe	Glu	Gln	Pro	Phe	Ser	His	405	410	415	
20	His	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Leu	Ser	Gly	Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Met	420	425	430	
	Lys	Thr	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Glu	Asn	Gln	Val	Ile	Glu	Ala	Pro	Ala	435	440	445	
25	Val	Val	Phe	Glu	Ser	Gln	His	Asp	Val	Met	Pro	Ala	Phe	Glu	Ala	Gly	450	455	460	
30	Leu	Leu	Asp	Arg	Asp	Cys	Val	Val	Val	Val	Arg	His	Gln	Gly	Pro	Lys	465	470	475	480
	Ala	Asn	Gly	Met	Pro	Glu	Leu	His	Lys	Leu	Met	Pro	Pro	Leu	Gly	Val	485	490	495	
35	Leu	Leu	Asp	Arg	Cys	Phe	Lys	Ile	Ala	Leu	Val	Thr	Asp	Gly	Arg	Leu	500	505	510	
40	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Lys	Val	Pro	Ser	Ala	Ile	His	Val	Thr	Pro	Glu	515	520	525	
	Ala	Tyr	Asp	Gly	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys	Val	Arg	Asp	Gly	Asp	Ile	Ile	530	535	540	
45	Arg	Val	Asn	Gly	Gln	Thr	Gly	Glu	Leu	Thr	Leu	Leu	Val	Asp	Glu	Ala	545	550	555	560
	Glu	Leu	Ala	Ala	Arg	Glu	Pro	His	Ile	Pro	Asp	Leu	Ser	Ala	Ser	Arg	565	570	575	
50	Val	Gly	Thr	Gly	Arg	Glu	Leu	Phe	Ser	Ala	Leu	Arg	Glu	Lys	Leu	Ser	580	585	590	
55	Gly	Ala	Glu	Gln	Gly	Ala	Thr	Cys	Ile	Thr	Phe						595	600		

60 <210> 2
 <211> 1812
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

65 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1812)
 <223> edd

ES 2 918 459 T3

<400> 2

	atgaatccac aattgttacg cgtaacaaat cgaatcattg aacgttcgcg cgagactcgc	60
5	tctgcttata tcgcccggat agaacaagcg aaaacttcga ccgttcacgc ttgcagcttg	120
	gcatgcggta acctggcaca cggtttcgct gcctgccagc cagaagacaa agcctccttg	180
10	aaaagcatgt tgcgtaacaa tatcgccatc atcacctcct ataacgacat gctctccgcg	240
	caccagcctt atgaacacta tccagaaatc attcgtaaag ccctgcatga agcgaatgcg	300
	gttggtcagg ttgcgggagg tgttcggcg atgtgtgatg gtgtcaccca ggggcaggat	360
15	ggaatggaat tgtcgtcgtc aagccgcgaa gtgatagcga tgtctgcggc ggtggggctg	420
	tcccataaca tgtttgatgg tgctctgttc ctccgtgtgt gcgacaagat tgtccgggt	480
20	ctgacgatgg cagccctgtc gtttggtcat ttgcctgcgg tgtttgtgcc gtctggaccg	540
	atggcaagcg gtttgccaaa taaagaaaaa gtgcgtattc gccagcttta tgccgaaggt	600
	aaagtggacc gcatggcctt actggagtca gaagccgcgt cttaccatgc gccgggaaca	660
25	tgtactttct acggtactgc caacaccaac cagatgggtg tggagtttat ggggatgcag	720
	ttgccaggct cttcttttgt tcatccggat tctccgctgc gcgatgcttt gaccgccgca	780
30	gctgcgcgtc aggttacacg catgaccggt aatggtaatg aatggatgcc gatcggtaa	840
	atgatcgatg agaaagtggg ggtgaacggt atcgttgac tgcctggcgac cggtggttcc	900
	actaaccaca ccatgcacct ggtggcgatg gcgcgcgcgg ccggtattca gattaactgg	960
35	gatgacttct ctgaccttct tgatgttgta ccgctgatgg cacgtctcta cccgaacggt	1020
	ccggccgata ttaaccactt ccaggcggca ggtggcgtag cggttctggt gcgtgaactg	1080
40	ctcaaagcag gcctgctgca tgaagatgtc aatacgggtg caggttttgg tctgtctcgt	1140
	tatacccttg aaccatggct gaataatggg gaactggact ggccgggaagg ggccgaaaaa	1200
	tcactcgaca gcaatgtgat cgcttccttc gaacaacctt tctctcatca tgggtgggaca	1260
45	aaagtgttaa gcggtaacct gggccgtgcg gttatgaaaa cctctgccgt gccggttgag	1320
	aaccaggatga ttgaagcgcc agcggttggt tttgaaagcc agcatgacgt tatgccggcc	1380
50	tttgaagcgg gtttgctgga ccgcgattgt gtcgttggtg tccgtcatca ggggccaaaa	1440
	gcgaacggaa tgccagaatt acataaactc atgccgccac ttggtgtatt attggaccgg	1500
	tgtttcaaaa ttgcgttagt taccgatgga cgactctccg gcgcttcagg taaagtgccg	1560
55	tcagctatcc acgtaacacc agaagcctac gatggcgggc tgctggcaaa agtgcgcgac	1620
	ggggacatca ttcgtgtgaa tggacagaca ggcaactga cgctgctggt agacgaagcg	1680
60	gaactggctg ctgcggaacc gcacattcct gacctgagcg cgtcacgcgt gggaacagga	1740
	cgtgaattat tcagcgctt gcgtgaaaaa ctgtccggtg ccgaacaggg cgcaacctgt	1800
	atcacttttt aa	1812

65

<210> 3

<211> 213

ES 2 918 459 T3

<212> PRT
 <213> Escherichia coli

 <220>
 5 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(213)
 <223> eda

 10 <400> 3

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

 55 <210> 4
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

 60 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(642)
 <223> eda

 65 <400> 4

ES 2 918 459 T3

```

atgaaaaact ggaaaacaag tgcagaatca atcctgacca ccggcccgggt tgtaccgggt      60
atcgtggttaa aaaaactgga acacgcggtg ccgatggcaa aagcgttggt tgctggtggg      120
5  gtgcgcggttc tggaagtgac tctgcgtacc gagtgtgcag ttgacgctat ccgtgctatc      180
gccaaagaag tgctgaagc gattgtgggt gccggtacgg tgctgaatcc acagcagctg      240
gcagaagtca ctgaagcggg tgcacagttc gcaattagcc cgggtctgac cgagccgctg      300
10 ctgaaagctg ctaccgaagg gactattcct ctgattccgg ggatcagcac tgtttccgaa      360
ctgatgctgg gtatggacta cggtttgaaa gagttcaaat tcttccggc tgaagctaac      420
15 ggcggcggtga aagccctgca ggcgatcggg ggtccgttct ccaggtccg tttctgccg      480
acgggtggta tttctccggc taactaccgt gactacctgg cgctgaaaag cgtgctgtgc      540
atcggtggtt cctggctggt tccggcagat gcgctggaag cgggcgatta cgaccgcatt      600
20 actaagctgg cgcgtgaagc tgtagaaggc gctaagctgt aa      642

```

```

<210> 5
25 <211> 386
<212> PRT
<213> Escherichia coli

```

```

<220>
30 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(386)
<223> pheA

```

```

35 <400> 5

```

```

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

```

ES 2 918 459 T3

	Thr Ser Ser Gly Ala Ile Asn Asp Val Tyr Asp Leu Leu Gln His Thr	
	165 170 175	
5	Ser Leu Ser Ile Val Gly Glu Met Thr Leu Thr Ile Asp His Cys Leu	
	180 185 190	
	Leu Val Ser Gly Thr Thr Asp Leu Ser Thr Ile Asn Thr Val Tyr Ser	
	195 200 205	
10	His Pro Gln Pro Phe Gln Gln Cys Ser Lys Phe Leu Asn Arg Tyr Pro	
	210 215 220	
	His Trp Lys Ile Glu Tyr Thr Glu Ser Thr Ser Ala Ala Met Glu Lys	
	225 230 235 240	
15	Val Ala Gln Ala Lys Ser Pro His Val Ala Ala Leu Gly Ser Glu Ala	
	245 250 255	
20	Gly Gly Thr Leu Tyr Gly Leu Gln Val Leu Glu Arg Ile Glu Ala Asn	
	260 265 270	
	Gln Arg Gln Asn Phe Thr Arg Phe Val Val Leu Ala Arg Lys Ala Ile	
	275 280 285	
25	Asn Val Ser Asp Gln Val Pro Ala Lys Thr Thr Leu Leu Met Ala Thr	
	290 295 300	
	Gly Gln Gln Ala Gly Ala Leu Val Glu Ala Leu Leu Val Leu Arg Asn	
	305 310 315 320	
30	His Asn Leu Ile Met Thr Arg Leu Glu Ser Arg Pro Ile His Gly Asn	
	325 330 335	
	Pro Trp Glu Glu Met Phe Tyr Leu Asp Ile Gln Ala Asn Leu Glu Ser	
	340 345 350	
35	Ala Glu Met Gln Lys Ala Leu Lys Glu Leu Gly Glu Ile Thr Arg Ser	
	355 360 365	
40	Met Lys Val Leu Gly Cys Tyr Pro Ser Glu Asn Val Val Pro Val Asp	
	370 375 380	
	Pro Thr	
	385	
45		
	<210> 6	
	<211> 1161	
	<212> ADN	
50	<213> Escherichia coli	
	<220>	
	<221> gen	
	<222> (1)..(1161)	
55	<223> pheA	
	<400> 6	
60	atgacatcgg aaaaccggtt actggcgctg cgagagaaaa tcagcgcgct ggatgaaaaa	60
	ttattagcgt tactggcaga acggcgcgaa ctggccgtcg aggtgggaaa agccaaactg	120
	ctctcgcacg gcccggtacg tgatattgat cgtgaacgcg atttgctgga aagattaatt	180
65	acgctcggta aagcgcacca tctggacgcc cattacatta ctgcctggtt ccagctcacg	240

ES 2 918 459 T3

attgaagatt ccgtattaac tcagcaggct ttgctccaac aacatctcaa taaaattaat 300
 ccgcactcag cagcgcgcg ttttctcggc cccaaagggt cttattccca tcttgcggcg 360
 5 cgccagtatg ctgcccgtca ctttgagcaa ttcattgaaa gtggctgcgc caaatgtgc 420
 gatattttta atcaggtgga aaccggccag gccgactatg ccgtcgtacc gattgaaaat 480
 accagctccg gtgccataaa cgacgtttac gatctgctgc aacataccag cttgtcgatt 540
 10 gttggcgaga tgacgttaac tatcgacat tggttggtgg tctccggcac tactgattta 600
 tccaccatca atacggtcta cagccatccg cagccattcc agcaatgcag caaatcctt 660
 15 aatcgttatc cgactggaa gattgaatat accgaaagta cgtctgcggc aatggaaaag 720
 gttgcacagg caaaatcacc gcatgttgct gcgttgggaa gcgaagctgg cggcactttg 780
 tacggtttgc aggtactgga gcgtattgaa gcaaatcagc gacaaaactt cacccgattt 840
 20 gtggtggtgg cgcgtaaagc cattaacgtg tctgatcagg tccggcgaa aaccacgttg 900
 ttaatggcga cccggcaaca agccggtgcg ctggttgaag cgttgcgtgt actgcgcaac 960
 25 cacaatctga ttatgacccg tctggaatca cggcgattc acggtaatcc atgggaagag 1020
 atgttctatc tggatattca ggccaatcct gaatcagcgg aaatgcaaaa agcattgaaa 1080
 gagttagggg aaatcaccg ttcaatgaag gtattgggct gttaccaag tgagaacgta 1140
 30 gtgcctgttg atccaacctg a 1161

<210> 7
 35 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<220>
 40 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(108)
 <223> trpR

<400> 7

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

ES 2 918 459 T3

<210> 8
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli
 5
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(327)
 <223> trpR
 10
 <400> 8
 atggcccaac aatcacccta ttcagcagcg atggcagaac agcgtcacca ggagtgggta 60
 15 cgttttgtcg acctgcttaa gaatgcctac caaaacgata tccatttacc gttgttaaac 120
 ctgatgctga cgccagatga gcgcgaagcg ttggggactc gcgtagctat tgtcgaagag 180
 20 ctgttgccgcg gcgaaatgag ccagcgtgag ttaaaaaatg aactcggcgc aggcacgcgc 240
 acgattacgc gtggatctaa cagcctgaaa gccgcgcccg tcgagctgcg ccagtggctg 300
 25 gaagaggtgt tgctgaaaag cgattga 327
 <210> 9
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 30
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(414)
 <223> mtr
 35
 <400> 9
 40 Met Ala Thr Leu Thr Thr Thr Gln Thr Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly
 1 5 10 15
 Val Val Ile Ile Gly Gly Thr Ile Ile Gly Ala Gly Met Phe Ser Leu
 20 25 30
 45 Pro Val Val Met Ser Gly Ala Trp Phe Phe Trp Ser Met Ala Ala Leu
 35 40 45
 50 Ile Phe Thr Trp Phe Cys Met Leu His Ser Gly Leu Met Ile Leu Glu
 50 55 60
 Ala Asn Leu Asn Tyr Arg Ile Gly Ser Ser Phe Asp Thr Ile Thr Lys
 65 70 75 80
 55 Asp Leu Leu Gly Lys Gly Trp Asn Val Val Asn Gly Ile Ser Ile Ala
 85 90 95
 Phe Val Leu Tyr Ile Leu Thr Tyr Ala Tyr Ile Ser Ala Ser Gly Ser
 100 105 110
 60 Ile Leu His His Thr Phe Ala Glu Met Ser Leu Asn Val Pro Ala Arg
 115 120 125
 Ala Ala Gly Phe Gly Phe Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Val Trp Leu
 130 135 140
 65

ES 2 918 459 T3

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

55 <210> 10
 <211> 1245
 <212> ADN
 <213> Escherichia coli

60 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1245)
 <223> mtr

65 <400> 10

ES 2 918 459 T3

```

atggcaacac taaccaccac ccaaacgtca ccgtcgctgc ttggcggcgt ggtgattatc      60
ggcggcacca ttattggcgc agggatgttt tctctgccag tggcatgtc cggggcgtgg      120
5  tttttctggg caatggcggc gctgatcttt acctggttct gtatgctgca ttccggcttg      180
atgattctgg aagctaacct gaattacaga atcggttcga gttttgacac catcaccaaa      240
gatttgctgg gcaaaggctg gaacgtggtc aacggcattt ccattgcctt tgtgctctat      300
10 atcctgacct atgcctatat ttctgccagt ggttcgattc tgcacacac cttcgcagag      360
atgtcactaa acgtcccggc acgggcggcg ggttttgggt ttgcattgct ggtagcgttt      420
15 gtgggtgtgg tgagcactaa agccgtcagt cgcattgacag cgattgtgct gggggcgaaa      480
gtcattacct tcttcctcac ctttggttagc ctgctggggc atgtgcagcc tgcgacattg      540
ttcaacgtcg ccgaaagcaa tgcgtcttat gcaccgtatc tgttgatgac cctgccgttc      600
20 tgtctggcat cgtttggtta tcacggtaac gtgccaagcc tgatgaagta ttacggcaaa      660
gatccgaaaa ccacgtgaa atgtctgggtg tacggtacgc tgatggcgct ggcgctgtat      720
25 accatctggt tgctggcgac gatgggtaac atcccgcgtc cggagtttat cggatttgca      780
gagaagggcg gtaatatgta tgtgctggta caggcgtaa gcggcgctact gaacagccgt      840
agtctggatc tgctgctggt cgtgttctca aactttgcgg tagcgagttc gttcctcggc      900
30 gtaacgctgg gtttgtttga ctatctggca gatctgtttg gtttcgacga ctcggtgtg      960
ggccgcttga aaacggcatt gctgaccttt gccccgccag ttgtgggggg gctgttgttc      1020
35 ccgaacggat tcctgtacgc cattggttat gctggtttag cggctacat ctgggcggca      1080
attgttccgg cgctgttagc ccgtgcatcg cgtaaacgct ttggcagccc gaaattccgc      1140
gtctgggggtg gcaagccgat gattgcgctg attctggtgt ttggcgctcg caacgcactg      1200
40 gtgcataatt tatcgagctt taatttactg ccggtgtatc agtaa      1245

```

```

45 <210> 11
    <211> 471
    <212> PRT
    <213> Escherichia coli

```

```

50 <220>
    <221> PÉPTIDO
    <222> (1)..(471)
    <223> tnaA

```

```

55 <400> 11
      Met Glu Asn Phe Lys His Leu Pro Glu Pro Phe Arg Ile Arg Val Ile
        1             5             10             15
60      Glu Pro Val Lys Arg Thr Thr Arg Ala Tyr Arg Glu Glu Ala Ile Ile
          20             25             30
      Lys Ser Gly Met Asn Pro Phe Leu Leu Asp Ser Glu Asp Val Phe Ile
        35             40             45
65      Asp Leu Leu Thr Asp Ser Gly Thr Gly Ala Val Thr Gln Ser Met Gln
        50             55             60

```

ES 2 918 459 T3

	Ala	Ala	Met	Met	Arg	Gly	Asp	Glu	Ala	Tyr	Ser	Gly	Ser	Arg	Ser	Tyr
	65					70					75					80
5	Tyr	Ala	Leu	Ala	Glu	Ser	Val	Lys	Asn	Ile	Phe	Gly	Tyr	Gln	Tyr	Thr
					85					90					95	
	Ile	Pro	Thr	His	Gln	Gly	Arg	Gly	Ala	Glu	Gln	Ile	Tyr	Ile	Pro	Val
				100					105					110		
10	Leu	Ile	Lys	Lys	Arg	Glu	Gln	Glu	Lys	Gly	Leu	Asp	Arg	Ser	Lys	Met
			115					120					125			
	Val	Ala	Phe	Ser	Asn	Tyr	Phe	Phe	Asp	Thr	Thr	Gln	Gly	His	Ser	Gln
15		130					135					140				
	Ile	Asn	Gly	Cys	Thr	Val	Arg	Asn	Val	Tyr	Ile	Lys	Glu	Ala	Phe	Asp
	145					150					155					160
20	Thr	Gly	Val	Arg	Tyr	Asp	Phe	Lys	Gly	Asn	Phe	Asp	Leu	Glu	Gly	Leu
				165						170					175	
	Glu	Arg	Gly	Ile	Glu	Glu	Val	Gly	Pro	Asn	Asn	Val	Pro	Tyr	Ile	Val
				180					185					190		
25	Ala	Thr	Ile	Thr	Ser	Asn	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Pro	Val	Ser	Leu	Ala
			195					200					205			
	Asn	Leu	Lys	Ala	Met	Tyr	Ser	Ile	Ala	Lys	Lys	Tyr	Asp	Ile	Pro	Val
30		210					215					220				
	Val	Met	Asp	Ser	Ala	Arg	Phe	Ala	Glu	Asn	Ala	Tyr	Phe	Ile	Lys	Gln
	225					230					235					240
35	Arg	Glu	Ala	Glu	Tyr	Lys	Asp	Trp	Thr	Ile	Glu	Gln	Ile	Thr	Arg	Glu
				245						250					255	
	Thr	Tyr	Lys	Tyr	Ala	Asp	Met	Leu	Ala	Met	Ser	Ala	Lys	Lys	Asp	Ala
				260					265					270		
40	Met	Val	Pro	Met	Gly	Gly	Leu	Leu	Cys	Met	Lys	Asp	Asp	Ser	Phe	Phe
			275					280					285			
	Asp	Val	Tyr	Thr	Glu	Cys	Arg	Thr	Leu	Cys	Val	Val	Gln	Glu	Gly	Phe
45		290					295					300				
	Pro	Thr	Tyr	Gly	Gly	Leu	Glu	Gly	Gly	Ala	Met	Glu	Arg	Leu	Ala	Val
	305					310					315					320
50	Gly	Leu	Tyr	Asp	Gly	Met	Asn	Leu	Asp	Trp	Leu	Ala	Tyr	Arg	Ile	Ala
				325						330					335	
	Gln	Val	Gln	Tyr	Leu	Val	Asp	Gly	Leu	Glu	Glu	Ile	Gly	Val	Val	Cys
				340					345					350		
55	Gln	Gln	Ala	Gly	Gly	His	Ala	Ala	Phe	Val	Asp	Ala	Gly	Lys	Leu	Leu
			355					360					365			
	Pro	His	Ile	Pro	Ala	Asp	Gln	Phe	Pro	Ala	Gln	Ala	Leu	Ala	Cys	Glu
60		370					375					380				
	Leu	Tyr	Lys	Val	Ala	Gly	Ile	Arg	Ala	Val	Glu	Ile	Gly	Ser	Phe	Leu
	385					390					395					400
65	Leu	Gly	Arg	Asp	Pro	Lys	Thr	Gly	Lys	Gln	Leu	Pro	Cys	Pro	Ala	Glu
				405						410					415	

ES 2 918 459 T3

	Leu	Leu	Arg	Leu	Thr	Ile	Pro	Arg	Ala	Thr	Tyr	Thr	Gln	Thr	His	Met	
				420					425					430			
5	Asp	Phe	Ile	Ile	Glu	Ala	Phe	Lys	His	Val	Lys	Glu	Asn	Ala	Ala	Asn	
			435					440					445				
	Ile	Lys	Gly	Leu	Thr	Phe	Thr	Tyr	Glu	Pro	Lys	Val	Leu	Arg	His	Phe	
		450					455					460					
10	Thr	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Val										
	465					470											
15	<210>	12															
	<211>	1416															
	<212>	ADN															
	<213>	Escherichia coli															
20	<220>																
	<221>	gen															
	<222>	(1)..(1416)															
	<223>	tnaA															
25	<400>	12															
	atggaaaact	ttaaacatct	cctgaaccg	ttccgcattc	gtgttattga	gccagtaaaa											60
	cgtaccactc	gcgcttatcg	tgaagaggca	attattaaat	ccggtatgaa	ccggttcctg											120
30	ctggatagcg	aagatgtttt	tatcgattta	ctgaccgaca	gcggcaccgg	ggcggtgacg											180
	cagagcatgc	aggctgcgat	gatgcgcggc	gacgaagcct	acagcggcag	tcgtagctac											240
35	tatgcgttag	ccgagtcagt	gaaaaatata	tttggttata	aatacaccat	tccgactcac											300
	cagggccgtg	gcgcagagca	aatctatat	ccggtactga	ttaaaaaacg	cgagcaggaa											360
	aaaggcctgg	atcgagcaaa	aatggtggcg	ttctctaact	atttctttga	taccacgcag											420
40	ggccatagcc	agatcaacgg	ctgtaccgtg	cgtaacgtct	atatcaaaga	agccttcgat											480
	acgggcgtgc	gttacgactt	taaaggcaac	tttgaccttg	agggattaga	acgcggtatt											540
45	gaagaagttg	gtccgaataa	cgtgccgtat	atcgttgcaa	ccatcaccag	taactctgca											600
	ggtggtcagc	cggtttcact	ggcaaactta	aaagcgatgt	acagcatcgc	gaagaaatac											660
	gatattccgg	tggtaatgga	ctccgcgcgc	tttgctgaaa	acgcctat	catcaagcag											720
50	cgtgaagcag	aatacaaaga	ctggaccatc	gagcagatca	cccgcgaaac	ctacaaatat											780
	gccgatatgc	tggcgatgtc	cgccaagaaa	gatgcgatgg	tgccgatggg	cggcctgctg											840
55	tgcattgaaag	acgacagctt	ctttgatgtg	tacaccgagt	gcagaaccct	ttgcgtgggtg											900
	caggaaggct	tcccacata	tggcggcctg	gaaggcggcg	cgatggagcg	tctggcggta											960
	ggtctgtatg	acggcatgaa	tctcgactgg	ctggcttata	gtatcgcgca	ggtacagtat											1020
60	ctggctgatg	gtctggaaga	gattggcggt	gtctgccagc	aggcgggcgg	tcacgcggca											1080
	ttcgttgatg	ccggtaaact	gttgccgcgt	atcccgccag	accagttccc	ggcacaggcg											1140
65	ctggcctgcg	agctgtataa	agtcgccggt	atccgtgcgg	tagaaattgg	ctctttcctg											1200
	ttaggccgcg	atccgaaaac	cggtaaacaa	ctgccatgcc	cggctgaact	gctgcgttta											1260

ES 2 918 459 T3

```

accattccgc ggcgaacata tactcaaaca catatggact tcattattga agcctttaa 1320
catgtgaaag agaacgcggc gaatattaaa ggattaacct ttacgtacga accgaaagta 1380
5 ttgcgtcact tcaccgcaaa acttaaagaa gtttaa 1416

```

```

<210> 13
<211> 415
10 <212> PRT
    <213> Escherichia coli

```

```

<220>
<221> PÉPTIDO
15 <222> (1)..(415)
    <223> tnaB

```

```

<400> 13
20
    Met Thr Asp Gln Ala Glu Lys Lys His Ser Ala Phe Trp Gly Val Met
      1              5              10              15
25
    Val Ile Ala Gly Thr Val Ile Gly Gly Gly Met Phe Ala Leu Pro Val
              20              25              30
30
    Asp Leu Ala Gly Ala Trp Phe Phe Trp Gly Ala Phe Ile Leu Ile Ile
      35              40              45
35
    Ala Trp Phe Ser Met Leu His Ser Gly Leu Leu Leu Leu Glu Ala Asn
      50              55              60
35
    Leu Asn Tyr Pro Val Gly Ser Ser Phe Asn Thr Ile Thr Lys Asp Leu
      65              70              75              80
40
    Ile Gly Asn Thr Trp Asn Ile Ile Ser Gly Ile Thr Val Ala Phe Val
              85              90              95
40
    Leu Tyr Ile Leu Thr Tyr Ala Tyr Ile Ser Ala Asn Gly Ala Ile Ile
      100              105              110
45
    Ser Glu Thr Ile Ser Met Asn Leu Gly Tyr His Ala Asn Pro Arg Ile
      115              120              125
45
    Val Gly Ile Cys Thr Ala Ile Phe Val Ala Ser Val Leu Trp Ile Ser
      130              135              140
50
    Ser Leu Ala Ala Ser Arg Ile Thr Ser Leu Phe Leu Gly Leu Lys Ile
      145              150              155              160
50
    Ile Ser Phe Val Ile Val Phe Gly Ser Phe Phe Phe His Val Asp Tyr
              165              170              175
55
    Ser Ile Leu Arg Asp Ala Thr Ser Thr Thr Ala Gly Thr Ser Tyr Phe
      180              185              190
55
    Pro Tyr Ile Phe Met Ala Leu Pro Val Cys Leu Ala Ser Phe Gly Phe
      195              200              205
60
    His Gly Asn Ile Pro Ser Leu Ile Ile Cys Tyr Gly Lys Arg Lys Asp
      210              215              220
65
    Lys Leu Ile Lys Ser Val Val Phe Gly Ser Leu Leu Ala Leu Val Ile
      225              230              235              240
65
    Tyr Leu Phe Trp Leu Tyr Cys Thr Met Gly Asn Ile Pro Arg Glu Ser
              245              250              255

```

ES 2 918 459 T3

Phe Lys Ala Ile Ile Ser Ser Gly Gly Asn Val Asp Ser Leu Val Lys
 260 265 270
 5 Ser Phe Leu Gly Thr Lys Gln His Gly Ile Ile Glu Phe Cys Leu Leu
 275 280 285
 Val Phe Ser Asn Leu Ala Val Ala Ser Ser Phe Phe Gly Val Thr Leu
 290 295 300
 10 Gly Leu Phe Asp Tyr Leu Ala Asp Leu Phe Lys Ile Asp Asn Ser His
 305 310 315 320
 Gly Gly Arg Phe Lys Thr Val Leu Leu Thr Phe Leu Pro Pro Ala Leu
 325 330 335
 15 Leu Tyr Leu Ile Phe Pro Asn Gly Phe Ile Tyr Gly Ile Gly Gly Ala
 340 345 350
 Gly Leu Cys Ala Thr Ile Trp Ala Val Ile Ile Pro Ala Val Leu Ala
 355 360 365
 20 Ile Lys Ala Arg Lys Lys Phe Pro Asn Gln Met Phe Thr Val Trp Gly
 370 375 380
 Gly Asn Leu Ile Pro Ala Ile Val Ile Leu Phe Gly Ile Thr Val Ile
 385 390 395 400
 25 Leu Cys Trp Phe Gly Asn Val Phe Asn Val Leu Pro Lys Phe Gly
 405 410 415
 30

<210> 14
 <211> 1248
 <212> ADN
 35 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1248)
 40 <223> tnaB

<400> 14

45 atgactgatac aagctgaaaa aaagcactct gcatttttggg gtgttatggg tatagcaggt 60
 acagtaattg gtggagggtat gtttgcttta cctgttgatc ttgccgggtgc ctggttttttc 120
 tgggggtgcct ttatccttat cattgcctgg ttttcaatgc ttcatccgg gttattgtta 180
 50 ttagaagcaa atttaaatta tcctgtcggc tccagtttta acaccatcac caaagattta 240
 atcgtaaca cctggaacat tatcagcggg attaccggtg ccttcgttct ctatatactc 300
 55 acttatgcct atatctctgc taatggtgcg atcattagtg aaacgatata aatgaatttg 360
 ggctatcacg ctaatccacg tattgtcggg atctgcacag ccattttcgt tgccagcgta 420
 ttgtggataa gttcgtttagc cgccagtcgc attacctcat tgttcctcgg gctgaagatt 480
 60 atctcctttg tgatcgtggt tggttctttc ttcttccatg tcgattactc catcctgcgc 540
 gatgccacca gcaccactgc gggaacgtct tacttcccgt atatctttat ggctttgccg 600
 65 gtgtgtctgg cgtcatttgg tttccacggc aatattccca gcctgattat ttgctatgga 660
 aaacgcaaag ataagttaat caaaagcgtg gtatttgggt cgctgctggc gctggtgatt 720

ES 2 918 459 T3

	tatctcttct ggctctattg cacgatgggg aatattccgc gcgaaagctt taaggcgata	780
	atctcctcag gcggcaacgt tgattcgctg gtgaaatcgt tcctcggcac caaacagcac	840
5	ggcattatcg agttttgcct gctggtgttc tctaacttag ctggtgccag ttcgttcttt	900
	ggtgtcacgc tgggggttgtt cgattatctg gcggacctgt ttaagattga taactccac	960
10	ggcgggcgtt tcaaaacgt gctgttaacc ttcctgccac ctgcgttgtt gtatctgac	1020
	ttcccgaaac gctttattta cgggatcggc ggtgccgggc tgtgcgccac catctgggcg	1080
	gtcattattc ccgcagtgt tgcaatcaaa gctcgcaaga agtttccaa tcagatgttc	1140
15	acggtctggg gcggcaatct tattccggcg attgtcattc tctttggtat aaccgtgatt	1200
	ttgtgctggt tcggcaacgt ctttaacgtg ttacctaaat ttggctaa	1248
20	<210> 15 <211> 11155 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> pCL1920_Ptrc_trpO	
30	<400> 15	
	cccgtcttac tgtcgggaat tcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt	60
	ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt	120
35	aggcacccca ggctttacac tttatgcttc cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg	180
	gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctt gctgttgaca	240
40	attaatcatc cggctcgtat aatgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga	300
	aacagctgca gatgcaaaca caaaaaccga ctctcgaact gctaacctgc gaaggcgctt	360
	atcgcgacaa tcccaccgcg ctttttcacc agttgtgtgg ggtcgtccg gcaacgctgc	420
45	tgctggaatc cgcagatata gacagcaaag atgatttaaa aagcctgctg ctggtagaca	480
	gtgcgctgcg cattacagct ttaggtgaca ctgtcacaat ccaggcactt tccggcaacg	540
50	gcgaagccct cctggcacta ctggataacg cctgcctgc ggggtgtgga agtgaacaat	600
	caccaaactg ccgtgtgctg cgcttcccc ctgtcagtc actgctggat gaagacgccc	660
	gcttatgctc ctttcgggtt tttgacgctt tccgtttatt gcagaatctg ttgaatgtac	720
55	cgaaggaaga acgagaagcc atgttcttcg gcggcctgtt ctcttatgac cttgtggcgg	780
	gatttgaaga tttaccgcaa ctgtcagcgg aaaataactg ccctgatttc tgtttttatc	840
60	tcgctgaaac gctgatggtg attgaccatc agaaaaaag caccggtatt caggccagcc	900
	tgtttgctcc gaatgaagaa gaaaaacaac gtctcactgc tcgcctgaac gaactacgtc	960
	agcaactgac cgaagccgcg ccgccgctgc cagtggtttc cgtgccgcat atgcgttgtg	1020
65	aatgtaatca gagcgatgaa gagttcgggtg gcgtagtgcg tttgttgcaa aaagcgattc	1080
	gcgctggaga aattttccag gtggtgccat ctgcgcgttt ctctctgccc tgcccgtcac	1140

ES 2 918 459 T3

	cgctggcggc ctattacgtg ctgaaaaaga gtaatcccag cccgtacatg ttttttatgc	1200
	aggataatga tttcacccta tttggcgcgt cgccggaaag ctgcgtcaag tatgatgcc	1260
5	ccagccgcc gattgagatc taccgattg ccggaacacg cccacgcggg cgtcgcgcg	1320
	atggttcact ggacagagat ctgcacagcc gtattgaact ggaaatgcgt accgatcata	1380
10	aagagctgtc tgaacatctg atgctggttg atctcgcccg taatgatctg gcacgcattt	1440
	gcacccccgg cagccgctac gtcgccgac tcaccaaagt tgaccgttat tcctatgtga	1500
	tgcacctcgt ctctcgcgta gtcggcgaac tgcgtcacga tcttgacgcc ctgcacgctt	1560
15	atcgcgcctg tatgaatatg gggacgttaa gcggtgcgcc gaaagtaacg gctatgcagt	1620
	taattgccga ggcggaaggt cgtcgcgcg gcagctacgg cggcgcggta ggttatttca	1680
20	ccgcgcattg cgatctcgac acctgcattg tgatccgctc ggcgctggtg gaaaacggta	1740
	tcgccaccgt gcaagcgggt gctggtgtag tccttgattc tgttcgcgag tcggaagccg	1800
	acgaaacccg taacaaagcc cgcgctgtac tgcgcgctat tgccaccgcg catcatgcac	1860
25	aggagacttt ctgatggctg acattctgct gctcgataat atcgactctt ttacgtacaa	1920
	cctggcagat cagttgcgca gcaatgggca taactgtgtg atttaccgca accatattcc	1980
30	ggcgcaaacc ttaattgaac gcctggcgac catgagcaat ccggtgctga tgctttctcc	2040
	tggccccggt gtgccgagcg aagccggttg tatgccgga ctctcaccg gcttgcgtgg	2100
	caagctgccc attattggca tttgcctcgg acatcaggcg attgtcgaag cttacggggg	2160
35	ctatgtcggg caggcggggc aaattctcca cggtaaagcc tccagcattg aacatgacgg	2220
	tcaggcgatg tttgccgat taacaaaccc gctgcccgtg gcgcgttata actcgcgtgt	2280
40	tggcagtaac attccggccg gtttaacat caacgcccac tttaatggca tggatgatggc	2340
	agtacgtcac gatgcgacg gcgtttgtgg attccagttc catccggaat ccattctcac	2400
	caccagggc gctcgcctgc tggaacaaac gctggcctgg gcgcagcaga aactagagcc	2460
45	agccaacacg ctgcaaccga ttctggaaaa actgtatcag gcgcagacgc ttagccaaca	2520
	agaaagccac cagctgtttt cagcgggtgt gcgtggcgag ctgaagccgg aacaactggc	2580
50	ggcggcgcgt gtgagcatga aaattcgcgg tgagcaccgc aacgagatcg ccggggcagc	2640
	aaccgcgcta ctggaaaacg cagcgcggtt cccgcgcccg gattatctgt ttgctgatat	2700
	cgtcgggtact ggcggtgacg gcagcaacag tatcaatatt tctaccgcca gtgcgtttgt	2760
55	cgccgcggcc tgtgggctga aagtggcgaa acacggcaac cgtagcgtct ccagtaaata	2820
	tggttcgtcc gatctgctgg cggcgttcgg tattaatctt gatatgaacg ccgataaata	2880
60	gcgccaggcg ctggatgagt taggtgtatg tttcctcttt gcgccgaagt atcacaccgg	2940
	attccgccac gcgatgcggg ttcgccagca actgaaaacc cgcaccctgt tcaatgtgct	3000
	ggggccattg attaaccocg cgcacccgcc gctggcggtta attggtgttt atagtccgga	3060
65	actggtgctg ccgattgccg aaaccttgcg cgtgctgggg tatcaacgcg cggcgggtgt	3120
	gcacagcggc gggatggatg aagtttcatt acacgcgcgc acaatcggtg ccgaactgca	3180

ES 2 918 459 T3

	tgacggcgaa attaaaagct atcagctcac cgcagaagac tttggcctga caccctacca	3240
	ccaggagcaa ctggcaggcg gaacaccgga agaaaaccgt gacattttta cagttttgtt	3300
5	acaaggtaaa ggcgacgccc cccatgaagc agccgtcgct gcgaacgtcg ccatgttaat	3360
	gcgcctgcat ggccatgaag atctgcaagc caatgcgcaa accgttcttg aggtactgcg	3420
10	cagtggttcc gcttacgaca gagtaccgac actggcgga cagaggtaaa tgatgcaaac	3480
	cgttttagcg aaaatcgctg cagacaaggc gatttgggta gaagcccga aacagcagca	3540
	accgctggcc agttttcaga atgaggttca gccgagcacg cgacattttt atgatgcgct	3600
15	acagggtgcg cgcacggcgt ttattctgga gtgcaagaaa gcgtcgccgt caaaaggcgt	3660
	gatccgtgat gatttcgac cagcacgcat tgccgccatt tataaacatt acgcttcggc	3720
20	aatttcggtg ctgactgatg agaaatattt tcaggggagc tttaatttcc tccccatcgt	3780
	cagccaaatc gcccgcgacg cgattttatg taaagacttc attatcgacc cttaccagat	3840
	ctatctggcg cgctattacc aggccgatgc ctgcttatta atgctttcag tactggatga	3900
25	cgaccaatat cgccagcttg ccgccgtgcg tcacagtctg gagatggggg tgctgaccga	3960
	agtcagtaat gaagaggaac aggagcgcg cattgcattg ggagcaaagg tcgttggcat	4020
30	caacaaccgc gatctgcgtg atttgtcgat tgatctcaac cgtaccgcg agcttgcgcc	4080
	gaaactgggg cacaacgtga cggtaatcag cgaatccggc atcaatactt acgctcaggt	4140
	gcgcgagtta agccacttcg ctaacggttt tctgattggt tcggcggtga tggcccatga	4200
35	cgatttgcac gccgcgctgc gccgggtggt gctgggtgag aataaagtat gtggcctgac	4260
	gcgtgggcaa gatgctaaag cagcttatga cgcggcgcg atttacggtg ggttgatttt	4320
40	tgttgcgaca tcaccgcgtt gcgtcaacgt tgaacaggcg caggaagtga tggctgcggc	4380
	accgttgacg tatgttggcg tgttcgcaa tcacgatatt gccgatgtgg tggacaaagc	4440
	taaggtgtta tcgctggcgg cagtgcact gcatggtaat gaagaacagc tgtatatcga	4500
45	tacgctgcgt gaagctctgc cagcacatgt tgccatctgg aaagcattaa gcgtcggtga	4560
	aaccctgccc gcccgcgagt ttcagcacgt tgataaatat gtttttagaca acggccaggg	4620
50	tggaagcggg caacgttttg actggtcact attaaatggt caatcgcttg gcaacgttct	4680
	gctggcgggg ggcttaggag cagataactg cgtggaagcg gcacaaaccg gctgcgcgg	4740
	acttgatttt aattctgctg tagagtcgca accgggcac aaagacgcac gtcttttggc	4800
55	ctcggttttc cagacgtgc gcgcatatta aggaaaggaa caatgacaac attacttaac	4860
	ccctattttg gtgagtttgg cggcatgtac gtgccacaaa tcctgatgcc tgctctgcgc	4920
60	cagctggaag aagcttttgt cagtgcgcaa aaagatcctg aatttcaggc tcagttcaac	4980
	gacctgctga aaaactatgc cgggcgtcca accgcgctga ccaaagtcca gaacattaca	5040
	gccgggacga acaccacgct gtatctcaag cgtgaagatt tgctgcacgg cggcgcgcat	5100
65	aaaactaacc aggtgctggg gcaggcgttg ctggcgaagc ggatgggtaa aaccgaaatc	5160
	atcgccgaaa ccggtgcggg tcagcatggc gtggcgctcg cccttgccag cgccctgctc	5220

ES 2 918 459 T3

	ggcctgaaat gccgtatttta tatgggtgcc aaagacgttg aacgccagtc gcctaacggt	5280
	tttcgtatgc gcttaatggg tgcggaagtg atccccgtgc atagcggttc cgcgacgctg	5340
5	aaagatgcct gtaacgaggg gctgcgcgac tgggtccggtg gttacgaaac cgcgcactat	5400
	atgctgggca ccgcagctgg cccgcacact tatccgacca ttgtgcgtga gtttcagcgg	5460
10	atgattggcg aagaaaccaa agcgcagatt ctggaaagag aaggtcgcct gccggatgcc	5520
	gttatcgcct gtgttggcgg cggttcgaat gccatcggca tgtttgctga tttcatcaat	5580
	gaaaccaacg tcggcctgat tgggtgtggag ccaggtggtc acggtatcga aactggcgag	5640
15	cacggcgcac cgctaaaaca tggtcgcgtg ggtatctatt tcggtatgaa agcgcgatg	5700
	atgcaaaccg aagacgggca gattgaagaa tcttactcca tctccgcgg actggatttc	5760
20	ccgtctgtcg gccacaaca cgcgtatctt aacagcactg gacgcgctga ttacgtgtct	5820
	attaccgatg atgaagccct tgaagccttc aaaacgctgt gcctgcacga agggatcatc	5880
	ccggcgcgtg aatcctccca cgccttggcc catgcgttga aaatgatgcg cgaaaacccg	5940
25	gataaagagc agctactggt ggttaacctt tccggtcgcg gcgataaaga catcttcacc	6000
	gttcacgata ttttgaaagc acgaggggaa atctgatgga acgctacgaa tctctgtttg	6060
30	cccagttgaa ggagcgcaaa gaaggcgcac tcgttctttt cgtcacgctc ggtgatccgg	6120
	gcattgagca gtcattgaaa attatcgata cgctaattga agccggtgct gacgcgctgg	6180
	agttaggat ccccttctcc gaccactgg cggtatggcc gacgattcaa aacgccactc	6240
35	tgcgcgcctt tgcggcaggt gtgactccgg cacaatgttt tgaaatgctg gactgattc	6300
	gccagaaaca cccgaccatt cccattggcc tgttgatgta tgccaatctg gtgtttaaca	6360
40	aaggcattga tgagttttat gcccagtgcg aaaaagtcgg cgtcgattcg gtgctggttg	6420
	ccgatgtgcc agttgaagag tccgcgcctt tccgccaggc cgcgttgctg cataatgtcg	6480
	cacctatctt catctgccc ccaaatgccg atgacgacct gctgcgccag atagcctctt	6540
45	acggtcgtgg ttacacctat ttgctgtcac gagcaggcgt gaccggcgca gaaaaccgcg	6600
	ccgcgttacc cctcaatcat ctggttgoga agctgaaaga gtacaacgct gcacctccat	6660
50	tgcagggatt tggattttcc gccccgatac aggtaaaagc agcgattgat gcaggagctg	6720
	cgggcgcgat ttctggttcg gccattgtta aaatcatcga gcaacatatt aatgagccag	6780
	agaaaatgct ggcggcactg aaagtttttg tacaaccgat gaaagcggcg acgcgcagtt	6840
55	aactgcaggt cgactctaga ggatccccgg gtaccgagct cgaattcact ggccgtcgtt	6900
	ttacaacgtc gtgactggga aaaccctggc gttacccaac ttaatcgctt tgcagcacat	6960
60	ccccctttcg ccagctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgacgccc ttcccaacag	7020
	ttgcgcagcc tgaatggcga atggcgctg atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc	7080
	ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta	7140
65	agccagcccc gacaccgcc aacaccgcgt gacgagctta gtaaagccct cgctagattt	7200
	taatgcggat gttgcgatta cttcgccaac tattgcgata acaagaaaaa gccagccttt	7260

ES 2 918 459 T3

	catgatatat ctcccaattt gtgtagggtt tattatgcac gcttaaaaat aataaaagca	7320
	gacttgacct gatagtttgg ctgtgagcaa ttatgtgctt agtgcattcta acgcttgagt	7380
5	taagccgcgc cgcaagcgg cgtcggcttg aacgaattgt tagacattat ttgccgacta	7440
	ccttggtgat ctgcctttc acgtagtgga caaattcttc caactgatct gcgcgcgagg	7500
10	ccaagcgatc ttcttcttgt ccaagataag cctgtctagc ttcaagtatg acgggctgat	7560
	actgggccgg caggcgctcc attgcccagt cggcagcgac atccttcggc gcgattttgc	7620
	cggttactgc gctgtaccaa atgcgggaca acgtaagcac tacatttcgc tcatcgccag	7680
15	cccagtcggg cggcgagttc catagcgtta aggtttcatt tagcgctca aatagatcct	7740
	gttcaggaac cggatcaaag agttcctccg ccgctggacc taccaaggca acgctatggt	7800
20	ctcttgcttt tgtcagcaag atagccagat caatgtcgat cgtggctggc tcgaagatac	7860
	ctgcaagaat gtcattgcgc tgccattctc caaattgcag ttgcgcgtta gctggataac	7920
	gccacggaat gatgtcgtcg tgcacaacaa tggtgacttc tacagcgcgg agaattctgc	7980
25	tctctccagg ggaagccgaa gtttccaaaa ggtcgttgat caaagctcgc cgcgttggtt	8040
	catcaagcct tacggtcacc gtaaccagca aatcaatata actgtgtggc ttcaggccgc	8100
30	catccactgc ggagccgtac aaatgtacgg ccagcaacgt cggttcgaga tggcgctcga	8160
	tgacgccaac tacctctgat agttgagtcg atacttcggc gatcaccgct tccctcatga	8220
	tgtttaactt tgttttaggg cgactgccct gctgcgtaac atcgttgctg ctccataaca	8280
35	tcaaacatcg acccagggcg taacgcgctt gctgcttgga tgcccagggc atagactgta	8340
	ccccaaaaaa acagtcataa caagccatga aaaccgccac tgcgcggtta ccaccgctgc	8400
40	gttcggtcaa ggttctggac cagttgcgtg agcgcatagc ctacttgcat tacagcttac	8460
	gaaccgaaca ggcttatgtc cactgggttc gtgccttcac ccgtttccac ggtgtgcgtc	8520
	acccggcaac cttgggcagc agcgaagtcg aggcatttct gtcttggtg gcgaacgagc	8580
45	gcaaggtttc ggtctccacg catcgtcagg cattggcggc cttgctgttc ttctacggca	8640
	aggtgctgtg cacggatctg ccctggcttc aggagatcgg aagacctcgg ccgtcgcggc	8700
50	gcttgccggt ggtgtgacc ccggtgaag tggttcgcat cctcggtttt ctggaaggcg	8760
	agcatcggtt gttcgcccag cttctgtatg gaacgggcat gcggatcagt gagggtttgc	8820
	aactgcgggt caaggatctg gatttcgatc acggcacgat catcgtgcgg gagggcaagg	8880
55	gctccaagga tcgggccttg atgttaccgc agagcttggc acccagcctg cgcgagcagg	8940
	ggaattaatt cccacgggtt ttgctgcccg caaacgggct gttctggtgt tgctagtttg	9000
60	ttatcagaat cgcagatccg gcttcagccg gtttgccggc tgaaagcgct atttcttcca	9060
	gaattgccat gattttttcc ccacgggagg cgtcactggc tcccgtgttg tcggcagctt	9120
	tgattcgata agcagcatcg cctgtttcag gctgtctatg tgtgactgtt gagctgtaac	9180
65	aagttgtctc aggtgttcaa tttcatgttc tagttgcttt gttttactgg tttcacctgt	9240
	tctattagggt gttacatgct gttcatctgt tacattgtcg atctgttcat ggtgaacagc	9300

ES 2 918 459 T3

	tttgaatgca ccaaaaaactc gtaaaaagctc tgatgtatct atcttttttta caccgttttc	9360
	atctgtgcat atggacagtt ttccctttga tatgtaacgg tgaacagttg ttctactttt	9420
5	gtttgttagt cttgatgctt cactgataga tacaagagcc ataagaacct cagatccttc	9480
	cgtattttagc cagtatgttc tctagtgtgg ttcgttgttt ttgcgtgagc catgagaacg	9540
10	aaccattgag atcatactta ctttgcattg cactcaaaaa ttttgctca aaactgggtga	9600
	gctgaatttt tgcagttaaa gcatcgtgta gtgtttttct tagtccgtta thtaggtagg	9660
	aatctgatgt aatggttgtt ggtattttgt caccattcat ttttatctgg ttgttctcaa	9720
15	gttcggttac gagatccatt tgtctatcta gttcaacttg gaaaatcaac gtatcagtcg	9780
	ggcggcctcg cttatcaacc accaatttca tattgctgta agtggttaaa tctttactta	9840
20	ttggtttcaa aaccattgg ttaagccttt taaactcatg gtagttattt tcaagcatta	9900
	acatgaactt aaattcatca aggctaactt ctatatctgc cttgtgagtt ttcttttgtg	9960
	ttagttcttt taataaccac tcataaatcc tcatagagta tttgttttca aaagacttaa	10020
25	catgttccag attatatctt atgaattttt ttaactggaa aagataaggc aatatctctt	10080
	cactaaaaac taattctaatt ttttcgcttg agaacttggc atagtttgtc cactggaaaa	10140
30	tctcaaagcc ttaaaccaaa ggattcctga tttccacagt tctcgtcatc agctctctgg	10200
	ttgcttttagc taatacacca taagcatttt cctactgat gttcatcatc tgagcgtatt	10260
	ggttataagt gaacgatacc gtccgttctt tccttgtagg gttttcaatc gtgggggtga	10320
35	gtagtgccac acagcataaa attagcttgg tttcatgctc cgttaagtca tagcgactaa	10380
	tcgctagttc atttgctttg aaaacaacta attcagacat acatctcaat tggcttaggt	10440
40	gattttaatc actataccaa ttgagatggg ctagtcaatg ataattacta gtccttttcc	10500
	tttgagttgt gggatatctgt aaattctgct agacctttgc tggaaaactt gtaaattctg	10560
	ctagaccctc tgtaaattcc gctagacctt tgtgtgtttt tttgtttat attcaagtgg	10620
45	ttataattta tagaataaag aaagaataaa aaaagataaa aagaatagat cccagccctg	10680
	tgtataactc actacttttag tcagttccgc agtattacaa aaggatgtcg caaacgctgt	10740
50	ttgctcctct acaaaacaga ccttaaaacc ctaaaaggct aagtagcacc ctgcgaagct	10800
	cgggcaaatc gctgaatatt ctttttgtct ccgaccatca ggcacctgag tcgctgtctt	10860
	tttcgtgaca ttcagttcgc tgcgctcacg gctctggcag tgaatggggg taaatggcac	10920
55	tacaggcgcc ttttatggat tcattgcaagg aaactaccca taatacaaga aaagcccgtc	10980
	acgggcttct cagggcggtt tatggcgggt ctgctatgtg gtgctatctg actttttgct	11040
60	gttcagcagt tcctgccctc tgattttcca gtctgaccac ttcggattat cccgtgacag	11100
	gtcattcaga ctggctaatt caccagtaa ggcagcggta tcatcaacag gctta	11155

65	<210> 16
	<211> 38
	<212> ADN
	<213> Secuencia Artificial

ES 2 918 459 T3

	<220>			
	<223>	Cebador 1		
5	<400>	16		
		aggcaacact atgacatcgt gtaggctgga gctgcttc		38
10	<210>	17		
	<211>	40		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
15	<220>			
	<223>	Cebador 2		
	<400>	17		
20		ggtcgccatt aacaacgtgg catatgaata tcctccttag		40
	<210>	18		
25	<211>	19		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
30	<223>	Cebador 3		
	<400>	18		
35		tattgagtgt atcgccaac		19
	<210>	19		
	<211>	18		
40	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador 4		
45				
	<400>	19		
		cgatgtcata gtgttgcc		18
50				
	<210>	20		
	<211>	20		
	<212>	ADN		
55	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador 5		
60				
	<400>	20		
		ccacgttggt aatggcgacc		20
65				
	<210>	21		

ES 2 918 459 T3

	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador 6		
	<400> 21		
10	ttcattgaac gggatgatttc		20
	<210> 22		
15	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
20	<223> Cebador 7		
	<400> 22		
25	tccgcacgtt tatgatatgc ttcgtactc tttagcgagt acaaccgggg gtgtaggctg		60
	gagctgcttc		70
30	<210> 23		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador 8		
	<400> 23		
40	gccacgtctt atcaggccta caaaatcaat cgcttttcag caacacctct catatgaata		60
	tcctccttag		70
45	<210> 24		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
50	<220>		
	<223> Cebador 9		
55	<400> 24		
	gcgccgggcg tatcgacgca		20
60	<210> 25		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
65	<220>		
	<223> Cebador 10		

ES 2 918 459 T3

	<400> 25	
	gcatatcata aacgtgcgga	20
5		
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Cebador 11	
15	<400> 26	
	tgtaggcctg ataagacgtg	20
20		
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25		
	<220>	
	<223> Cebador 12	
30	<400> 27	
	aaggggcgat cggcgtgttt	20
35		
	<210> 28	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40		
	<220>	
	<223> Cebador 13	
45	<400> 28	
	atggcaacac taaccaccac ccaaacgtca ccgtcgctgc ttggcggcgt gtgtaggctg	60
	gagctgcttc	70
50		
	<210> 29	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55		
	<220>	
	<223> Cebador 14	
60	<400> 29	
	ttactgatac accggcagta aattaaagct cgataaaata tgcaccagtg catatgaata	60
	tcctccttag	70
65	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	

ES 2 918 459 T3

	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
5	<223>	Cebador 15	
	<400>	30	
10		gcagccggtta cattggtaac	20
	<210>	31	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebador 16	
20	<400>	31	
		gtggtggtta gtgttgccat	20
25	<210>	32	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
30	<220>		
	<223>	Cebador 17	
35	<400>	32	
		tactgccggt gtatcagtaa	20
40	<210>	33	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
45	<220>		
	<223>	Cebador 18	
50	<400>	33	
		tcaaaccgtc agcacggctg	20
55	<210>	34	
	<211>	70	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
60	<223>	Cebador 19	
	<400>	34	
65		atgaaggatt atgtaatgga aaactttaaa catctccctg aaccgttccg gtgtaggctg	60
		gagctgcttc	70

ES 2 918 459 T3

5	<210>	35		
	<211>	70		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador 20		
10	<400>	35		
		ttagccaaat ttaggtaaca cgtaaagac gttgccgaac cagcacaaaa catatgaata		60
		tcctccttag		70
15	<210>	36		
	<211>	21		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador 21		
25	<400>	36		
		ttaagcgaaa tcaccgggga a		21
30	<210>	37		
	<211>	18		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador 22		
40	<400>	37		
		atgtccgagc actggcgc		18
45	<210>	38		
	<211>	28		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador 23		
55	<400>	38		
		cccaagcttg ctgttgacaa ttaatcat		28
60	<210>	39		
	<211>	28		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia Artificial		
	<220>			
	<223>	Cebador 24		

ES 2 918 459 T3

	<400> 39	
	aaaactgcag ctgtttcctg tgtgaaat	28
5		
	<210> 40	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10		
	<220>	
	<223> Cebador 25	
15	<400> 40	
	aaaactgcag atgcaaacac aaaaaccgac t	31
20		
	<210> 41	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25		
	<220>	
	<223> Cebador 26	
30	<400> 41	
	aaaactgcag ttaactgcgc gtcgccgctt tc	32
35		
	<210> 42	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40		
	<220>	
	<223> Cebador 27	
45	<400> 42	
	aaacgcgttg tgaatcatcc tgctctgaca actcaatttc aggagccttt gccgccagct	60
	gaagctttac	70
50		
	<210> 43	
	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55		
	<220>	
	<223> Cebador 28	
60	<400> 43	
	acagcacgct tttcagcgcc aggtagtcac ggtagttagc cggagaaata tagtggatct	60
	gatgggtacc	70
65		
	<210> 44	

ES 2 918 459 T3

<211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Cebador 29

<400> 44

10 tgccctatga gctccggtta caggcgtttc agtcataaat cctctgaatg aaacgcgttg 60
 tgaatcatcc 70

15 <210> 45
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Cebador 30

25 <400> 45
 atcgcccgt tccagcgcgt ctgccggaac cagccaggaa ccaccgatgc acagcacgct 60
 tttcagcgcc 70

30 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cebador 31

40 <400> 46
 catgatcttg cgcagattgt a 21

45 <210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Cebador 32

55 <400> 47
 catgatcttg cgcagattgt a 21

60

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo del género *Escherichia* que produce L-triptófano, en donde se inactivan las actividades endógenas de la 6-fosfogluconato deshidratasa (Edd) y la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (Eda).
2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la 6-fosfogluconato deshidratasa tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1.
3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.
4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo del género *Escherichia* es *Escherichia coli*.
5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una totalidad o una parte del gen *pheA*, el gen *trpR*, el gen *mtr* y el gen *tnaAB* se elimina adicionalmente.
6. Un método para preparar L-triptófano, que comprende:
cultivar el microorganismo del género *Escherichia* de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un medio; y
recuperar el L-triptófano del medio de cultivo o del microorganismo que se cultiva.