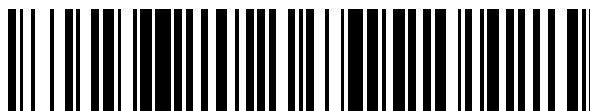


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 360**

51 Int. Cl.:

C12N 9/14	(2006.01)	C07K 14/24	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)	C07K 14/245	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/52	(2006.01)
C12P 13/06	(2006.01)		
C12P 13/08	(2006.01)		
C12P 13/10	(2006.01)		
C12P 13/12	(2006.01)		
C12P 13/14	(2006.01)		
C12P 13/22	(2006.01)		
C12P 13/24	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2008 PCT/JP2008/050246**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2008 WO08090770**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2008 E 08703110 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2116595**

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

30 Prioridad:

22.01.2007 JP 2007011392
17.05.2007 JP 2007131763

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TAKIKAWA, RIE y
HARA, YOSHIHIKO

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 631 360 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 produce un L-aminoácido y procedimiento para producir un L-aminoácido.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un L-aminoácido utilizando un microorganismo, en particular a procedimientos para producir un L-aminoácido, siendo el L-aminoácido ácido L-glutámico. El ácido L-glutámico es un condimento.

10

Técnica anterior

Los L-aminoácidos se producen industrialmente mediante fermentación utilizando diversos microorganismos. Por ejemplo, el ácido L-glutámico se produce principalmente mediante fermentación utilizando bacterias productoras de ácido L-glutámico de las denominadas bacterias corineformes pertenecientes a los géneros *Brevibacterium*, *Corynebacterium* o *Microbacterium*, o cepas mutantes de las mismas (véase, por ejemplo, el documento distinto de patente 1). Como procedimientos para producir ácido L-glutámico mediante fermentación utilizando otras cepas bacterianas se conocen procedimientos de utilización de microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium* o similares (remítase, por ejemplo, al Documento de patente 1), procedimientos de utilización de microorganismos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Candida* o similares (remítase, por ejemplo, al Documento de patente 2), procedimientos de utilización de microorganismos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aerobacter aerogenes* (denominado actualmente *Enterobacter aerogenes*) o similares (remítase, por ejemplo, al Documento de patente 3), procedimientos de utilización de cepas mutantes de *Escherichia coli* (remítase, por ejemplo, al Documento de patente 1), etc. Además, también se divulgan procedimientos para producir ácido L-glutámico utilizando un microorganismo perteneciente al género *Klebsiella*, *Erwinia*, *Pantoea* o *Enterobacter* (remítase, por ejemplo, a los Documentos de patente 2 a 4).

15

20

25

30

35

Dichos procedimientos para producir sustancias diana tales como L-aminoácidos mediante fermentación utilizando un microorganismo tal como se ha descrito anteriormente incluyen procedimientos de utilización de un microorganismo de tipo silvestre (cepa de tipo silvestre), procedimientos de utilización de una cepa auxotrófica derivada de una cepa de tipo silvestre, procedimientos de utilización de una cepa mutante de regulación metabólica derivada de una cepa de tipo silvestre tal como una cepa resistente a alguno de diversos fármacos, procedimientos de utilización de una cepa que tiene propiedades tanto de cepa auxotrófica como de cepa mutante de regulación metabólica, etc.

40

En los últimos años se han utilizado técnicas de ADN recombinante en la producción de sustancias diana mediante fermentación. Por ejemplo, la productividad de L-aminoácidos de un microorganismo se mejora potenciando la expresión de un gen que codifica una enzima biosintética de L-aminoácidos (Documentos de patente 5 y 6), o potenciando el flujo de entrada de una fuente de carbono en un sistema de biosíntesis de L-aminoácidos (Documento de patente 7).

45

El sistema *kdp* es una ATPasa de tipo P que opera captando iones potasio (Documento distinto de patente 2). El sistema *kdp* está codificado por el operón *kdp*, y la expresión del mismo se induce cuando la concentración de ion potasio en el medio es reducida o cuando el cultivo se realiza en condiciones hiperosmóticas (Documento distinto de patente 3). Además, se sabe que la expresión está controlada por KdpD y KdpE, que constituyen uno de los sistemas de control binarios (Documento distinto de patente 4). No obstante, la relación entre la potenciación del sistema *kdp* y la producción de L-aminoácidos no se ha investigado hasta la fecha.

50

Documento de patente 1: Patente japonesa abierta a inspección pública (KOKAI) nº 5-244970

Documento de patente 2: Patente US nº 3.563.857

55

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

Documento de patente 4: Patente japonesa abierta a inspección pública nº 2000-189175

Documento de patente 5: Patente US nº 5.168.056

60

Documento de patente 6: Patente US nº 5.776.736

Documento de patente 7: Patente US nº 5.906.925

65

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

Documento no de patente 2: Laimonis A. Laimins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, julio de 1978, 75(7): 3216-19

Documento no de patente 3: Laimonis A. Laimins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, enero de 1981, 78(1): 464-68

5 Documento no de patente 4: Mark O. Walderhaug, J. Bacteriol., abril de 1992, 174 (7): 2152-59

Exposición de la invención

Objetivo que se va a lograr mediante la invención

10

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un microorganismo de *Pantoea ananatis* que es capaz de producir eficazmente un L-aminoácido, y proporcionar un procedimiento para producir de forma eficaz un L-aminoácido utilizando dicho microorganismo.

Medios para lograr el objetivo

15

Los inventores de la presente invención han realizado diversas investigaciones con el fin de lograr el objetivo mencionado anteriormente; como resultado han encontrado que el ácido L-glutámico podría producirse eficazmente utilizando un microorganismo cuyo sistema *kdp* estuviera potenciado, y así se ha realizado la presente invención.

20

Es decir, la presente invención proporciona los puntos siguientes.

25

[1] Un microorganismo *Pantoea ananatis* modificado que tiene capacidad productora de ácido L-glutámico y que se ha modificado de forma que se potencie el sistema ATPasa de tipo P (*kdp*) transportador de potasio que está codificado por el operón *kdp* en comparación con una cepa sin modificar, en el que el sistema *kdp* se potencia de forma que la actividad de ATPasa de tipo P del microorganismo se potencie, aumentando la expresión de dicho operón *kdp* o de uno o más genes que constituyen dicho operón *kdp* y/o aumentando la traducción de dicho operón *kdp* o de dichos genes, aumentando el número de copias de dicho operón *kdp* o de uno o más de dichos genes o modificando la secuencia de control de la expresión de dicho operón.

30

35

[2] El microorganismo según el punto [1], en el que el operón *kdp* contiene por lo menos los genes *kdpA*, *kdpB* y *kdpC*.

40

[3] El microorganismo según el punto [2], en el que el gen *kdpA* es un gen que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 2 o nº 8 o la subunidad A del sistema *kdp* que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o nº 8 incluidas sustituciones, supresiones, inserciones o adiciones de uno a 20 restos de aminoácidos.

45

[4] El microorganismo según el punto [2] o [3], en el que el gen *kdpB* es un gen que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 3 o nº 9 o la subunidad B del sistema *kdp* que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 3 o nº 9 incluidas sustituciones, supresiones, inserciones o adiciones de uno a 20 restos de aminoácidos.

50

[5] El microorganismo según uno cualquiera de los puntos [2] a [4], en el que el gen *kdpC* es un gen que codifica una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 4 o nº 10 o la subunidad C del sistema *kdp* que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 4 o nº 10 incluidas sustituciones, supresiones, inserciones o adiciones de uno a 20 restos de aminoácidos.

55

[6] El microorganismo según uno cualquiera de los puntos [2] a [5], en el que el operón *kdp* es un ADN definido en uno cualquiera de los puntos (a) a (d) siguientes:

(a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos con los números de nucleótido 546 a 4871 de la SEC ID nº 1,

(b) un ADN que codifica el sistema *kdp* y se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de (a) o con una sonda que se ha preparado a partir de dicha secuencia de nucleótidos,

60

(c) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos con los números de nucleótido 546 a 4853 de la SEC ID nº 7,

65

(d) un ADN que codifica el sistema *kdp* y se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de (c) o con una sonda que se ha preparado a partir de dicha secuencia de nucleótidos.

[7] Un procedimiento para producir ácido L-glutámico que comprende cultivar el microorganismo según uno

cualquiera de los puntos [1] a [6] en un medio para producir y acumular ácido L-glutámico en el medio o en las células y recoger ácido L-glutámico a partir del medio o de las células

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 es un dibujo que representa la estructura de un plásmido cooperador RSF-Red-TER.
- La figura 2 es un dibujo que representa la construcción de un plásmido cooperador RSF-Red-TER.
- 10 La figura 3 es un dibujo que representa la estructura de la región cromosómica de *P. ananatis* ubicada corriente arriba del gen *LacZ*.
- La figura 4 es una gráfica que representa el crecimiento de una cepa sustituida con el promotor del operón *kdp* en cultivo en condiciones ácidas en un tubo de ensayo.
- 15 La figura 5 es un gráfico que representa la productividad de ácido L-glutámico de una cepa sustituida con el promotor del operón *kdp*.
- La figura 6 es un dibujo que representa el alineamiento de secuencias de aminoácidos de *kdpA* de *Pantoea ananatis* (SEC ID nº 8) y *Escherichia coli* (SEC ID nº 2), y la secuencia de consenso de las mismas (SEC ID nº 57).
- 20 La figura 7 es un dibujo que representa el alineamiento de secuencias de aminoácidos de *kdpB* de *Pantoea ananatis* (SEC ID nº 9) y *Escherichia coli* (SEC ID nº 3), y la secuencia de consenso de las mismas (SEC ID nº 58).
- 25 La figura 8 es un dibujo que representa el alineamiento de secuencias de aminoácidos de *kdpC* de *Pantoea ananatis* (SEC ID nº 10) y *Escherichia coli* (SEC ID nº 4), y la secuencia de consenso de las mismas (SEC ID nº 59).
- 30

Mejor modo de poner en práctica la invención

A continuación, la presente invención se explicará en detalle.

35 <1> Microorganismo de la presente invención

El microorganismo de la presente invención es un microorganismo modificado de *Pantoea ananatis* que tiene capacidad productora de L-aminoácidos y que se ha modificado de forma que se potencie el sistema *kdp*. La capacidad productora de L-aminoácidos a la que se refiere el presente documento significa la capacidad del microorganismo de la presente invención para producir y acumular un L-aminoácido, es decir, ácido L-glutámico, en un medio o en células en una cantidad tal que el L-aminoácido pueda recogerse a partir del medio o de las células cuando el microorganismo se cultiva en el medio.

45 El microorganismo que tiene capacidad productora de L-aminoácidos puede ser un microorganismo que tiene de forma inherente capacidad productora de L-aminoácidos, o un microorganismo obtenido modificando dichos microorganismos tal como se describe más adelante a fin de que tenga capacidad productora de L-aminoácidos utilizando un procedimiento de mutación o técnicas de ADN recombinante.

50 <1-1> Impartición de la capacidad productora de L-aminoácidos

A continuación se describirán ejemplos de procedimientos para impartir capacidad productora de L-aminoácidos y microorganismos que pueden utilizarse en la presente invención a los que se imparte la capacidad productora de L-aminoácidos. No obstante, los microorganismos no están limitados a estos siempre que se utilice un microorganismo que tenga capacidad productora de L-aminoácidos.

55 Los microorganismos utilizados por la presente invención abarcan microorganismos clasificados dentro de la familia de las Enterobacteriaceae según la taxonomía utilizada por la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>). Como cepas progenitoras de *Enterobacteriaceae* que se pueden modificar se utilizan preferentemente bacterias que pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Enterobacter* o *Klebsiella*.

60 La cepa progenitora de bacterias de *Escherichia* utilizada con el fin de obtener una bacteria de *Escherichia* de la presente invención no está particularmente limitada. Pueden utilizarse las descritas en el trabajo de Neidhardt *et al.* (Backmann, B.J., 1996. Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, páginas 2460-2488, Tabla 1, en F.D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and Salmonella Cellular and Molecular Biology/segunda edición, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.). Entre las mismas, por

ejemplo, se ejemplifica la *Escherichia coli*. Los ejemplos de *Escherichia coli* incluyen la cepa W3110 (ATCC nº 27325), la cepa MG1655 (ATCC nº 47076), etc., que son derivados de una cepa de tipo silvestre prototipo, la cepa K12.

5 Estas cepas están disponibles, por ejemplo, en la American Type Culture Collection (ATCC) (Dirección: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos). Es decir, a cada cepa se le asigna un único número de registro (<http://www.atcc.org/>). Las cepas pueden ordenarse utilizando este número de registro. El número de registro de cada cepa se enumera en el catálogo de la ATCC.

10 Los ejemplos de las bacterias *Enterobacter* incluyen *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, etc. Los ejemplos de las bacterias *Pantoea* incluyen *Pantoea ananatis*. En los últimos años, algunas bacterias de *Enterobacter agglomerans* se reclasificaron como *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* o *Pantoea stewartii*, sobre la base de *Pantoea ananatis*. Algunos ejemplos específicos incluyen las cepas siguientes:

15 *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614, Patente europea abierta a inspección pública nº 0952221)
Pantoea ananatis AJ13356 (FERM BP-6615, Patente europea abierta a inspección pública nº 0952221)
Pantoea ananatis AJ13601 (FERM BP-7207, Patente europea abierta a inspección pública nº 0952221)

20 Aunque estas cepas se identificaron y se depositaron como *Enterobacter agglomerans* cuando estas cepas se aislaron, están clasificadas actualmente como *Pantoea ananatis* sobre la base de un análisis de secuencia de nucleótidos del ARNr 16S, etc., tal como se ha descrito anteriormente.

25 A continuación se describen procedimientos para impartir capacidad productora de L-aminoácidos a bacterias de *Pantoea ananatis*, o procedimientos para potenciar la capacidad productora de L-aminoácidos de dichas bacterias.

30 Para impartir capacidad para producir un L-aminoácido pueden utilizarse los procedimientos que se utilizan en el cultivo de bacterias corineformes o bacterias del género *Escherichia* (véase "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1ª edición, publicado el 30 de mayo de 1986, páginas 77-100). Dichos procedimientos incluyen la adquisición de un mutante auxotrófico, una cepa resistente a análogos o un mutante de regulación metabólica, la construcción de una cepa recombinante en la que está potenciada la expresión de la biosíntesis de L-aminoácidos, etc. En el presente documento, en el cultivo de bacterias que producen L-aminoácidos, las propiedades impartidas tales como una mutación auxotrófica, resistencia a análogos o mutación de regulación metabólica pueden ser una o varias. La expresión de enzima(s) de biosíntesis de L-aminoácidos puede potenciarse sola o en combinaciones de dos o más. Además, los procedimientos de impartición de propiedades tales como una mutación auxotrófica, resistencia a análogos o mutación de regulación metabólica pueden combinarse con los procedimientos de potenciación de enzimas de biosíntesis.

40 Una cepa mutante auxotrófica, una cepa resistente a análogos de L-aminoácidos o una cepa mutante de regulación metabólica con la capacidad para producir un L-aminoácido pueden obtenerse sometiendo una cepa progenitora o una cepa de tipo silvestre a mutagénesis convencional, tal como exposición a rayos X o irradiación UV, o tratamiento con un mutágeno tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), metanosulfonato de etilo (EMS), etc., seleccionando a continuación aquellas que muestran autotrofia, resistencia a análogos o una mutación de regulación metabólica y que también tienen capacidad para producir un L-aminoácido.

45 Por lo tanto, a continuación se ejemplifican bacterias que producen L-aminoácidos o procedimientos de construcción de las mismas.

Bacterias productoras de ácido L-glutámico

50 En primer lugar, las bacterias productoras de ácido L-glutámico se explican como bacterias productoras de L-aminoácidos.

55 Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de ácido L-glutámico incluyen cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como *E. coli* VL334thrC⁺ (patente europea nº 1172433). La *E. coli* VL334 (VKPM B-4641) es una cepa auxotrófica de L-isoleucina y L-treonina que tiene mutaciones en los genes *thrC* e *ilvA* (patente US nº 4.278.765). Un alelo de tipo silvestre del gen *thrC* se transfirió mediante el procedimiento de transducción general utilizando un bacteriófago P1 cultivado en células K12 (VKPM B-7) de la cepa de *E. coli* de tipo silvestre. Como resultado se obtuvo una cepa auxotrófica de L-isoleucina, VL334thrC⁺ (VKPM B-8961).

60 Los ejemplos de procedimientos para impartir capacidad productora de ácido L-glutámico a una bacteria o potenciar la capacidad de una bacteria incluyen, por ejemplo, modificar una bacteria de forma que se potencie la expresión de un gen que codifica una enzima implicada en la biosíntesis de ácido L-glutámico.

65 Los ejemplos de enzimas implicadas en la biosíntesis de ácido L-glutámico incluyen glutamato deshidrogenasa (en adelante denominada también "GDH") (*gdh*), glutamina sintetasa (*glnA*), glutamato sintetasa (*gltAB*),

isocitrato deshidrogenasa (*icdA*), aconitato hidratasa (*acnA*, *acnB*), citrato sintasa (en adelante denominada también "CS") (*gltA*), metilcitrato sintasa (en adelante denominada también "PRPC") (*prpC*), fosfoenolpiruvato carboxilasa (en adelante denominada también "PEPC") (*ppc*), piruvato carboxilasa (*pyc*), piruvato deshidrogenasa (*aceEF*, *lpdA*), piruvato cinasa (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintasa (*ppsA*), enolasa (*eno*), fosfogliceromutasa (*pgrmA*, *pgrmI*), fosfoglicerato cinasa (*pgk*), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*gapA*), triosa fosfato isomerasa (*tpiA*), fructosa bisfosfato aldolasa (*fbp*), fosfofructocinasa (*pfkA*, *pfkB*) y glucosa fosfato isomerasa (*pgi*), etc. Las abreviaturas en paréntesis son los nombres de los genes que corresponden a las enzimas, y esta convención se utiliza a lo largo de la presente memoria descriptiva. Entre estas enzimas, se prefieren una o más de CS o PRPC, PEPC y GDH y son más preferidas las tres enzimas (remítase al documento WO 2006/051660).

A continuación se explicarán procedimientos de modificación de una bacteria para aumentar la expresión del gen diana.

El primer procedimiento es un procedimiento de aumento del número de copias de un gen diana. Por ejemplo, el número de copias de un gen diana puede aumentarse clonando el gen diana en un plásmido apropiado y transformando una bacteria huésped con el plásmido obtenido. Por ejemplo, cuando el gen diana es el gen que codifica CS (gen *gltA*), el gen que codifica PRPC (gen *prpC*), el gen que codifica PEPC (gen *ppc*) o el gen que codifica GDH (gen *gdhA*), las secuencias de nucleótidos de estos genes de bacterias *Escherichia* y bacterias *Corynebacterium* se han elucidado ya (Biochemistry, vol. 22, páginas 5243-5249, 1983; J. Biochem., vol. 95, páginas 909-916, 1984; Gene, vol. 27, páginas 193-199, 1984; Microbiology, vol. 140, páginas 1817-1828, 1994; Mol. Gen. Genet., vol. 218, páginas 330-339, 1989; Molecular Microbiology, vol. 6, páginas 317-326, 1992), y por lo tanto pueden obtenerse sintetizando cebadores basados en las secuencias de nucleótidos respectivas y realizando una PCR utilizando ADN cromosómico de una bacteria perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae* como plantilla.

Los ejemplos de los plásmidos utilizados para la transformación incluyen un plásmido que se replica de forma autónoma en la bacteria huésped perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*, tal como pUC19, pUC18, pBR322, RSF1010, pHSG299, pHSG298, pHSG399, pHSG398, pSTV28, pSTV29 (pHSG y pSTV están disponibles en Takara Bio Inc.), pMW119, pMW118, pMW219, pMW218 (los vectores pMW están disponibles en Nippon Gene Co., Ltd.), etc. Además, también puede utilizarse un ADN de fago como vector en lugar de un plásmido. Los ejemplos de plásmidos para potenciar simultáneamente actividades de CS o PRPC, PEPC y GDH descritos anteriormente incluyen RSFCPG incorporado con el gen *gltA*, el gen *ppc* y el gen *gdhA* (remítase a la patente europea abierta a inspección pública nº 0952221), y RSFPPG correspondiente a RSFCPG en el que el gen *gltA* se ha reemplazado por el gen *prpC* (remítase a los ejemplos).

Los ejemplos de procedimientos de transformación incluyen el tratamiento de células receptoras con cloruro de calcio con el fin de aumentar la permeabilidad del ADN, del que se ha informado para *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. y Higa, A., 1970, J. Mol. Biol., 53:159-162), y la preparación de células competentes a partir de células que están en la fase de crecimiento, seguida de la transformación con ADN, de la que se ha informado para *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H., Wilson, G. A. y Young, F. E. 1977, Gene, 1:153-167). Como alternativa, también puede utilizarse un procedimiento de fabricación de células receptoras de ADN en protoplastos o esferoplastos que puedan aceptar fácilmente ADN recombinante, seguido de la introducción del ADN recombinante en las células, que se sabe que puede aplicarse a *Bacillus subtilis*, actinomicetos y levaduras (Chang, S. y Choen, S.N., 1979, Mol. Gen. Genet., 168:111-115; Bibb, M.J. *et al.*, 1978, Nature, 274:398-400; Hinnen, A., Hicks, J.B. y Fink, G. R. 1978, Proc. Natl. Sci., USA, 75:1929-1933). Además, también pueden transformarse microorganismos mediante el procedimiento del pulso eléctrico (patente japonesa abierta a inspección pública 2-207791).

El número de copias de un gen también puede aumentarse introduciendo múltiples copias del gen en el ADN cromosómico del microorganismo, que puede transformarse mediante recombinación homóloga (Millerl, J. H. Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory) utilizando múltiples copias de una secuencia como dianas en el ADN cromosómico. Las secuencias presentes en múltiples copias en el ADN cromosómico incluyen ADN repetitivos y repeticiones invertidas presentes en el extremo de un elemento transponible. Por lo tanto, tal como se divulga en la patente japonesa abierta a inspección pública nº 2-109985, es posible incorporar el gen diana en un transposón, y permitirle transferirse para introducir múltiples copias del gen en el ADN cromosómico. El gen diana también puede introducirse en el cromosoma bacteriano mediante fago Mu (patente japonesa abierta a inspección pública nº 2-109985) o similares.

El segundo procedimiento consiste en aumentar la expresión del gen diana reemplazando una secuencia reguladora de la expresión del gen diana, tal como un promotor, en el ADN o plásmido cromosómico por un promotor más fuerte. Por ejemplo, se conocen como promotores fuertes el promotor lac, el promotor trp, el promotor trc, el promotor PR, el promotor lacUV5, etc. Además, también es posible sustituir varios nucleótidos en la región promotora de un gen de forma que el promotor se modifique para ser más fuerte, tal como se divulga en la publicación internacional de patente WO 00/18935. En un artículo de Goldstein *et al.* (Prokaryotic promoters in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128), etc., se describen ejemplos de

promotores fuertes y procedimientos para evaluar la fuerza de promotores.

La sustitución de una secuencia reguladora de la expresión puede realizarse, por ejemplo, del mismo modo que en la sustitución de genes, utilizando un plásmido sensible a la temperatura. Los ejemplos de vectores que tienen un origen de replicación sensible a la temperatura y que pueden utilizarse por la bacteria de la presente invención perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* incluyen, por ejemplo, el plásmido pMAN997 descrito en la publicación internacional WO 99/03988, etc.

Además, es conocido que las sustituciones de varios nucleótidos en un espaciador entre el sitio de unión a ribosoma (RBS) y el codón de inicio, en particular una secuencia inmediatamente corriente arriba del codón de inicio, afecta enormemente a la eficacia de traducción de ARNm. Modificando estos, puede mejorarse la cantidad de traducción.

La modificación de una secuencia de control de la expresión puede combinarse con el procedimiento de aumento del número de copias de un gen descrito anteriormente.

Los ejemplos de los procedimientos para la sustitución de genes tal como se ha descrito anteriormente incluye procedimientos que utilizan ADN lineal, tal como "integración dirigida por Red" (Datsenko, K. A. y Wanner, B. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97:6640-6645 (2000)), e integración dirigida por Red en combinación con el sistema de escisión de fago λ (Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F. 2002, J. Bacteriol., 184:5200-5203) (documento WO 2005/010175), etc., procedimientos que utilizan un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a la temperatura, procedimientos que utilizan un plásmido capaz de realizar una transferencia conjugativa, procedimientos que utilizan un vector suicida que no tiene un origen de replicación que pueda utilizarse en el huésped elegido (patente US nº 6.303.383, patente japonesa abierta a inspección pública nº 05-007491), etc.

Como se muestra en el Ejemplo de referencia 1, una cepa resistente a un producto génico de Red de λ , por ejemplo la cepa SC17(0) de *Pantoea ananatis*, puede utilizarse de forma adecuada para la integración dirigida por Red. La cepa SC17(0) se depositó en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNI Genetika (Rusia, 117545 Moscú 1, Dorozhny proezd. 1) el 21 de septiembre de 2005 con el número de registro VKPM B-9246.

Los ejemplos de microorganismos modificados por el procedimiento descrito anteriormente para potenciar la expresión del gen de citrato sintasa, el gen de metilcitrato sintasa, el gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o el gen de glutamato deshidrogenasa incluyen los microorganismos divulgados en las patentes japonesas abiertas a inspección pública nº 2001-333769, 2000-106869, 2000-189169, 2000-333769, 2006-129840, el documento WO 2006/051660, etc.

Además, también puede impartirse capacidad productora de ácido L-glutámico potenciando la actividad de 6-fosfogluconato deshidratasa, la actividad de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa o estas dos actividades. Los ejemplos de los microorganismos en los que se aumenta la actividad de 6-fosfogluconato deshidratasa y la actividad de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa incluyen el microorganismo divulgado en la patente japonesa abierta a inspección pública nº 2003-274988.

La modificación para impartir capacidad productora de ácido L-glutámico o para potenciarla también puede obtenerse reduciendo o eliminando la actividad de una enzima que cataliza una reacción que se desvía de la ruta de biosíntesis de ácido L-glutámico y que produce un compuesto diferente al ácido L-glutámico. Los ejemplos de dicha enzima que cataliza una reacción que se desvía de la ruta de biosíntesis de ácido L-glutámico y que produce un compuesto diferente al ácido L-glutámico incluyen 2-oxoglutarato deshidrogenasa (α -cetoglutarato deshidrogenasa (*sucA*)), isocitrato liasa (*aceA*), fosfato acetiltransferasa (*pta*), acetato cinasa (*ack*), acetohidroxi ácido sintasa (*ilvG*), acetolactato sintasa (*ilvI*), formiato acetiltransferasa (*pfl*), lactato deshidrogenasa (*ldh*), glutamato descarboxilasa (*gadAB*), 1-pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasa (*putA*), etc. Se prefiere particularmente reducir o eliminar la actividad de 2-oxoglutarato deshidrogenasa entre estas enzimas.

Con el fin de reducir o eliminar las actividades de las enzimas mencionadas anteriormente, pueden introducirse mutaciones para reducir o eliminar actividades intracelulares de las enzimas en genes de las enzimas mencionadas anteriormente mediante tratamiento de mutagénesis habitual o una técnica de ingeniería genética. Los ejemplos del tratamiento de mutagénesis incluyen, por ejemplo, procedimientos que utilizan irradiación con rayos X o rayos ultravioleta, procedimientos que utilizan tratamiento con un mutagén tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etc. El sitio del gen en el que se introduce la mutación puede ser una región codificante que codifica una proteína enzimática o una región para la expresión reguladora tal como un promotor. Los ejemplos de técnicas de ingeniería genética incluyen procedimientos que utilizan recombinación genética, transducción, fusión de células, etc.

La reducción o la carencia de la actividad intracelular de una enzima diana y el grado de reducción de la actividad pueden confirmarse midiendo la actividad de la enzima en un extracto celular, o una fracción purificada del mismo, obtenido a partir de una cepa candidata y comparándola con la de la cepa de tipo silvestre. Por

ejemplo, la actividad de 2-oxoglutarato deshidrogenasa puede medirse mediante el procedimiento de Reed *et al.* (L. J. Reed y B. B. Mukherjee, *Methods in Enzymology*, 13, páginas 55-61 (1969)).

Las bacterias pertenecientes al género *Escherichia* que carecen de actividad de 2-oxoglutarato deshidrogenasa o que tienen una actividad de 2-oxoglutarato deshidrogenasa reducida incluyen las cepas siguientes (patentes US nº 5.378.616 y 5.573.945):

E. coli W3110sucA::Kmr
E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)
E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)
E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

La *E. coli* W3110sucA::Kmr es una cepa obtenida alterando el gen de 2-oxoglutarato deshidrogenasa (gen *sucA*) de *E. coli* W3110. Esta cepa carece completamente de α -cetoglutarato deshidrogenasa.

Específicamente, los ejemplos de bacterias en las que la actividad de 2-oxoglutarato deshidrogenasa está suprimida o reducida incluyen las cepas siguientes:

Pantoea ananatis AJ13601 (FERM BP-7207, patente europea abierta a inspección pública nº 1078989)
Pantoea ananatis AJ13356 (FERM BP-6615, patente US nº 6.331.419)
Pantoea ananatis SC17sucA (FERM BP-8646, WO 2005/085419)
Cepa AJ13410 de *Klebsiella planticola* (FERM BP-6617, patente US nº 6.197.559)

La cepa SC17sucA es una cepa obtenida seleccionando una cepa mutante de producción de flema reducida (SC17) a partir de la cepa AJ13355, que se aisló de la naturaleza como una cepa que podría proliferar en un medio que contiene ácido L-glutámico y una fuente de carbono a pH reducido, y alterando el gen de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (*sucA*) de la cepa mutante. La cepa AJ13601 se obtuvo introduciendo un plásmido RSFPCG que contenía los genes *gltA*, *ppc* y *gdhA* derivados de *Escherichia coli* y un plásmido pSTVCB que contenía el gen *gltA* derivado de *Brevibacterium lactofermentum* en la cepa SC17sucA para obtener la cepa SC17sucA/RSFPCG+pSTVCB, y seleccionando una cepa resistente a una concentración elevada de ácido L-glutámico a pH reducido, y una cepa que muestra un elevado grado de proliferación y una capacidad elevada de producción de ácido L-glutámico a partir de la cepa SC17sucA/RSFPCG+pSTVCB (patente europea abierta a inspección pública nº 0952221). La cepa AJ13356 se obtuvo suprimiendo el gen de la subunidad α KGDH-E1 (*sucA*) de la cepa AJ13355. Además, la cepa NP106 descrita en los ejemplos corresponde a la cepa AJ13601 de la que se ha eliminado el plásmido RSFPCG+pSTVCB.

Las cepas de *Pantoea ananatis* AJ13355 y AJ13356 se depositaron el 19 de febrero de 1998 en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology (agencia administrativa actualmente independiente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, depositario del organismo de patentes internacional, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón), con los números de depósito FERM P-16644 y FERM P-16645 respectivamente, y se transfirieron del depósito original al depósito internacional en base al Tratado de Budapest el 11 de enero de 1999, y se depositaron con los números de registro FERM BP-6644 y FERM BP-6615, respectivamente. A la cepa SC17sucA se le asignó el número privado AJ417 y se depositó en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, depositario del organismo de patentes internacional (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japón, código postal: 305-8566) el 26 de febrero de 2004 y se le asignó el número de registro FERM BP-08646. La cepa de *Pantoea ananatis* AJ13601 se depositó el 18 de agosto de 1999 en el National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology (agencia administrativa actualmente independiente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, depositario del organismo de patentes internacional, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón), con el número de depósito FERM P-17156, y se transfirió del depósito original al depósito internacional en base al Tratado de Budapest el 6 de julio del 2000, y se depositó con el número de registro FERM BP-7207.

Las cepas de *Pantoea ananatis* AJ13355, AJ13356 y AJ13601 y la cepa de *Klebsiella planticola* AJ13399 mencionadas anteriormente tienen una capacidad de acumulación de ácido L-glutámico en una cantidad que excede la cantidad que proporciona la concentración de saturación de ácido L-glutámico en un medio líquido cuando se cultivan en condiciones ácidas.

Además, con el fin de mejorar la capacidad productora de ácido L-glutámico de bacterias *Enterobacteriaceae*, también puede utilizarse el procedimiento de eliminación del gen *arcA* (patente US nº 7.090.998), y el procedimiento de amplificación del gen *yhfK*, que es un gen de secreción de ácido glutámico (documento WO 2005/085419).

El procedimiento mencionado anteriormente de potenciación o de eliminación de la actividad de la enzima se puede aplicar de forma similar a bacterias productoras de otros aminoácidos descritas más adelante.

Industrial Microorganisms (VKP) (Rusia, 117545 Moscú, 1 Dorozhny proezd. 1) el 7 de abril de 1987, con el número de registro VKPM B-3996.

5 También puede usarse la cepa de *E. coli* VKPM B-5318 (publicación de patente europea nº 0593792) como cepa progenitora para derivar bacterias productoras de L-treonina de la presente invención. La cepa B-5318 es prototrófica con respecto a la isoleucina, y un represor C1 de fago λ sensible a la temperatura y promotor PR reemplaza la región reguladora del operón de treonina en el plásmido pVIC40. La cepa VKPM B-5318 se depositó en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) el 3 de mayo de 1990 con el número de registro VKPM 3-5318.

Preferentemente, la bacteria de la presente invención se modifica adicionalmente para potenciar la expresión de uno o más de los genes siguientes:

- 15 - gen *thrA* mutante que codifica la aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I resistente a la inhibición por retroalimentación mediante treonina;
- gen *thrB* que codifica homoserina cinasa;
- 20 - el gen *thrC* que codifica treonina sintasa;
- el gen *rhtP* que codifica una proteína transmembranal putativa;
- el gen *asd* que codifica aspartato- β -semialdehído deshidrogenasa; y
- 25 - el gen *aspC* que codifica aspartato aminotransferasa (aspartato transaminasa).

El gen *thrA* que codifica aspartocinasa homoserina deshidrogenasa I de *Escherichia coli* se ha elucidado (posiciones de nucleótidos 337 a 2799, nº de registro de GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). El gen *thrA* se ubica entre los genes *thrL* y *thrB* en el cromosoma de *E. coli* K-12. El gen *thrB* que codifica homoserina cinasa de *Escherichia coli* se ha elucidado (posiciones de nucleótidos 2801 a 3733, nº de registro de GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). El gen *thrB* se localiza entre los genes *thrA* y *thrC* en el cromosoma de *E. coli* K-12. El gen *thrC* que codifica treonina sintasa de *Escherichia coli* se ha elucidado (posiciones de nucleótidos 3734 a 5020, nº de registro de GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). El gen *thrC* se localiza entre el gen *thrB* y el marco de lectura abierto *yaaX* en el cromosoma de *E. coli* K-12. Los tres genes funcionan como un único operón de treonina. Para potenciar la expresión del operón de treonina, la región atenuante que afecta a la transcripción, de forma deseable, se elimina del operón (documentos WO 2005/049808, WO 2003/097839).

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

El gen *rhtA* existe a 18 min en el cromosoma de *E. coli* cercano al operón *glnHPQ*, que codifica componentes del sistema de transporte de glutamina. El gen *rhtA* es idéntico al ORF1 (gen *ybiF*, posiciones de nucleótidos 764 a 1651, número de registro de GenBank AAA218541, gi: 440181) y se ubica entre los genes *pexB* y *ompX*. La unidad que expresa una proteína codificada por el ORF1 se ha designado el gen *rhtA* (*rht*: resistencia a homoserina y treonina). Es decir, se ha revelado que la mutación *rhtA23* es una sustitución de A por G en la posición 1 con respecto al codón de inicio ATG (RESÚMENES del 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology en combinación con el Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California, 24-29 de agosto de 1997, resumen nº 457, patente europea abierta a inspección pública nº 1013765).

El gen *asd* de *E. coli* se ha elucidado ya (posiciones de nucleótidos 3572511 a 3571408, nº de registro de GenBank NC_000913.1, gi: 16131307), y puede obtenerse por PCR (reacción en cadena de la polimerasa; remítase a White, T. J. *et al.*, Trends Genet., 5, 185 (1989)) utilizando cebadores preparados basados en la secuencia de nucleótidos del gen. Los genes *asd* de otros microorganismos pueden obtenerse de una forma similar.

60 Por lo tanto, el gen *aspC* de *E. coli* se ha elucidado ya (posiciones de nucleótidos 983742 a 984932, nº de registro de GenBank NC_000913.1, gi: 16128895), y puede obtenerse por PCR. Los genes *aspC* de otros microorganismos pueden obtenerse de una forma similar.

Bacterias productoras de L-lisina

65 Los ejemplos de bacterias productoras de L-lisina pertenecientes al género *Escherichia* incluyen mutantes que

5 tienen resistencia a un análogo de L-lisina. El análogo de L-lisina inhibe el crecimiento de bacterias pertenecientes al género *Escherichia*, pero esta inhibición está totalmente o parcialmente desensibilizada cuando coexiste L-lisina en un medio. Los ejemplos del análogo de L-lisina incluyen, pero sin limitación, oxalislina, hidroxamato de lisina, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ -metil-lisina, α -clorocapro lactama, etc. Pueden obtenerse mutantes que tienen resistencia a estos análogos de lisina sometiendo bacterias pertenecientes al género *Escherichia* a un tratamiento de mutagénesis artificial convencional. Los ejemplos específicos de cepas bacterianas útiles para la producción de L-lisina incluyen *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; véase la patente US nº 4.346.170) y *Escherichia coli* VL611. En estos microorganismos, la inhibición por retroalimentación de aspartocinasa mediante L-lisina está desensibilizada.

10 La cepa WC196 puede usarse como una bacteria productora de L-lisina de *Escherichia coli*. Esta cepa bacteriana se ha cultivado confiriéndola resistencia AEC a la cepa W3110, que se derivó de K-12 de *Escherichia coli*. La cepa resultante se denominó cepa AJ13069 de *Escherichia coli* y se depositó en el National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (actualmente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, depositario del organismo de patentes internacional, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chorne, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japón) el 6 de diciembre de 1994 y recibió el número de registro FERM P-14690. Después, el depósito se convirtió en un depósito internacional bajo las disposiciones del Tratado de Budapest del 29 de septiembre de 1995, y recibió el número de registro FERM BP-5252 (patente US nº 5.827.698).

20 Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-lisina de la presente invención también incluyen cepas en las que la expresión de uno o más genes que codifican una enzima biosintética de L-lisina está potenciada. Los ejemplos de dichos genes incluyen, pero sin limitación, genes que codifican dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*), aspartocinasa (*lysC*), dihidrodipicolinato reductasa (*dapB*), diaminopimelato descarboxilasa (*lysA*), diaminopimelato deshidrogenasa (*ddh*) (patente US nº 6.040.160), fosfoenolpiruvato carboxilasa (*ppc*), aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*) y aspartasa (*aspA*) (patente europea abierta a inspección pública nº 1253195). Además, las cepas progenitoras pueden tener un nivel aumentado de expresión del gen implicado en eficiencia energética (*cyo*) (patente europea abierta a inspección pública nº 1170376), el gen que codifica nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (*pntAB*) (patente US nº 5.830.716), el gen *ybjE* (documento WO 2005/073390) o combinaciones de los mismos.

35 Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-lisina de la presente invención también incluyen cepas que tienen una actividad reducida o suprimida de una enzima que cataliza una reacción para generar un compuesto diferente a la L-lisina desviándose de la ruta biosintética de la L-lisina. Los ejemplos de enzimas que catalizan una reacción para generar un compuesto diferente a la L-lisina desviándose de la ruta biosintética de la L-lisina incluyen homoserina deshidrogenasa, lisina descarboxilasa (patente US nº 5.827.698) y la enzima málica (documento WO 2005/010175).

40 Bacterias productoras de L-cisteína

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-cisteína de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tales como *E. coli* JM15, que está transformada con diferentes alelos *cysE* que codifican serina acetiltransferasas resistentes a retroalimentación (patente US nº 6.218.168, solicitud de patente rusa nº 2003121601); *E. coli* W3110 que tiene genes sobreexpresados que codifican proteínas adecuadas para segregar sustancias tóxicas para las células (patente US nº 5.972.663); cepas de *E. coli* que tienen actividad de cisteína desulfhidrasa (documento JP11155571A2); *E. coli* W3110 con actividad aumentada de un regulador transcripcional positivo para regulón de cisteína codificado por el gen *cysB* (documento WO 0127307A1) y similares.

50 Bacterias productoras de L-leucina

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-leucina de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tales como cepas de *E. coli* resistentes a leucina (por ejemplo, la cepa 57 (VKPM B-7386, patente US nº 6.124.121)) o análogos de leucina que incluyen β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluoroleucina (publicación de patente japonesa nº 62-34397 y patente japonesa abierta a inspección pública nº 8-70879); cepas de *E. coli* obtenidas mediante el procedimiento de ingeniería genética descrito en el documento WO 96/06926; *E. coli* H-9068 (patente japonesa abierta a inspección pública nº 8-70879) y similares.

60 La bacteria de la presente invención puede mejorarse potenciando la expresión de uno o más genes implicados en la biosíntesis de L-leucina. Los ejemplos de dichos genes incluyen el operón *leuABCD*, del que es un ejemplo típico preferido un gen *leuA* mutante que codifica isopropilmalato sintasa desensibilizado a la inhibición por retroalimentación mediante L-leucina (patente US nº 6.403.342). Además, la bacteria de la presente invención puede mejorarse potenciando la expresión de uno o más genes que codifican proteínas que excretan L-aminoácidos a partir de la célula bacteriana. Los ejemplos de dichos genes incluyen los genes *b2682* y *b2683* (genes *ygaZH*) (patente europea abierta a inspección pública nº 1239041 A2).

Bacterias productoras de L-histidina

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-histidina de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como la cepa 24 de *E. coli* (VKPM B-5945, RU2003677); la cepa 80 de *E. coli* (VKPM B-7270, RU2119536); *E. coli* NRRL B-12116 - B12121 (patente US nº 4.388.405); *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675) y H-9343 (FERM BP-6676) (patente US nº 6.344.347); *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (patente europea nº 1085087); *E. coli* AI80/pFN201 (patente US nº 6.258.554) y similares.

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-histidina de la presente invención también incluyen cepas en las que la expresión de uno o más genes que codifican una enzima biosintética de L-histidina está potenciada. Los ejemplos de dichos genes incluyen genes que codifican ATP fosforribosiltransferasa (*hisG*), fosforribosil AMP ciclohidrolasa (*hisI*), fosforribosil-ATP pirofosfohidrolasa (*hisE*), fosforribosilformimino-5-aminoimidazolo carboxamida ribótido isomerasa (*hisA*), amidotransferasa (*hisH*), histidinol fosfato aminotransferasa (*hisC*), histidinol fosfatasa (*hisB*), histidinol deshidrogenasa (*hisD*), etc.

Es conocido que las enzimas biosintéticas de L-histidina codificadas por *hisG* y *bisBHAFI* están inhibidas por L-histidina, y por lo tanto también puede potenciarse eficazmente la capacidad productora de L-histidina introduciendo una mutación que confiera resistencia a la inhibición por retroalimentación en el gen de ATP fosforribosiltransferasa (*hisG*) (patentes rusas nº 2003677 y nº 2119536).

Los ejemplos específicos de cepas que tienen capacidad productora de L-histidina incluyen *E. coli* FERM P-5038 y 5048, a las que se ha introducido un vector que porta un ADN que codifica una enzima biosintética de L-histidina (patente japonesa abierta a inspección pública nº 56-005099), cepas de *E. coli* a las que se ha introducido *rht*, un gen para exportar aminoácidos (patente europea abierta a inspección pública nº 1016710), la cepa 80 de *E. coli* impartida con sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina, y resistencia a estreptomina (VKPM B-7270, patente rusa nº 2119536), etc.

Bacterias productoras de L-fenilalanina

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-fenilalanina de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como *E. coli* AJ12739 (*tyrA::Tn10*, *tyrR*) (VKPM B-8197); *E. coli* HW1089 (ATCC 55371) que aloja un gen *pheA34* mutante (patente US nº 5.354.672); *E. coli* MWEC101-b (KR8903681); *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 y NRRL B-12147 (patente US nº 4.407.952). También, como cepa progenitora, puede utilizarse *E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAB (FERM BP-3566), *E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAD] (FERM BP12659), *E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHATerm] (FERM BP-12662) y *E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pBR-aroG4, pACMAB] denominada AJ12604 (FERM BP-3579) (publicación de patente europea nº 488424 B1). Además, también pueden utilizarse bacterias productoras de L-fenilalanina del género *Escherichia* con una actividad potenciada de la proteína codificada por el gen *yedA* o el gen *yddG* (publicaciones de solicitudes de patente US nº 2003/0148473 A1 y 2003/0157 667 A1, respectivamente).

Bacterias productoras de L-triptófano

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar las bacterias productoras de L-triptófano de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tales como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) y JP6015/pMU91 (DSM10123) que carecen de triptofanil-ARNt sintetasa codificada por el gen *trpS* mutante (patente US nº 5.756.345); *E. coli* SV164 (pGH5) que tiene un alelo *serA* que codifica fosfoglicerato deshidrogenasa que carece de inhibición por retroalimentación mediante serina y un alelo *trpE* que codifica antranilato sintasa que carece de inhibición por retroalimentación mediante triptófano (patente US nº 6.180.373); *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) y AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) que carecen de la enzima triptofanasa (patente US nº 4.371.614); *E. coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps en la que la capacidad de producción de fosfoenolpiruvato está potenciada (documento WO 97/08333, patente US nº 6.319.696) y similares. También pueden utilizarse bacterias productoras de L-triptófano del género *Escherichia* con una actividad potenciada de la proteína codificada por el gen *yedA* o el gen *yddG* (publicaciones de solicitudes de patente europeas nº 2003/0148473 A1 y 2003/0157667 A1).

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar las bacterias productoras de L-triptófano de la presente invención también incluyen cepas en las que están potenciadas una o más actividades de enzimas seleccionadas de antranilato sintasa (*trpE*), fosfoglicerato deshidrogenasa (*serA*) y triptófano sintasa (*trpAB*). La antranilato sintasa y la fosfoglicerato deshidrogenasa están ambas sometidas a inhibición por retroalimentación mediante L-triptófano y L-serina y, por lo tanto, puede introducirse en estas enzimas una mutación desensibilizadora de la inhibición por retroalimentación. Los ejemplos específicos de cepas que tienen dicha mutación incluyen *E. coli* SV164, que aloja antranilato sintasa desensibilizada, y una cepa transformante obtenida mediante introducción, en la *E. coli* SV164, del plásmido pGH5 (documento WO 94/08031), que

contiene un gen *serA* mutante que codifica fosfoglicerato deshidrogenasa desensibilizada de inhibición por retroalimentación.

5 Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar las bacterias productoras de L-triptófano de la presente invención también incluyen cepas en la que se ha introducido el operón de triptófano que contiene un gen que codifica antranilato sintasa desensibilizada (patentes japonesas abiertas a inspección pública nº 57-71397, 62-244382, patente US nº 4.371.614). Además, puede impartirse capacidad productora de L-triptófano potenciando la expresión de un gen que codifica triptófano sintasa, entre operones de triptófano (*trpBA*). La triptófano sintasa
10 consiste en subunidades α y β que están codificadas por los genes *trpA* y *trpB*, respectivamente. Además, la capacidad productora de L-triptófano puede mejorarse potenciando la expresión del operón de isocitrato liasamalo sintasa (documento WO 2005/103275)

Bacterias productoras de L-prolina

15 Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-prolina de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cepas que pertenecen al género *Escherichia*, tales como *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012) que carece del gen *ilvA* y es capaz de producir L-prolina (patente europea nº 1172433).

20 La bacteria de la presente invención puede mejorarse potenciando la expresión de uno o más genes implicados en la biosíntesis de L-prolina. Los ejemplos de dichos genes para bacterias productoras de L-prolina que son preferidos incluyen el gen *proB* que codifica glutamato cinasa del que está desensibilizada la inhibición por retroalimentación mediante L-prolina (patente alemana nº 3127361) . Además, la bacteria de la presente invención puede mejorarse potenciando la expresión de uno o más genes que codifican proteínas que excretan L-aminoácidos a partir de la célula bacteriana. Los ejemplos de dichos genes incluyen los genes *b2682* y *b2683*
25 (genes *ygaZH*) (patente europea abierta a inspección pública nº 1239041 A2).

Los ejemplos de bacterias pertenecientes al género *Escherichia* que tienen actividad productora de L-prolina incluyen las cepas de *E. coli* siguientes: NRRL 3-12403 y NRRL B-12404 (patente británica nº 2075056), VKPM B-8012 (solicitud de patente rusa nº 2000124295), mutantes de plásmidos descritos en la patente alemana nº 3127361, mutantes de plásmidos descritos por Bloom F.R. *et al* (El 15º simposio de invierno de Miami, 1983, página 34) y similares.

Bacterias productoras de L-arginina

35 Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-arginina de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tales como la cepa 237 de *E. coli* (VKPM B-7925) (publicación de solicitud de patente US nº 2002/058315 A1) y sus cepas derivadas que alojan N-acetilglutamato sintasa mutante (solicitud de patente rusa nº 2001112869), la cepa 382 de *E. coli* (VKPM B-7926) (patente europea abierta a inspección pública nº 1170358A1), una cepa productora de arginina en la que se ha
40 introducido el gen *argA* que codifica N-acetilglutamato sintetasa (patente europea abierta a inspección pública nº 1170361A1) y similares.

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-arginina de la presente invención también incluyen cepas en las que la expresión de uno o más genes que codifican una enzima biosintética de L-arginina está potenciada. Los ejemplos de dichos genes incluyen genes que codifican N-acetilglutamil fosfato reductasa (*argC*), ornitina acetil transferasa (*argJ*), N-acetilglutamato cinasa (*argB*), acetilornitina transaminasa (*argD*), ornitina carbamoil transferasa (*argF*), ácido argininosuccínico sintetasa (*argG*), ácido argininosuccínico liasa (*argH*) y carbamoil fosfato sintetasa (*carAB*).

Bacterias productoras de L-valina

Los ejemplos de cepas progenitoras para derivar bacterias productoras de L-valina de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cepas que se han modificado para que sobreexpresen el operón *ilvGMEDA* (patente US nº 5.998.178). Es deseable eliminar la región del operón *ilvGMEDA*.

<1-2> Aumento del sistema *kdp*

Los microorganismos de la presente invención pueden obtenerse modificando el microorganismo de *Pantoea ananatis* que tiene una capacidad productora de L-aminoácidos tal como se ha descrito anteriormente de forma
60 que se aumente el sistema *kdp*. No obstante, después de modificar un microorganismo de modo que se aumente el sistema *kdp*, puede impartirse capacidad productora de L-aminoácidos al microorganismo.

El sistema *kdp* puede potenciarse mediante una modificación que aumente la expresión del operón *kdp* o uno o más genes que constituyen el operón *kdp*, y dicho aumento de la expresión puede basarse en la potenciación de la expresión de un gen endógeno mediante modificación de una región de control de la expresión tal como una modificación de un promotor o similar, o la potenciación de la expresión de un gen exógeno mediante

introducción de un plásmido que contenga el operón o cualquiera de los genes. Estos procedimientos pueden realizarse de forma combinada. El sistema *kdp* también puede potenciarse aumentando la traducción del operón *kdp* o cualquiera de los genes que codifican el operón *kdp*.

- 5 En la presente invención, el "sistema *kdp*" significa una ATPasa de tipo P (ATPasa de tipo P transportadora de potasio) que actúa sobre el sistema de transporte de potasio de alta afinidad (EC 3.6.3.12).

10 El estado de "estar modificado de forma que el sistema *kdp* esté potenciado" significa un estado en el que el transporte de potasio mencionado anteriormente por la ATPasa de tipo P está potenciado, más específicamente un estado en el que el microorganismo está modificado de forma que la actividad de ATPasa de tipo P del mismo está potenciada. Dicho estado corresponde a, por ejemplo, un estado en el que el número de moléculas de la proteína ATPasa de tipo P por célula está aumentado en comparación con el de la cepa progenitora o una cepa silvestre, o un estado en el que la actividad de ATPasa de tipo P por molécula está aumentada en comparación con la de la cepa progenitora o una cepa silvestre. La modificación se realiza preferentemente de forma que la actividad de ATPasa de tipo P por célula esté aumentada el 150% por ciento o más, preferentemente el 200% o más, de forma más preferida el 300% o más, con respecto a la actividad de la cepa progenitora o una cepa silvestre. El microorganismo de tipo silvestre de *Pantoea ananatis* utilizado como referencia para la comparación es, por ejemplo, *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6615).

20 El aumento de la expresión del operón *kdp* puede confirmarse mediante comparación de la cantidad de ARNm del mismo con la de la cepa de tipo silvestre o no modificada. Los ejemplos del procedimiento para confirmar la expresión incluyen hibridación Northern y RT-PCR (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Estados Unidos, 2001). El grado del aumento de la expresión no está particularmente limitado siempre que aumente en comparación con la de la cepa silvestre o la cepa no modificada. No obstante, es deseable un aumento, por ejemplo, de 1,5 veces o más, preferentemente de 2 veces o más, de forma más preferida de 3 veces o más, en comparación con la de una cepa silvestre o una cepa no modificada.

30 La actividad de ATPasa de tipo P puede medirse, por ejemplo, extrayendo el sistema *kdp* de un microorganismo que lo tenga, purificándolo (remítase a Siebers, A. *et al.*, Eur. J. Biochem., 178, 131 (1988)) y midiendo la actividad de ATPasa de tipo P del sistema de *kdp* purificado (remítase a Arnold, A. *et al.*, Anal. Biochem., 71, 209 (1976)).

35 El sistema *kdp* consiste en tres subunidades codificadas por el operón *kdp*, y como para *E. coli*, se proporcionan los siguientes comentarios con respecto a los genes de las subunidades:

kdpA: ATPasa de sistema de transporte de potasio de alta afinidad, cadena A
kdpB: ATPasa de sistema de transporte de potasio de alta afinidad, cadena B
kdpC: ATPasa de tipo P de sistema de transporte de potasio de alta afinidad, cadena C

40 El "operón *kdp*" se refiere en la presente invención a un complejo génico que codifica las subunidades A, B y C de la ATPasa de tipo P descrita anteriormente, en la que la subunidad A está codificada por el gen *kdpA*, la subunidad B está codificada por el gen *kdpB* y la subunidad C está codificada por el gen *kdpC*. En la presente invención, el operón *kdp* puede contener un gen diferente a los genes *kdpA*, *kdpB* y *kdpC*.

45 La secuencia de nucleótidos del operón *kdp* de *Escherichia coli* se muestra en la SEC ID nº 1. Este operón contiene los seis genes siguientes, y las regiones codificantes (incluido el codón de detención) de los genes en la SEC ID nº 1 son las siguientes. Las secuencias de aminoácidos codificados por *kdpA*, *kdpB*, *kdpC*, *kdpD* y *kdpE* se muestran en las SEC ID nº 2 a nº 6, respectivamente.

50 *kdpF*: 457 a 546
kdpA: 546 a 2219
kdpB: 2242 a 4290
kdpC: 4299 a 4871
kdpD: 4864 a 7548
55 *kdpE*: 7545 a 8222

60 La secuencia de nucleótidos del operón *kdp* de *Pantoea ananatis* se muestra en la SEC ID nº 7. Este operón contiene los cuatro genes siguientes, y las regiones codificantes (incluido el codón de detención) de los genes en la SEC ID nº 7 son las siguientes. Las secuencias de aminoácidos codificados por *kdpA*, *kdpB*, *kdpC* y *kdpD* se muestran en las SEC ID nº 8 a nº 11, respectivamente.

65 *kdpA*: 543 a 2225
kdpB: 2228 a 4273
kdpC: 4284 a 4853
kdpD: 4867 a 7542

Además, la secuencia de nucleótidos del gen *kdpE* de *Pantoea ananatis* y la secuencia de aminoácidos codificada por este gen se muestra en las SEC ID nº 12 y nº 13, respectivamente.

5 En la presente memoria descriptiva, las proteínas codificadas por *kdpA*, *kdpB*, *kdpC*, *kdpD* y *kdpE* pueden indicarse como *KdpA*, *KdpB*, *KdpC*, *KdpD* y *KdpE*, respectivamente.

10 Los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de *KdpA*, *KdpB* y *KdpC* de *Pantoea ananatis* y *Escherichia coli* se muestran en las figuras 6 a 8. Las secuencias de consenso de las secuencias de *Pantoea ananatis* y *Escherichia coli* se muestran en las filas inferiores de los alineamientos. Además, las secuencias de consenso de *KdpA*, *KdpB* y *KdpC* se muestran en las SEC ID nº 57 a nº 59, respectivamente.

Las homologías de *KdpA*, *KdpB* y *KdpC* de *Pantoea ananatis* y *Escherichia coli* son el 75,36%, el 81,35% y el 59,57%, respectivamente.

15 Como para bacterias de *Escherichia*, el gen *kdpA* está registrado en el GenBank NP_415226.1 Reports potassium-transpo...To {gi: 16128674}, el gen *kdpB* en NP_415225. Reports potassium-transpo . . . [gi: 16128673], el gen *kdpC* en NP_415224. Reports potassium-transpo . . . [gi: 16128672], el gen *kdpD* en NP_415223. Reports fused sensory his... [gi: 16128671], y el gen *kdpE* en NP_415222. Reports DNA-binding respo ... [gi: 16128670].

20 Además, el operón *kdp* puede ser uno clonado utilizando un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* tal como bacterias de *Escherichia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia* y *Yersinia* en base a homologías a los genes ejemplificados anteriormente.

25 Como el operón *kdp* que se puede utilizar para la presente invención, el operón *kdp* y las regiones flanqueantes del mismo que incluyen una región de control de la expresión ubicada corriente arriba a partir del operón pueden obtenerse por PCR (reacción en cadena la polimerasa, remítase a White, T. J. *et al.*, Trends Genet., 5, 185 (1989)) utilizando cebadores preparados en base a una secuencia de nucleótidos ya elucidada de un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y ADN cromosómico de un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* como plantilla. También pueden obtenerse homólogos del operón *kdpA* de otros microorganismos de una forma similar.

35 Un homólogo de operón *kdp* significa un gen que codifica una ATPasa de tipo P, que incorpora iones potasio, derivado de otro microorganismo y que muestra una homología alta con el operón *kdp* de *Escherichia coli* o *Pantoea ananatis*. Con el gen *kdpA*, el gen *kdpB* y el gen *kdpC* derivados de otro microorganismo se quiere decir aquellos que muestran homologías del 80% o superiores, preferentemente del 90% o superiores, de forma más preferida del 95% o superiores, en particular del 97% o superiores, con las secuencias de aminoácidos totales de las SEC ID nº 2, nº 3, nº 4, nº 8, nº 9 y nº 10 y que codifican las subunidades constituyentes de una proteína que tiene actividad de ATPasa de tipo P.

40 Cada uno de los genes puede codificar variantes conservativas que tienen secuencias de aminoácidos de las SEC ID nº 2, nº 3, nº 4, nº 8, nº 9 o nº 10 que incluyen sustituciones, supresiones, inserciones o adiciones de uno o más restos de aminoácidos en una o varias posiciones, siempre que la actividad de la ATPasa de tipo P constituida por estas subunidades no se vea degradada. Aunque el número que designa el término "varias" puede diferir en función de la posición en la estructura tridimensional de tipos de restos de aminoácidos de las proteínas, es de 2 a 20, preferentemente de 2 a 10, de forma particularmente preferida de 2 a 5. Las sustituciones, las supresiones, las inserciones, las adiciones, las inversiones y similares de los aminoácidos descritos anteriormente incluyen las causadas por mutaciones de origen natural en función de diferencias individuales o diferencias en especies de los microorganismos.

50 Estas sustituciones son preferentemente sustituciones conservativas que son mutaciones neutras que proporcionan un cambio no funcional. Una mutación conservativa es una mutación en la que la sustitución tiene lugar mutuamente entre Phe, Trp, Tyr, si el sitio de sustitución es un aminoácido aromático; entre Leu, Ile, Val, si el sitio de sustitución es un aminoácido hidrófobo; entre Gln, Asn, si es un aminoácido polar; entre Lys, Arg, His, si es un aminoácido básico; entre Asp y Glu, si es un aminoácido ácido; y entre Ser y Thr, si es un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo. Los ejemplos específicos de sustituciones conservativas incluyen: sustitución de Ser o Thr por Ala; sustitución de Gln, His o Lys por Arg; sustitución de Glu, Gln, Lys, His o Asp por Asn; sustitución de Asn, Glu o Gln por Asp; sustitución de Ser o Ala por Cys; sustitución de Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg por Gln; sustitución de Gly, Asn, Gln, Lys o Asp por Glu; sustitución de Pro por Gly; sustitución de Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr por His; sustitución de Leu, Met, Val o Phe por Ile; sustitución de Ile, Met, Val o Phe por Leu; sustitución de Asn, Glu, Gln, His o Arg por Lys; sustitución de Ile, Leu, Val o Phe por Met; sustitución de Trp, Tyr, Met, Ile o Leu por Phe; sustitución de Thr o Ala por Ser; sustitución de Ser o Ala por Thr; sustitución de Phe o Tyr por Trp; sustitución de His, Phe o Trp por Tyr; y sustitución de Met, Ile o Leu por Val.

65 Además, también puede utilizarse el operón *kdp* que utiliza codones que pueden utilizarse fácilmente en un microorganismo huésped elegido en el que el gen está introducido, dado que la degeneración del gen varía en

función del microorganismo huésped. De forma similar, siempre que la producción de L-aminoácidos pueda mejorarse mediante amplificación del operón *kdp*, el operón *kdp* puede alargarse o acortarse en cualquiera de los extremos N-terminal y/o C-terminal de cada subunidad codificada por el operón en, por ejemplo, 50 o menos, preferentemente 20 o menos, de forma más preferida 10 o menos, de forma particularmente preferida 5 o menos, del número de restos de aminoácidos. Más específicamente, cada subunidad puede tener una secuencia de aminoácidos que está acortada de 5 a 50 restos de aminoácido en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos de las SEC ID nº 2, nº 3, nº 4, nº 8, nº 9 o nº 10.

Además, el operón *kdp* puede ser un ADN que se hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID nº 1 o nº 7, o una secuencia complementaria a cada una de las regiones codificantes de la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 1 o nº 7, o una sonda que puede prepararse a partir de estas secuencias, y que codifica el sistema *kdp*, es decir, la proteína que tiene actividad de ATPasa de tipo P para incorporar iones potasio.

Las "condiciones rigurosas" a las que se refiere el presente documento significan condiciones en las que se forma un denominado híbrido específico y no se forma un híbrido no específico. Es difícil definir claramente las condiciones con valores numéricos, pero ejemplos de las mismas incluyen condiciones en las que los ADN que tienen alta homología, por ejemplo, una homología del 70% o superior, preferentemente del 80% o superior, de forma más preferida del 90% o superior, de forma aún más preferida del 95% o superior, de forma particularmente preferida del 97% o superior, se hibridan entre sí y los ADN que tienen una homología inferior al valor no se hibridan entre sí; y específicamente incluyen condiciones correspondientes a la concentración de sal y a la temperatura de condiciones de lavado en hibridación Southern típica, por ejemplo, 1xSSC, 0,1% de SDS, preferentemente 0,1xSSC, 0,1% de SDS, a 60 °C.

La sonda puede ser una sonda que tiene una secuencia parcial del operón *kdp*. Dicha sonda puede prepararse por PCR utilizando oligonucleótidos preparados en base a la secuencia de nucleótidos del gen según un procedimiento bien conocido por un experto en la materia como cebadores, y un fragmento de ADN que contienen el gen como plantilla. Cuando un fragmento de ADN de una longitud de aproximadamente 300 pb se utiliza como sonda, el lavado después de la hibridación en las condiciones mencionadas anteriormente puede ser, por ejemplo, un lavado de una, dos o tres veces en las condiciones de 50 °C, 2xSSC y 0,1% de SDS.

Dicho homólogo génico al operón *kdp* puede obtenerse mediante, por ejemplo, modificación de la región codificante en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID nº 1 o nº 7 mediante mutagénesis específica del sitio de modo que la proteína codificada contenga sustituciones, supresiones, inserciones o adiciones de restos de aminoácidos de un sitio específico. Dicho gen también puede obtenerse mediante la mutagénesis conocida convencionalmente siguiente. Como para la mutagénesis, puede obtenerse un operón que codifica un sistema *kdp* muy activo introduciendo artificialmente una mutación en el operón *kdp* tratando las secuencias de nucleótidos de la SEC ID nº 1 o nº 7, o una región codificante en estas secuencias de nucleótidos in vitro con hidroxilamina o similares, o tratando un microorganismo que tiene el gen, por ejemplo, un microorganismo de este tipo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, con radiación ultravioleta o un mutagén utilizado para mutagénesis habitual tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) o metanosulfonato de etilo (EMS), mediante recombinación génica basada en PCR propensa a error (Cadwell, R.C., PCR Meth. Appl., 2, 28 (1992)), barajado de ADN (Stemmer, W.P., Nature, 370, 389 (1994)), o StEP-PCR (Zhao, H., Nature Biotechnol., 16, 258 (1998)). Puede confirmarse si un homólogo del operón *kdp* codifica la ATPasa de tipo P, por ejemplo, introduciendo el gen en un microorganismo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y que tiene capacidad productora de L-aminoácido y determinando si la capacidad productora de L-aminoácido se mejora o midiendo la actividad de ATPasa de tipo P mediante el procedimiento mencionado anteriormente.

Las descripciones anteriores relativas a variantes y homólogos también se aplican al gen *kdpD* y al gen *kdpE* que se describen más adelante.

Dicha modificación de un microorganismo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* en el que se aumenta la expresión del operón *kdp* o uno o más genes que constituyen el operón puede lograrse mediante el procedimiento mencionado anteriormente o modificando una bacteria de forma que se potencie la expresión de un gen diana. Es decir, aumentando el número de copias del operón *kdp* o cada uno de los genes que constituyen el operón que se va a expresar, y/o reemplazando la secuencia de control de la expresión del operón por una secuencia de control de la expresión más fuerte, o controlando cada uno de los genes que constituyen el operón por una secuencia de control de la expresión más fuerte, puede potenciarse la expresión del operón o de cada uno de los genes. Aunque la potenciación de la expresión de los genes que constituyen el operón *kdp* puede realizarse para el operón completo o para cada uno de los genes, la potenciación se realiza preferentemente para el operón completo. Cuando se potencia la expresión para cada gen individual, el gen que se va a potenciar puede ser uno cualquiera de los genes que constituyen el operón *kdp*, pero se prefiere potenciar la expresión de por lo menos uno o más tipos de genes entre los genes *kdpA*, *kdpB* y *kdpC*, de forma más preferida todos los genes *kdpA*, *kdpB* y *kdpC*.

El sistema *kdp* también puede potenciarse modificando una secuencia de espaciador entre el sitio de unión a

ribosoma (RBS) y el codón de inicio de cada uno de los genes de forma que se aumente la traducción de cada uno de los genes que constituye el operón *kdp*.

Además, se sabe que la expresión del operón *kdp* se controla mediante el sistema de control binario *KdpDE* codificado por el gen *kdpD* y el gen *kdpE* (J. Bacteriol., abril de 1992, 174 (7): 2152-59), y la expresión del operón *kdp* también puede aumentarse aumentando la expresión del gen *kdpD* y el gen *kdpE*.

<2> Procedimiento para producir L-aminoácido de la presente invención

10 Cultivando el microorganismo de la presente invención en un medio para producir y acumular ácido L-glutámico en el medio y recogiendo el ácido L-glutámico a partir del medio, puede producirse ácido L-glutámico.

15 Como medio utilizado para el cultivo, puede utilizarse un medio habitual que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales minerales, así como oligonutrientes orgánicos tales como aminoácidos y proteínas, según se requiera. Puede utilizarse tanto un medio sintético como un medio natural. Puede utilizarse cualesquiera tipos de fuente de carbono y de fuente de nitrógeno, siempre que puedan ser utilizados por la cepa que se va a cultivar.

20 Pueden utilizarse azúcares tales como glucosa, glicerina, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, galactosa, hidrolizados de almidón y melazas como fuente de carbono. Además, también pueden utilizarse ácidos orgánicos tales como ácido acético y ácido cítrico, y alcoholes tales como etanol cada uno solo o en combinación con otras fuentes de carbono. Pueden utilizarse amoniaco, sales de amonio tales como sulfato de amonio, carbonato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio y acetato de amonio, sales de ácido nítrico, etc., como fuente de nitrógeno. Pueden utilizarse aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aquellos que contienen sustancias tales como peptona, casaminoácido, extracto de levadura y producto de descomposición de proteína de soja, etc., como oligonutrientes orgánicos. Cuando se utiliza una cepa mutante auxotrófica que requiere un aminoácido o similar para su crecimiento, se prefiere suplementar el nutriente requerido.

30 En particular, cuando se utiliza un medio líquido preparado con el fin de satisfacer unas condiciones para precipitar ácido L-glutámico, la adición de ácido pantoténico al medio proporciona una precipitación más eficaz de ácido L-glutámico (documento WO 2004/111258). Como sales inorgánicas se utilizan sales de ácido fosfórico, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro, sal de manganeso, etc.

35 El cultivo se realiza preferentemente como cultivo aeróbico, mientras que la temperatura de fermentación se controla para que sea del 20 al 45 °C y el pH para que sea de 3 a 9. Cuando el pH se reduce durante el cultivo, puede añadirse carbonato de calcio, o el cultivo se neutraliza con una sustancia alcalina tal como amoniaco gaseoso. El L-aminoácido diana se acumula en el medio de cultivo después de preferentemente 10 a 120 horas de cultivo en las condiciones que se han descrito anteriormente.

40 Además, el cultivo puede realizarse con precipitación de ácido L-glutámico en un medio utilizando, como medio, un medio líquido ajustado para satisfacer las condiciones en la que se precipita ácido L-glutámico. Los ejemplos de las condiciones en las que se precipita ácido L-glutámico incluyen, por ejemplo, pH de 5,0 a 4,0, preferentemente de 4,5 a 4,0, de forma más preferida de 4,3 a 4,0, de forma particularmente preferida de 4,0.

45 Cuando se precipita ácido L-glutámico en el medio, la adición preliminar de cristales de ácido L-glutámico o L-lisina como semillas cristalinas puede proporcionar una cristalización más eficaz (patente europea nº 1 233 069, patente europea abierta a inspección pública nº 1 624 069).

50 La recogida de L-aminoácido a partir del caldo de cultivo después del cultivo puede realizarse mediante un procedimiento de recogida conocido. Por ejemplo, después de retirar las células del medio de cultivo, puede recogerse L-aminoácido concentrando el medio para que cristalice el L-aminoácido, cromatografía de intercambio iónico o similares. Cuando el cultivo se realiza en condiciones en las que se precipita el ácido L-glutámico, el ácido L-glutámico precipitado en el medio puede recogerse mediante centrifugación o filtración. En este caso, el ácido L-glutámico disuelto en el medio puede precipitarse y después separarse junto con el ácido L-glutámico ya precipitado.

Ejemplos

60 A continuación se describirá la presente invención con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos.

Ejemplo de referencia 1: Construcción de cepa de *Pantoea ananatis* resistente a producto génico de Red de λ

65 Para amplificar el operón *kdp* en *Pantoea ananatis*, se construyó una cepa receptora que lleva a cabo el procedimiento denominado "integración controlada por Red" o "integración mediada por Red" (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 97, 6640-6645 (2000)).

En primer lugar se construyó el plásmido cooperador novedoso RSF-Red-TER que expresa los genes *gam*, *bet* y *exo* de λ (en adelante denominados "genes Red de λ ") (Fig. 1). Los detalles del mismo se describen en el Ejemplo de referencia 2.

Este plásmido puede utilizarse en una amplia serie de huéspedes que tengan diferentes orígenes genéticos. Esto es debido a que 1) este plásmido tiene el replicón del plásmido de amplio espectro de huéspedes RSF1010 (Scholz, *et al.*, 1989; Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987), que puede mantenerse de forma estable por muchos tipos de bacterias gram negativas y gram positivas, e incluso células vegetales, 2) los genes Red de λ , los genes *gam*, *bet* y *exo*, están bajo el control del promotor PlacUV5, que es reconocido por las ARN polimerasas de muchos tipos de bacterias (por ejemplo, Brunschwig, E. y Darzins, A., *Gene*, 111, 1, 35-41 (1992); Dehio, M. *et al.*, *Gene*, 215, 2, 223-229 (1998)) y 3) el factor de autorregulación P_{lacUV5}lacI y el terminador de la transcripción no dependiente de ρ (TrrnB) del operón *rrnB* de *Escherichia coli* reducen el nivel de expresión basal de los genes Red de λ (Skorokhodova, A. Yu *et al.*, *Biotekhnologiya* (Rus), 5, 3-21 (2004)). Además, el plásmido RSF-Red-TER contiene el gen de levansucrasa (*sacB*), y utilizando este gen, el plásmido puede recogerse a partir de células en un medio que contiene sacarosa.

En *Escherichia coli*, la frecuencia de integración de un fragmento de ADN generado por PCR junto con la región flanqueante corta proporcionada por el plásmido RSF-Red-TER es tan elevada como la frecuencia que puede obtenerse utilizando el plásmido cooperador pKD46 (Datsenko, K.A., Wanner, B.L., *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 97, 6640-6645 (2000)). Sin embargo, la expresión de los genes Red de λ es tóxica para *Pantoea ananatis*. Las células transformadas con el plásmido cooperador RSF-Red-TER crecen de forma extremadamente lenta en el medio LB que contiene IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido, 1 mM) y un antibiótico apropiado (25 μ g/ml de cloranfenicol o 40 μ g/ml de kanamicina), y la eficacia de la recombinación mediada por Red de λ es extremadamente lenta (10^{-8}), si es que se observa.

Se seleccionó una cepa variante de *Pantoea ananatis* que es resistente a la expresión de los tres genes Red de λ . Para este fin, el plásmido RSF-Red-TER se introdujo en la cepa de *Pantoea ananatis* SC17 (patente US nº 6.596.517) por electroporación. Después de un cultivo de 18 horas, se obtuvieron aproximadamente 10^6 transformantes, y entre estos, 10 clones formaron colonias de gran tamaño y todos los demás formaron colonias extremadamente pequeñas. Después de un cultivo de 18 horas, las colonias grandes tenían un tamaño de aproximadamente 2 mm y las colonias pequeñas tenían un tamaño de aproximadamente 0,2 mm. Mientras que las colonias pequeñas no crecieron más incluso cuando se prolongó el cultivo hasta 24 horas adicionales, las colonias grandes continuaron creciendo. Una de las cepas mutantes de *Pantoea ananatis* y resistente a la expresión de los tres genes Red de λ (*gam*, *bet* y *exo*) se utilizó para los análisis posteriores.

El ADN del plásmido RSF-Red-TER se aisló a partir de un clon de los clones de colonias grandes y de varios clones de colonias pequeñas y se transformó de nuevo en *Escherichia coli* MG1655 para examinar la capacidad del plásmido de sintetizar un producto génico de Red activo. Mediante un experimento de control para la integración dependiente de Red en los transformantes obtenidos, se demostró que solo el plásmido aislado del clon de colonia grande indujo la expresión de los genes de Red de λ requerida por la integración dependiente de Red. Con el fin de investigar si la integración mediada por Red tiene lugar en el clon de colonia grande seleccionado, se realizó una electroporación utilizando un fragmento de ADN lineal producido por PCR. El fragmento se diseñó de forma que tuviera un marcador Km^R y una región flanqueante de 40 pb homóloga al gen *hisD*. Este fragmento se integró en el gen *hisD* de *Pantoea ananatis* en el sitio de reconocimiento *Sma*I. Se utilizaron dos clones de colonia pequeña como control. La secuencia de nucleótidos del gen *hisD* de *Pantoea ananatis* se muestra en la SEC ID nº 14. Para la PCR se utilizaron los oligonucleótidos de las SEC ID nº 15 y nº 16 como cebadores y el plásmido pMW118-(λ att-Km^R- λ att) se utilizó como plantilla. Los dos clones de colonia pequeña que no eran resistentes a los genes Red de λ se utilizaron como control. La construcción del plásmido pMW118-(λ attL-Km^R- λ attR) se explicará en detalle en el Ejemplo de referencia 3.

El plásmido RSF-Red-TER puede inducir la expresión de los genes Red mediante el gen *lacI* portado por el plásmido. Se investigaron dos clases de condiciones de inducción. En el primer grupo se añadió IPTG (1 mM) una hora antes de la electroporación y en el segundo grupo se añadió IPTG al comienzo del cultivo para la preparación de células en las que es posible una electroporación. La velocidad de crecimiento de las células que alojan RSF-Red-TER derivado del clon de colonia grande no fue significativamente inferior a la de una cepa que no tenía el plásmido SC17. La adición de IPTG solo reduce ligeramente la velocidad de crecimiento de estos cultivos. Por otra parte, la progenie de los clones de colonia pequeña creció de forma extremadamente lenta incluso sin la adición de IPTG, y después de la inducción, el crecimiento se detuvo sustancialmente. Después de la electroporación de las células de la progenie del clon de colonia grande, muchos clones Km^R crecieron (18 clones después de un tiempo de inducción corto, y aproximadamente 100 clones después de un tiempo de inducción prolongado). Los 100 clones que se investigaron tenían un fenotipo His⁺ y se confirmó por PCR que aproximadamente 20 clones tenían la estructura esperada de cromosoma en las células. Por otra parte, incluso cuando se realizó una electroporación con la progenie de los clones de colonia pequeña, no se obtuvo una cepa integrada.

El clon de colonia grande obtenido se cultivó en una placa que contenía el 7% de sacarosa para eliminar el plásmido, y se transformó de nuevo con RSF-Red-TER. La cepa sin el plásmido se denominó SC17 (0). Esta cepa se depositó en el Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM, GNIIGenetica (1 Dorozhny proezd., 1 Moscú 117545, Rusia) el 21 de septiembre de 2005, y se le asignó el número de registro VKPM B-9246.

Todos los clones que se cultivaron después de la retransformación mencionada anteriormente mostraron tamaños de colonia grandes al igual que el clon de la cepa progenitora SC17 (0). El experimento de integración mediado por Red se realizó en la cepa SC17(0) retransformada con el plásmido RSF-Red-TER. Tres de los transformantes independientes se investigaron utilizando el mismo fragmento de ADN que se usó para el experimento previo. Se utilizó un tiempo de inducción corto (1 hora antes de la electroporación). Los clones Km^R que superaban diez clones crecieron en cada experimento. Todos los clones examinados tenían el fenotipo His⁻. De este modo, se seleccionó una cepa mutante denominada SC17(0) resistente a la expresión de los genes Red de λ . Esta cepa puede utilizarse como una cepa receptora adecuada para la integración dependiente de Red en el cromosoma de *Pantoea ananatis*.

Ejemplo de Referencia 2: Construcción del plásmido cooperador RSF-Red-TER

El esquema de construcción del plásmido cooperador RSF-Red-TER se muestra en la Fig. 2.

Como primera etapa de la construcción se diseñó un vector RSFsacBPlacMCS. Para este fin se amplificaron por PCR fragmentos de ADN que contenían el gen *cat* del plásmido pACYC184 y la región génica estructural del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* utilizando los oligonucleótidos de las SEC ID nº 17 y nº 18, y nº 19 y nº 20, respectivamente. Estos oligonucleótidos contenían sitios de enzima de restricción *Bgl*II, *Sac*I, *Xba*I y *Bam*HI, requeridos y convenientes para la clonación posterior, en las regiones terminales 5', respectivamente. El fragmento *sacB* de 1,5 kb obtenido se clonó en el vector pMW119-PlacIacl obtenido previamente en el sitio *Xba*I-*Bam*HI. Este vector se construyó del mismo modo que el descrito para el vector pMW118-PlacIacl (Skorokhodova, A. Yu *et al*, Biotekhnologiya (Rus), 5, 3-21 (2004)). No obstante, este vector contenía un resto polienlazador derivado de pMW219 en vez de del plásmido pMW218.

Después, el fragmento *cat* de 1,0 kb mencionado anteriormente se trató con *Bgl*II y *Sac*I, y se clonó en el plásmido RSF-PlacIacIacsacB obtenido en la etapa anterior en el sitio *Bam*HI-*Sac*I. El plásmido obtenido pMW-PlacIacIacsacBcat contenía el fragmento PlacUV5-IacI-sacB-cat. Con el fin de subclonar este fragmento en el vector RSF1010, se digirió pMW-PlacIacIacsacB-cat con *Bgl*II, se hizo romo con el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I y sucesivamente se digirió con *Sac*I. Se eluyó un fragmento *Bgl*II-*Sac*I de 3,8 kb del plásmido pMWP_{IacIacIacsacBcat} a partir de gel de agarosa al 1% y se ligó con el vector RSF1010 que se había tratado con *Pst*I y *Sac*I. Se transformó *Escherichia coli* TG1 con la mezcla de ligadura y se plaqueó en medio LB que contenía cloranfenicol (50 mg/l). Los plásmidos aislados a partir de los clones cultivados se analizaron con enzimas de restricción para obtener el plásmido RSFsacB. Con el fin de construir un vector RSFsacBPlacMCS se amplificó un fragmento de ADN que contenía el promotor PlacUV5 por PCR utilizando oligonucleótidos de las SEC ID nº 21 y nº 22 como cebadores y el plásmido pMW119PlacIacl como plantilla. El fragmento de 146 pb obtenido se digirió con *Sac*I y *Not*I y se ligó con el fragmento grande *Sac*I-*Not*I del plásmido RSFsacB. Después, por PCR, utilizando los nucleótidos de las SEC ID nº 23 y nº 24 como cebadores y el plásmido pKD46 (Datsenko, K.A., Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 6640-6645 (2000)) como plantilla, se amplificó un fragmento de ADN de 2,3 kb que contenía los genes Red $\alpha\beta\gamma$ de λ y el terminador de la transcripción tL3. El fragmento obtenido se clonó en el vector RSFsacBPlacMCS en el sitio PvuI-*Not*I. De este modo se diseñó el plásmido RSFRed.

Con el fin de eliminar la lectura a través de la transcripción de los genes Red, se insertó un terminador de la transcripción dependiente de p del operón *rrnB* de *Escherichia coli* en la posición entre el gen *cat* y el promotor PlacUV5. Con este fin se amplificó un fragmento de ADN que contenía el promotor PlacUV5 y el terminador TrrnB por PCR utilizando los oligonucleótidos de las SEC ID nº 25 y nº 22 como cebadores y el cromosoma de *Escherichia coli* BW3350 como plantilla. Estos fragmentos obtenidos se trataron con *Kpn*I y se ligaron. Después, el fragmento de 0,5 kb que contenía tanto PlacUV5 como TrrnB se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos de las SEC ID nº 22 y nº 26 como cebadores. El fragmento de ADN obtenido se digirió con *Eco*RI, se hizo romo mediante un tratamiento con fragmento Klenow de ADN polimerasa I, se digirió con *Bam*HI y se ligó con el fragmento largo *Ecl*136II-*Bam*HI del vector RSFsacBPlacMCS. El plásmido obtenido se designó RSF-Red-TER.

Ejemplo de Referencia 3: Construcción del plásmido pMW118-(λ attL-Km^r- λ attR)

El plásmido pMW118-(λ attL-Km^r- λ attR) se construyó a partir del plásmido pMW118-attL-Tc-attR (documento WO 2005/010175) reemplazando el gen marcador de resistencia a la tetraciclina por un gen de resistencia a la kanamicina del plásmido pUC4K. Con este fin, el fragmento grande *Eco*RI-*Hind*III del plásmido pMW118-attL-Tc-attR se ligó a dos fragmentos del plásmido pUC4K: el fragmento *Hind*III-*Pst*I (676 pb) y el fragmento *Eco*RI-*Hind*III (585 pb). El pMW118-attL-Tc-attR básico se obtuvo mediante ligadura de los cuatro fragmentos siguientes.

- 5
- 1) El fragmento *BglI-EcoRI* (114 pb) que incluye *attL* (SEC ID nº 29) que se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región correspondiente a *attL* del cromosoma de *Escherichia coli* W3350 (que contiene el profago λ) utilizando los cebadores P1 y P2 (SEC ID nº 27 y nº 28) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiario para *BglI* y *EcoRI*).
- 10
- 2) El fragmento *PstI-HindIII* (182 pb) que incluye *attR* (SEC ID nº 32) que se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región correspondiente a *attR* del cromosoma de *Escherichia coli* W3350 (que contiene el profago λ) utilizando los cebadores P3 y P4 (SEC ID nº 30 y nº 31) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiario para *PstI* y *HindIII*).
- 15
- 3) El fragmento grande *BglI-HindIII* (3916 pb) de pMW118-ter_rrnB. El plásmido pMW118-ter_rrnB se obtuvo mediante ligadura de los tres fragmentos de ADN siguientes:
- El fragmento de ADN grande (2359 pb) que incluye el fragmento *AatII-EcoRI* de pMW118 que se obtuvo mediante digestión de pMW118 con *EcoRI*, tratamiento con fragmento Klenow de ADN polimerasa I y después digestión con *AatII*;
 - El fragmento pequeño *AatII-BglI* (1194 pb) de pUC19 que incluye el gen *bla* para la resistencia a ampicilina (Ap^R), que se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región correspondiente del plásmido pUC19 utilizando los cebadores P5 y P6 (SEC ID nº 33 y nº 34) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiario para *PstI*, *AatII* y *BglI*);
 - El fragmento *BglI-PstI*pol pequeño (363 pb) del terminador de la transcripción *ter_rrnB*, que se obtuvo mediante amplificación por PCR de la región correspondiente del cromosoma de *Escherichia coli* G1655 utilizando los cebadores P7 y P8 (SEC ID nº 35 y nº 36) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiario para *PstI*, *BglI* y *PstI*).
- 20
- 25
- 4) El fragmento *EcoRI-PstI* pequeño (1388 pb) (SEC ID nº 37) de pML-Tc-ter_thrL que incluye el gen de resistencia a la tetraciclina y el terminador de la transcripción *ter_thrL*; el plásmido pML-Tc-ter_thrL se obtuvo mediante las dos etapas siguientes:
- el plásmido pML-ter_thrL se obtuvo mediante digestión del plásmido pML-MCS (Mashko, S.V. *et al.*, Biotekhnologiya (en ruso), 2001, nº 5, 3-20) con *XbaI* y *BamHI*, seguida de la ligadura del fragmento grande (3342 pb) con el fragmento *XbaI-BamHI* (68 pb) que porta el terminador *ter_thrL* obtenido mediante amplificación por PCR de la región correspondiente del cromosoma de *Escherichia coli* MG1655 utilizando los cebadores P9 y P10 (SEC ID nº 38 y nº 39) (estos cebadores contenían los sitios de reconocimiento subsidiario para *PstI*, *XbaI* y *BamHI*);
 - el plásmido pML-Tc-ter_thrL se obtuvo mediante digestión del plásmido pML-ter_thrL con *KpnI* y *XbaI* seguida de tratamiento con fragmento Klenow de ADN polimerasa I y se ligó con el fragmento *EcoRI-Van91I* pequeño (1317 pb) de pBR322 que incluye el gen de resistencia a la tetraciclina (pBR322 se digirió con *EcoRI* y *Van91I* y después se trató con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I).
- 30
- 35
- 40

45 **Ejemplo 1: Adquisición de la cepa sustituida con el promotor del operón *kdp***

(1) Construcción de plásmido productor de ácido glutámico RSFPPG

50 Se construyó un plásmido RSFPPG en el que se amplificaron genes del sistema de biosíntesis de ácido L-glutámico, el gen *prpC* (publicación de patente internacional WO 2006/051660), el gen *ppc* y el gen *gdhA* (documento EP0999282A).

55 El cebador 1 (SEC ID nº 40) y el cebador 2 (SEC ID nº 41) se diseñaron para la amplificación de una porción de RSFPPG (documento EP1 233 068 A) distinta del ORF del gen *gluA*. Utilizando estos cebadores y RSFPPG como plantilla, se realizó una PCR para obtener un fragmento de aproximadamente 14,9 kb. Como para *prpC*, la PCR se realizó utilizando el cebador 3 (SEC ID nº 42) y el cebador 4 (SEC ID nº 43) y el ADN cromosómico de la cepa W3110 de *E. coli* como plantilla para obtener un fragmento de aproximadamente 1,2 kb. Ambos productos de la PCR se trataron con *BglI* y *KpnI*, se ligaron y después se utilizaron para transformar la cepa JM109 de *E. coli*. Se recogieron todas las colonias surgidas y se extrajeron plásmidos de las colonias en forma de mezcla. La cepa ME8330 de *E. coli*, que es una cepa que carece de citrato sintasa (CS), se transformó con la mezcla de plásmidos, y la suspensión celular se aplicó al medio mínimo M9 (que contenía 5 g de glucosa, sulfato de magnesio 2 mM, 3 g de fosfato de monopotasio, 0,5 g de cloruro de sodio, 1 g de cloruro de amonio y 6 g de fosfato de disodio en 1 l de agua pura) que contenía 50 mg/l de uracilo y 5 mg/l de tiamina HCl. A partir de las cepas surgidas se extrajo un plásmido y se denominó RSFPPG. Este plásmido RSFPPG se introdujo en la cepa NP106 de *Pantoea ananatis*, que es una cepa productora de ácido L-glutámico, para construir una cepa productora de ácido L-glutámico, NP106/RSFPPG (esta cepa se denomina "cepa NA1").

60

65

La cepa NP106 se obtuvo del modo siguiente. La cepa AJ13601 de *Pantoea ananatis* descrita anteriormente se cultivó durante la noche a 34 °C en el medio líquido LBGM9 con agitación, y después el medio se diluyó de modo que aparecieran de 100 a 200 colonias por placa y se aplicó a una placa de LBGM9 que contenía 12,5 mg/l de tetraciclina. Las colonias que aparecieron se replicaron en una placa de LBGM9 que contenía 12,5 mg/l de tetraciclina y 25 mg/l de cloranfenicol, y se seleccionó una cepa que era sensible al cloranfenicol para obtener una cepa de la se eliminó pSTVCB, que se denominó G106S. La cepa G106S se cultivó posteriormente durante la noche a 34 °C en el medio líquido LBGM9 con agitación, y el medio se diluyó de modo que aparecieran de 100 a 200 colonias por placa, y se aplicó a una placa con LBGM9 sin fármacos. Las colonias que aparecieron se replicaron en una placa con LBGM9 que contenía 12,5 mg/l de tetraciclina y una placa con LBGM9 sin fármacos, y se seleccionó una cepa que era sensible a la tetraciclina para obtener una cepa de la se eliminó RSFCPG, que se denominó NP106. La NP106 obtenida tal como se ha descrito anteriormente es una cepa que no contiene ninguno de los dos plásmidos RSFCPG y pSTVCB, que los alberga la cepa AJ13601.

(2) Adquisición de una cepa en la que el promotor del operón *kdp* estaba reemplazado por el promotor *tac*

i) Construcción de la cepa de *P. ananatis* SC17(0) en la que la secuencia que comprende λ attL-Km^r- λ attR y el promotor *Ptac* ligado corriente abajo (λ attL-Km^r- λ attR-*Ptac*) se integró corriente arriba del gen *lacZ*.

El promotor *Ptac* se integró en el cromosoma de la cepa de *P. ananatis* SC17(0) en una posición corriente arriba del gen *lacZ*. La estructura de la región cromosómica de *P. ananatis* corriente arriba del gen *LacZ* se muestra en la Fig. 3. Las secuencias de nucleótidos de los genes *yghU*, *scrK* y *lacZ* de *Pantoea ananatis* se muestran en las SEC ID n° 44, n° 45 y n° 46. La secuencia de la región -35 del promotor *Ptac* es ttgaca.

El fragmento del promotor *Ptac* se amplificó por PCR utilizando el cebador 5' 1 (SEC ID n° 47) y el cebador 3' 2 (SEC ID n° 48) que corresponden al promotor *Ptac*, y el plásmido pDR540 (Farmacia, Suecia) como plantilla. Ambos cebadores contenían una secuencia de reconocimiento de *Bgl*II en el extremo 5'. El cebador 2 contenía 46 nucleótidos de la porción terminal 3' de *Ptac*, secuencia SD, y una porción inicial de la región codificante del gen *lacZ*.

Un fragmento de ADN que contenía un gen de resistencia a Km eliminable flanqueando los sitios attL y attR de λ se amplificó también por PCR utilizando pMW118-(λ attL-Km^r- λ attR) como plantilla, y el cebador 3 (SEC ID n° 49) y el cebador 4 (SEC ID n° 50). El fragmento obtenido tenía un sitio de reconocimiento de *Bgl*II para la ligadura con el fragmento del promotor *tac* en un extremo y un sitio correspondiente a una secuencia homóloga al cromosoma de *Pantoea ananatis* y que se localiza corriente arriba del gen *scrK* para la integración en el genoma bacteriano en el otro extremo (Fig. 3). Dos de los fragmentos del producto de PCR se trataron con *Bgl*II y se ligaron in vitro con ADN ligasa de T4.

Se utilizó la mezcla de reacción de ligadura para la integración dependiente de λ en el cromosoma de *Pantoea ananatis*. El plásmido cooperador RSF-Red-TER se utilizó como vehículo de genes Red de fago λ . Con el fin de obtener células electrocompetentes de *Pantoea ananatis*, se transformó la cepa SC17(0) con el plásmido RSF-Red-Ter y se cultivó durante la noche a 34 °C en medio LB que contenía 50 µg/ml de cloranfenicol. Después, el caldo de cultivo se diluyó 100 veces con medio LB reciente que contenía 50 µg/ml de cloranfenicol, y el cultivo de las células se dejó a 34 °C con aireación hasta que la DO₆₀₀ fuera de 0,3. Después, se añadió IPTG 1 mM, y se continuó con el cultivo hasta que la DO₆₀₀ fuera de 0,7. Se lavó una muestra 10 mM 3 veces con un volumen igual de agua desionizada y las células se suspendieron en 40 µl de glicerol frío al 10%. Inmediatamente antes de la electroporación se añadieron de 100 a 200 ng del fragmento de ADN amplificado *in vitro* disueltos en 5 µl de agua desionizada a la suspensión celular. La electroporación se realizó utilizando un aparato de electroporación de bacterias (BioRad, Estados Unidos, Número de catálogo 165-2089, Versión 2-89). Los parámetros del pulso utilizados fueron una intensidad de campo de 20 kV/cm, y un tiempo de pulso de 5 milisegundos.

Después de la electroporación se añadió inmediatamente 1 ml de medio LB suplementado con glucosa (0,5%) a la suspensión celular. Después, las células se dejaron crecer a 34 °C durante 2 horas con aireación, se plaquearon en medio sólido mLb que contenía 40 µg/ml de cloranfenicol y se incubaron durante la noche a 34 °C. El integrante Km^R seleccionado se dispuso en bandas en una placa con medio LB a la que se añadió IPTG (1 mM) y sacarosa (5 g/l), y se cultivó a 34 °C para dejar que se formaran colonias individuales. Con el fin de eliminar el plásmido cooperador RSF-Red-TER del integrante, se aislaron las variantes Km^R y Cm^S.

Las estructuras cromosómicas de las colonias Km^R y Cm^S seleccionadas se confirmaron mediante secuenciación de nucleótidos.

ii) Sustitución del promotor *tac* por el promotor del operón *kdp*

Se sintetizaron dos cebadores de ADN sintéticos mostrados en las SEC ID n° 51 y n° 52 de una forma convencional. El cebador mostrado en la SEC ID n° 51 tenía una estructura tal que una secuencia homóloga a la región corriente arriba del operón *kdp* de *Pantoea ananatis* estaba seguida de una secuencia homóloga al

extremo 5' de λ attL-Km^r- λ attR-Ptac. El cebador de la SEC ID n° 52 tenía una estructura tal que una secuencia complementaria al extremo 5' que contenía el primer codón de inicio del operón *kdp* de *Pantoea ananatis* estaba seguida de una secuencia complementaria al extremo 3' de λ attL-Km^r- λ attR-Ptac. Mediante la realización de una PCR utilizando estos cebadores y el ADN cromosómico de la cepa seleccionada en i) como plantilla, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1,6 kpb de secuencia λ attL-Km^r- λ attR-Ptac que tenía la secuencia homóloga a la región corriente arriba del operón *kdp* en el extremo 5' y la secuencia homóloga al extremo 5' que contiene el primer codón de inicio del operón *kdp* en el extremo 3'.

El fragmento de PCR mencionado anteriormente se purificó y se introdujo en SC17(0)/RSF-Red-TER por electroporación de una forma convencional.

La cepa SC17(0)/RSF-Red-TER a la que se introdujo el fragmento PCR se seleccionó en el medio L (medio que contiene 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar en 1 l de agua purificada, pH 7,0) que contenía 40 mg/l de kanamicina para obtener aproximadamente 20 colonias como transformantes. La inserción del fragmento mencionado anteriormente en la región corriente arriba del operón *kdp* se confirmó por PCR utilizando dos cebadores de ADN sintéticos mostrados en las SEC ID n° 53 y n° 54, y una cepa para la que pudo confirmarse la inserción del fragmento se denominó SC17(0) ::Ptac-kdp. Se extrajo ADN genómico de esta cepa y se utilizó para transformar la cepa NA1/pSTV-yhfK por electroporación. La cepa NA1/pSTV-yhfK se obtuvo a partir de la cepa AJ13601 (remítase a la patente japonesa abierta a inspección pública n° 2001-333769) eliminando dos plásmidos, RSFCPG y pSTVCB, e introduciendo dos plásmidos, el plásmido para la producción de ácido L-glutámico, RSFPPG y pSTV-yhfK (remítase a la patente japonesa abierta a inspección pública n° 2005-278643).

Ambos plásmidos RSFCPG y pSTVCB se divulgan en la patente japonesa abierta a inspección pública n° 2001-333769. El RSFCPG es un plásmido que contiene los genes *gltA*, *ppc* y *gdhA* derivados de *Escherichia coli*. El pSTVCB es un plásmido obtenido mediante inserción del gen *gltA* derivado de *Brevibacterium lactofermentum* en pSTV29 (Takara Shuzo). El pSTV-yhfK es un plásmido obtenido insertando el gen *yhfK* derivado de *Pantoea ananatis* en pSTV29 (Takara Shuzo).

La cepa NA1/pSTV-yhfK en la que se introdujo ADN genómico de SC17(0)::Ptac-kdp se seleccionó en una placa del medio L (medio que contiene 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar en 1 l de agua purificada, pH 7,0) que estaba suplementado con ingredientes de medio mínimo (medio que contiene 0,5 g de glucosa, sulfato de magnesio 2 mM, 3 g de fosfato de monopotasio, 0,5 g de cloruro de sodio, 1 g de cloruro de amonio y 6 g de fosfato de disodio en 1 l de agua purificada), 40 mg/l de kanamicina, 12,5 mg/l de clorhidrato de tetraciclina y 25 mg/l de cloranfenicol. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 20 colonias como transformantes. En todas estas cepas el fragmento de λ attL-Km^r- λ attR-Ptac se insertó corriente arriba del operón *kdp*, y una vez realizada esta operación se seleccionó un clon entre las mismas y se denominó NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK.

(3) Evaluación del cultivo de la cepa sustituida con el promotor del operón *kdp* en tubo de ensayo

Después, con el fin de examinar el efecto de potenciación del operón *kdp* sobre el crecimiento, se realizó un cultivo en tubos de ensayo. La cepa NA1:Ptac-kdp/pSTV-yhfK y la cepa NA1/pSTV-yhfK se utilizaron como control, y el crecimiento de las mismas se examinó en condiciones ácidas.

[Composición del medio para el cultivo en tubo de ensayo]

D-glucosa	0,5%
Na ₂ HPO ₄	6,0 g/l
KH ₂ PO ₄	3,0 g/l
NaCl	0,5 g/l
NH ₄ Cl	1,0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,0 mM
Ácido ε-diaminopimélico	200 mg/l
Clorhidrato de L-lisina	200 mg/l
DL-Metionina	200 mg/l
Ácido L-glutámico	30 g/l
Clorhidrato de tetraciclina	12,5 mg/l
Cloranfenicol	25 mg/l

El medio se ajustó a pH 4,5 o pH 4,9 con amoníaco acuoso y después se filtró.

Las cepas NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK y NA1/pSTV-yhfK se precultivaron cada una en el medio L (medio que contiene 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar en 1 l de agua purificada, pH 7,0) que estaba suplementado con ingredientes de medio mínimo (medio que contiene 0,5 g de glucosa, sulfato de magnesio 2 mM, 3 g de fosfato de monopotasio, 0,5 g de cloruro de sodio, 1 g de cloruro de

5 aluminio y 6 g de fosfato de disodio en 1 l de agua purificada), 12,5 mg/l de clorhidrato de tetraciclina y 25 mg/l de cloranfenicol, y las células correspondientes a 1/8 de la placa se rasparon, se lavaron dos veces con solución salina fisiológica y finalmente se suspendieron en 1 ml de solución salina fisiológica. La suspensión se inoculó en un volumen de 20 µl en 5 ml del medio para cultivo en tubo de ensayo contenido en un tubo de ensayo y se cultivó a 34 °C con agitación. Durante el cultivo se midió la DO (660 nm) cada 30 minutos utilizando un medidor de DO (TN1506 BIO PHOTORECORDER, ADVANTEC). Los resultados se muestran en la figura 4.

10 En comparación con la cepa NA1/pSTV-yhfK como control, la cepa potenciada con *kdp*, cepa NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK, mostró una mejora en el crecimiento en condiciones ácidas de pH 4,5 o pH 4,9. Así, el efecto de potenciación del operón *kdp* para mejorar el crecimiento y la velocidad de producción de ácido L-glutámico se demostró por medio de estos resultados.

(4) Evaluación del cultivo de la cepa sustituida con el promotor del operón *kdp* en un recipiente S-jar

15 Después, con el fin de examinar el efecto de potenciación del operón *kdp* sobre la producción de ácido L-glutámico, el cultivo de producción de ácido L-glutámico se realizó utilizando la cepa NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK y la cepa NA1/pSTV-yhfK.

20 El cultivo se realizó en dos etapas de cultivo de siembra para permitir la formación de células y el cultivo principal para producir ácido L-glutámico.

El cultivo de siembra se realizó con la composición de medio siguiente.

[Composición de medio de cultivo de siembra]

25

Sacarosa	50 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g/l
GD113 (antiespumante)	0,1 ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0 g/l
KH ₂ PO ₄	2,0 g/l
Extracto de levadura	4,0 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/l
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01 g/l
Ácido cítrico	0,02 g/l
Clorhidrato de L-lisina	0,4 g/l
DL-Metionina	0,4 g/l
Ácido ε-diaminopimélico	0,4 g/l
Pantotenato de calcio	18 mg/l
Clorhidrato de tetraciclina	12,5 mg/l
Cloranfenicol	25 mg/l

El medio se esterilizó con vapor a 120 °C durante 20 minutos.

30 Las cepas NA1::Ptac-kdp/pSTV-yhfK y NA1/pSTV-yhfK se precultivaron cada una en el medio L (medio que contiene 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar en 1 l de agua purificada, pH 7,0) que estaba suplementado con ingredientes de medio mínimo (medio que contiene 0,5 g de glucosa, sulfato de magnesio 2 mM, 3 g de fosfato de monopotasio, 0,5 g de cloruro de sodio, 1 g de cloruro de aluminio y 6 g de fosfato de disodio en 1 l de agua purificada), 12,5 mg/l de clorhidrato de tetraciclina y 25 mg/l de cloranfenicol, y las células correspondientes a una placa se inocularon en 300 ml del medio de la composición mencionada anteriormente contenido en un minirrecipiente de 1 l de volumen, y la agitación se controló a 34 °C y pH 6,0 durante aproximadamente 12 horas de forma que se obtuviera una aireación de 1/1 vvm y una concentración de oxígeno del 3% o superior. Durante el cultivo el pH se controló para que fuera el 6,0 con adición de gas amoníaco. El cultivo de siembra se terminó en el momento del agotamiento del sacárido en el medio observado como índice.

40 La composición del medio del cultivo principal se muestra a continuación.

[Composición del medio de cultivo] (Las concentraciones son las de después de inocular el 20% de medio de cultivo de siembra)

45

Sacarosa	100 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g/l
GD113	0,1 ml/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g/l
KH ₂ PO ₄	6,0 g/l
Extracto de levadura	6,0 g/l

FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02 g/l
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,02 g/l
Ácido cítrico	0,02 g/l
Betaina*	2,0 g/l
Clorhidrato de L-lisina	0,8 g/l
DL-Metionina	0,6 g/l
Ácido ε-diaminopimélico	0,6 g/l
Pantotenato de calcio	18 mg/l
Clorhidrato de tetraciclina	25 mg/l
Cloranfenicol	25 mg/l
* N,N,N-trimetilglicina	

Las células obtenidas mediante el cultivo de siembra en un volumen de 60 ml se inocularon en 240 ml de medio que tenía la composición mencionada anteriormente contenido en un minirrecipiente con un volumen de 1 l y se cultivaron a pH 4,7. El cultivo se terminó 16 horas después del comienzo del cultivo principal. La densidad celular y la concentración de ácido L-glutámico en el medio de cultivo se midieron a lo largo del tiempo. La densidad celular se examinó midiendo la turbidez del medio de cultivo diluido 101 veces con agua a 620 nm utilizando un espectrofotómetro (U-2000A, Hitachi). La concentración de ácido L-glutámico se midió para el sobrenadante del cultivo diluido de forma apropiada con agua utilizando un aparato Biotech Analyzer (AS-210, Sakura SI)

Los resultados se muestran en la tabla 1 y en la figura 5. Se observa claramente que el crecimiento, así como la acumulación de ácido L-glutámico y la velocidad de producción de ácido L-glutámico de la cepa potenciada con el operón *kdp*, NA1::Ptac-*kdp*/pSTV-yhfK eran mejores en comparación con la cepa comparativa, cepa NA1/pSTV-yhfK.

Tabla 1

	NA1/pSTVyhfK	NA1 : : Ptac- <i>kdp</i> /pSTV-yhfK
Ácido L-glutámico producido (g/recipiente)	15,8	19,0
Tasa de producción de ácido L-glutámico (g/l/h)	3,30	3,96

Ejemplo 2: Amplificación del operón *kdp* en *Escherichia coli* acumuladora de L-treonina (Ejemplo solo de referencia)

(1) Construcción de plásmido por amplificación del operón *kdp*

Con el fin de introducir el operón *kdp* en una bacteria *Escherichia*, se construye un plásmido para la amplificación del operón *kdp* utilizando un plásmido pMW218 conocido (Takara Shuzo).

El pMW218 se digiere en primer lugar con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI, y la reacción se termina mediante la adición de solución de fenol/cloroformo y mezclándolas. La mezcla de reacción se centrifuga, después se recoge la capa superior y se recogen ADN mediante precipitación en etanol. El operón *kdp* se amplifica por separado por PCR utilizando cromosoma extraído de *Escherichia coli* MG1655 como plantilla y los cebadores de ADN mostrados en las SEC ID nº 55 y nº 56 (desnaturalización a 94 °C durante 10 segundos, hibridación a 60 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 120 segundos). Para la PCR, se utiliza ADN polimerasa Pyrobest (Takara Shuzo). El fragmento del operón *kdp* obtenido se digiere con las enzimas de restricción *Hind*III y *Bam*HI, y la reacción se termina mediante la adición de solución de fenol/cloroformo y mezclándolas.

La digestión de pMW218 y el fragmento de la región del gen *kdpABC* preparado tal como se ha descrito anteriormente se ligan utilizando un kit de ligadura de ADN Ver. 2 (Takara Shuzo). Se transforma *Escherichia coli* (células competentes de *E. coli* JM109, Takara Shuzo) con la solución de ligadura, se aplica a medio agar LB que contiene 50 mg/l de kanamicina, y se incuba durante la noche a 37 °C. Las colonias que aparecen en el medio agar se inoculan en el medio líquido LB que contiene 50 mg/l de kanamicina, y se cultivan a 37 °C durante 8 horas con agitación. El ADN del plásmido se extrae de cada medio de cultivo mediante el procedimiento de alcali-SDS y la estructura del mismo se confirma mediante digestión con enzimas de restricción para obtener pMW218kdp.

(2) Introducción de pMW218kdp en *Escherichia coli* B-3996 acumuladora de treonina y producción de aminoácidos

El pMW218kdp obtenido tal como se ha descrito anteriormente se introduce en la cepa VKPM B-3996 mediante el procedimiento de electroporación (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197 (1997)).

El transformante obtenido (esta cepa se denomina "B-3996/pMW218kdp") y la cepa en la que se introduce pMW218 como control (esta cepa se denomina "B-3996/pMW218") se cultivan del modo siguiente, y se

examinan las concentraciones de treonina en los sobrenadantes de los cultivos.

5 Cada transformante se inocula en 3 ml del medio líquido LB que contiene 50 mg/l de kanamicina y 20 mg/l de estreptomycin, y se cultiva durante la noche a 37 °C en un tubo de ensayo, después se inoculan 200 µl del medio de cultivo en un medio de producción de treonina (20 ml) que contiene 50 mg/l de kanamicina y 20 mg/l de estreptomycin, y el cultivo se realiza a 37 °C durante 24 horas con agitación. Después de completar el cultivo, las células se retiran por centrifugación y se mide la concentración de L-treonina en el sobrenadante del cultivo utilizando un analizador de aminoácidos (L-8500, Hitachi). Puede observarse que la cantidad de acumulación de L-treonina en el medio mejora en la cepa amplificada con el operón *kdp*, B-3996/pMW218kdp, en comparación con la cepa B-3996/pMW218 como control.

[Medio de producción de treonina]

D-glucosa	40 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	16 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/l
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/l
L-Isoleucina	50 mg/l
DL-Metionina	500 mg/l
Carbonato de calcio	0,6 g/l
Estreptomycin	20 mg/l
Kanamicina	50 mg/l

15 El medio se ajusta a pH 7,5 con hidróxido de potasio.

El medio se esteriliza con vapor a 115 °C durante 10 minutos.

Explicación del listado de secuencias

20 SEC ID nº 1: Secuencia de nucleótidos del operón *kdp* de *Escherichia coli* (también se muestran las secuencias de aminoácidos de *kdpA*, *kdpB* y *kdpC*)

kdpF: 457 a 546

25 *kdpA*: 546 a 2219

kdpB: 2242 a 4290

30 *kdpC*: 4299 a 4871

kdpD: 4864 a 7548

35 *kdpE*: 7545 a 8222

SEC ID nº 2: Secuencia de aminoácidos de *KdpA*

SEC ID nº 3: Secuencia de aminoácidos de *KdpB*

40 SEC ID nº 4: Secuencia de aminoácidos de *KdpC*

SEC ID nº 5: Secuencia de aminoácidos de *KdpD*

45 SEC ID nº 6: Secuencia de aminoácidos de *KdpE*

SEC ID nº 5: Secuencia de nucleótidos del operón *KdpD* (también se muestra la secuencia de aminoácidos de SDHC)

50 SEC ID nº 7: Secuencia de nucleótidos del operón *kdp* de *Pantoea ananatis* (también se muestran las secuencias de aminoácidos de *kdpA*, *kdpB*, *kdpC* y *kdpD*)

kdpA: 543 a 2225

55 *kdpB*: 2228 a 4273

ES 2 631 360 T3

kdpC: 4284 a 4853

kdpD: 4867 a 7542

- 5 SEC ID nº 8: Secuencia de aminoácidos de KdpA
SEC ID nº 9: Secuencia de aminoácidos de KdpB
SEC ID nº 10: Secuencia de aminoácidos de KdpC
10 SEC ID nº 11: Secuencia de aminoácidos de KdpD
SEC ID nº 12: Secuencia de nucleótidos del gen *kdpE* de *Pantoea ananatis*
15 SEC ID nº 13: Secuencia de aminoácidos de KdpE
SEC ID nº 14: Secuencia de nucleótidos del gen *hisD* de *Pantoea ananatis*
SEC ID nº 15: Cebador para la amplificación del fragmento para la integración del gen Km^r en el gen *hisD*
20 SEC ID nº 16: Cebador para la amplificación del fragmento para la integración del gen Km^r en el gen *hisD*
SEC ID nº 17: Cebador para la amplificación del gen *cat*
25 SEC ID nº 18: Cebador para la amplificación del gen *cat*
SEC ID nº 19: Cebador para la amplificación del gen *sacB*
SEC ID nº 20: Cebador para la amplificación del gen *sacB*
30 SEC ID nº 21: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el promotor PlacUV5
SEC ID nº 22: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el promotor PlacUV5
35 SEC ID nº 23: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene los genes $Red\alpha\beta\gamma$ de λ y tL3
SEC ID nº 24: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene los genes $Red\alpha\beta\gamma$ de λ y tL3
SEC ID nº 25: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el promotor PlacUV5 y TrnB
40 SEC ID nº 26: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el promotor PlacUV5 y TrnB
45 SEC ID nº 27: Cebador para la amplificación de *attL*
SEC ID nº 28: Cebador para la amplificación de *attL*
SEC ID nº 29: Secuencia de nucleótidos de *attL*
50 SEC ID nº 30: Cebador para la amplificación de *attR*
SEC ID nº 31: Cebador para la amplificación de *attR*
55 SEC ID nº 32: Secuencia de nucleótidos de *attR*
SEC ID nº 33: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el gen *bla*
SEC ID nº 34: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el gen *bla*
60 SEC ID nº 35: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene *ter_rrnB*
SEC ID nº 36: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene *ter_rrnB*
65 SEC ID nº 37: Secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN que contiene el terminador *ter_thrL*

- SEC ID nº 38: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el terminador *ter_thrL*
- SEC ID nº 39: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el terminador *ter_thrL*
- 5 SEC ID nº 40: Cebador para la amplificación de la porción del gen *gltA* distinta del ORF
- SEC ID nº 41: Cebador para la amplificación de la porción del gen *gltA* distinta del ORF
- 10 SEC ID nº 42: Cebador para la amplificación del gen *prpC*
- SEC ID nº 43: Cebador para la amplificación del gen *prpC*
- SEC ID nº 44: Secuencia de nucleótidos del gen *yghU* de *Pantoea ananatis*
- 15 SEC ID nº 45: Secuencia de nucleótidos del gen *scrK* de *Pantoea ananatis*
- SEC ID nº 46: Secuencia de nucleótidos del gen *lacZ* de *Pantoea ananatis*
- 20 SEC ID nº 47: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el promotor Ptac
- SEC ID nº 48: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el promotor Ptac
- SEC ID nº 49: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el gen de resistencia a Km
- 25 SEC ID nº 50: Cebador para la amplificación del fragmento de ADN que contiene el gen de resistencia a Km
- SEC ID nº 51: Cebador para la amplificación de la secuencia corriente arriba del operón *kdp* ligada al promotor tac
- 30 SEC ID nº 52: Cebador para la amplificación de la secuencia corriente arriba del operón *kdp* ligada al promotor tac
- SEC ID nº 53: Cebador para confirmar la estructura corriente arriba del operón *kdp*
- 35 SEC ID nº 54: Cebador para confirmar la estructura corriente arriba del operón *kdp*
- SEC ID nº 55: Cebador para la amplificación del operón *kdp*
- 40 SEC ID nº 56: Cebador para la amplificación del operón *kdp*
- SEC ID nº 57: Secuencia de consenso de las secuencias de aminoácidos KdpA de *Pantoea ananatis* y *Escherichia coli*
- 45 SEC ID nº 58: Secuencia de consenso de las secuencias de aminoácidos KdpB de *Pantoea ananatis* y *Escherichia coli*
- SEC ID nº 59: Secuencia de consenso de las secuencias de aminoácidos KdpC de *Pantoea ananatis* y *Escherichia coli*

50 **Aplicabilidad Industrial**

Utilizando el microorganismo de la presente invención puede producirse eficazmente ácido L-glutámico mediante fermentación. En una forma de realización preferida, el microorganismo de la presente invención muestra tanto una cantidad de producción de ácido L-aminoácido como una velocidad de producción superiores.

55 **Listado de secuencias**

<110> Ajinomoto Co., Inc.

60 <120> Bacteria que produce L-aminoácido y procedimiento para producir L-aminoácido

<130> C874-C7269

<150> JP2007-011392

65 <151> 2007-01-22

ES 2 631 360 T3

<150> JP2007-131763
 <151> 2007-05-17

<160> 59

5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 8501

10

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

15

<222> (546)..(2219)

<220>

<221> CDS

20

<222> (2242)..(4290)

<220>

<221> CDS

<222> (4299)..(4871)

25

<400> 1

```

cgaccagacg cgatgcaggt agctgtaaaa gcgggcgcggt tctttccaga aaagcatgaa      60
aggcagcgcc agaacgcccg ctgcaaccgc ataatgacgg cgtaaaaaga taagccatgc      120
aggatattct ctgtagagtt ccatactttt ctccccctii tgtatctacc cggagaatgg      180
caccggaaaa atgaatttgt ttatctgatg aaaaatgtac cgccttttgt gtaattttac      240
tactcatccg accacttatt ttgtcttatt gatggtttat ttacattcat cctgtaatta      300
agttacacaa aagttaaatt aatactaac attagttaa tcatggcttt tgccattttt      360
atactttttt tacaccccgc ccgcagattt ttgcgaaatc ttgagcca gaattctacc      420
cttccggtat cacttttagg ccactggagg tgcactgtga gtgcaggcgt gataacgggc      480
gtattgctgg tgtttttatt actgggttat ctggtttatg ccctgatcaa tgcggaggcg      540
ttctgatg gctgcg caa ggg ttc tta ctg atc gcc acg ttt tta ctg gtg      590
      Met Ala Ala Gln Gly Phe Leu Leu Ile Ala Thr Phe Leu Leu Val
      1          5          10          15
tta atg gtg ctg gcg cgt cct tta ggc agc ggg ctg gcg cgg ctg att      638
Leu Met Val Leu Ala Arg Pro Leu Gly Ser Gly Leu Ala Arg Leu Ile
      20          25          30
aat gac att cct ctt ccc ggt aca acg ggc gtt gag cgc gta ctt ttt      686
Asn Asp Ile Pro Leu Pro Gly Thr Thr Gly Val Glu Arg Val Leu Phe
      35          40          45
cgc gca ctt ggc gtc tct gac cgt gag atg aac tgg aag caa tat ctt      734
Arg Ala Leu Gly Val Ser Asp Arg Glu Met Asn Trp Lys Gln Tyr Leu
      50          55          60
tgt gcc att ctg ggc ctg aac atg ctg ggg ctg gcg gtg ctg ttt ttt      782
Cys Ala Ile Leu Gly Leu Asn Met Leu Gly Leu Ala Val Leu Phe Phe
      65          70          75
atg ttg ctg ggt cag cac tat ctg ccg ctt aat cca cag cag ttg cca      830
Met Leu Leu Gly Gln His Tyr Leu Pro Leu Asn Pro Gln Gln Leu Pro
      80          85          90          95
ggg ctg tcg tgg gat ctg gcg ctg aat acc gcc gtc agc ttt gtc acc      878
Gly Leu Ser Trp Asp Leu Ala Leu Asn Thr Ala Val Ser Phe Val Thr
      100          105          110
aat acc aac tgg caa tct tat agc ggt gaa acc acg ttg agc tat ttc      926
Asn Thr Asn Trp Gln Ser Tyr Ser Gly Glu Thr Thr Leu Ser Tyr Phe
    
```

ES 2 631 360 T3

agc	cag	atg	gcg	ggc	tta	acg	gtg	caa	aac	ttt	ctt	tct	gcc	gcc	agc	974
Ser	G n	Met	Ala	G y	Leu	Thr	Val	G n	Asn	Phe	Leu	Ser	Ala	Ala	Ser	
			130				135					140				
ggg	att	gcg	gtg	att	ttt	gcc	ctc	atc	cgt	gcg	ttt	acc	cgc	cag	agc	1022
G y	I le	Ala	Val	I le	Phe	Ala	Leu	I le	Arg	Ala	Phe	Thr	Arg	G n	Ser	
			145				150					155				
atg	agc	acg	ctc	ggg	aat	gcc	tgg	gtc	gat	ctg	cta	cgc	atc	acg	tta	1070
Met	Ser	Thr	Leu	G y	Asn	Ala	Trp	Val	Asp	Leu	Leu	Arg	I le	Thr	Leu	
							165					170				175
tgg	gtg	cta	gtc	cct	gtg	gcg	tig	tig	att	gca	ctg	ttt	ttt	att	caa	1118
Trp	Val	Leu	Val	Pro	Val	Ala	Leu	Leu	I le	Ala	Leu	Phe	Phe	I le	G n	
							180					185				190
caa	ggt	gcg	ctg	caa	aac	ttt	ctg	cct	tat	cag	gct	gtg	aat	acc	gtt	1166
G n	G y	Ala	Leu	G n	Asn	Phe	Leu	Pro	Tyr	G n	Ala	Val	Asn	Thr	Val	
			195													
gaa	gga	gcg	caa	cag	ctg	tta	ccc	atg	ggg	cct	gta	gct	tct	cag	gaa	1214
G u	G y	Ala	G n	G n	Leu	Leu	Pro	Met	G y	Pro	Val	Ala	Ser	G n	G u	
							215						220			
gcg	atc	aag	atg	ctc	ggg	act	aac	ggc	ggt	ggc	ttc	ttt	aat	gcc	aac	1262
Ala	I le	Lys	Met	Leu	G y	Thr	Asn	G y	G y	G y	Phe	Phe	Asn	Ala	Asn	
							230					235				
tcg	tcg	cat	ccg	ttt	gaa	aac	cca	acc	gca	ctg	acc	aac	ttc	gtg	cag	1310
Ser	Ser	His	Pro	Phe	G u	Asn	Pro	Thr	Ala	Leu	Thr	Asn	Phe	Val	G n	
																255
							245									255
atg	ctg	gcg	atc	ttc	ttg	atc	cca	acg	gcg	ctg	tgc	ttt	gcc	ttt	ggt	1358
Met	Leu	Ala	I le	Phe	Leu	I le	Pro	Thr	Ala	Leu	Cys	Phe	Ala	Phe	G y	
							260									270
gaa	gtg	atg	ggc	gat	cgc	cgc	cag	ggg	cgc	atg	ttg	ctg	tgg	gcg	atg	1406
G u	Val	Met	G y	Asp	Arg	Arg	G n	G y	Arg	Met	Leu	Leu	Trp	Ala	Met	
							275									
tca	gtg	att	ttt	gtc	atc	tgc	gta	ggc	gtg	gtg	atg	tgg	gca	gaa	gtt	1454
Ser	Val	I le	Phe	Val	I le	Cys	Val	G y	Val	Val	Met	Trp	Ala	G u	Val	
							290									
cag	ggt	aat	cct	cat	ctg	ctg	gca	ctg	ggc	acg	gac	agc	agc	atc	aat	1502
G n	G y	Asn	Pro	His	Leu	Leu	Ala	Leu	G y	Thr	Asp	Ser	Ser	I le	Asn	
							310									
atg	gaa	ggt	aaa	gag	agc	cg	ttc	ggc	gtg	ctg	gtc	agt	agc	ctg	ttt	1550
Met	G u	G y	Lys	G u	Ser	Arg	Phe	G y	Val	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Phe	
																335
							325									335
gcg	gtc	gtg	acg	acg	gcg	gct	tcc	tgt	ggc	gcg	gtg	att	gcg	atg	cat	1598
Ala	Val	Val	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Cys	G y	Ala	Val	I le	Ala	Met	His	
							340									350
gat	tcg	ttt	acc	gct	ctc	ggt	ggc	atg	gtg	ccg	atg	tgg	ctg	atg	caa	1646
Asp	Ser	Phe	Thr	Ala	Leu	G y	G y	Met	Val	Pro	Met	Trp	Leu	Met	G n	
							360									
att	ggt	gaa	gtg	gtg	ttc	ggc	ggt	gtc	ggt	tct	ggt	ctt	tac	ggc	atg	1694
I le	G y	G u	Val	Val	Phe	G y	G y	Val	G y	Ser	G y	Leu	Tyr	G y	Met	
							375									
atg	ctg	ttt	gtc	ctg	ctg	gcg	gtg	ttt	att	gcc	ggg	ctg	atg	att	ggt	1742
Met	Leu	Phe	Val	Leu	Leu	Ala	Val	Phe	I le	Ala	G y	Leu	Met	I le	G y	
							390									
cg	aca	ccg	gaa	tat	ctg	ggt	aaa	aaa	atc	gac	gta	cg	gag	atg	aaa	1790
Arg	Thr	Pro	G u	Tyr	Leu	G y	Lys	Lys	I le	Asp	Val	Arg	G u	Met	Lys	
																415
							405									415
ctg	act	gca	ctg	gca	att	ctg	gtt	acc	ccg	acg	ctg	gtg	ctg	atg	ggc	1838
Leu	Thr	Ala	Leu	Ala	I le	Leu	Val	Thr	Pro	Thr	Leu	Val	Leu	Met	G y	
							420									430
gcg	gcg	ttg	gcg	atg	atg	acc	gac	gcc	gga	cgt	agc	gcc	atg	ctc	aac	1886
Ala	Ala	Leu	Ala	Met	Met	Thr	Asp	Ala	G y	Arg	Ser	Ala	Met	Leu	Asn	
							440									
cct	ggc	ccg	cat	ggt	ttt	agc	gaa	gtg	ctg	tac	gcc	gtg	tca	tcc	gcc	1934
Pro	G y	Pro	His	G y	Phe	Ser	G u	Val	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Ala	
							455									
gct	aac	aac	aac	ggc	agc	gcc	ttt	gcc	gga	tta	agc	gcc	aac	tct	ccg	1982
Ala	Asn	Asn	Asn	G y	Ser	Ala	Phe	Ala	G y	Leu	Ser	Ala	Asn	Ser	Pro	
							470									
ttc	tgg	aac	tgt	tta	ctg	gcg	ttc	tgc	atg	ttt	gtc	ggt	cg	ttc	ggg	2030
Phe	Trp	Asn	Cys	Leu	Leu	Ala	Phe	Cys	Met	Phe	Val	G y	Arg	Phe	G y	

ES 2 631 360 T3

480	gtg	att	atc	ccg	gtg	atg	gca	att	gcc	ggt	tcg	ctg	gtg	agt	aaa	aag	2078
	Val	Ile	Ile	Pro	Val	Met	Ala	Ile	Ala	Gly	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Lys	
					500					505					510		
	agc	caa	gcc	gcc	agc	tcc	ggc	acg	ctg	cca	acg	cac	ggc	ccg	ctg	ttt	2126
	Ser	Gln	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Pro	Thr	His	Gly	Pro	Leu	Phe	
					515				520					525			
	ggt	ggc	ctg	tta	atc	ggc	acc	gtg	ttg	ctg	ggt	ggc	gca	ctg	acc	ttt	2174
	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Gly	Thr	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Thr	Phe	
					530				535					540			
	atc	cct	gcc	ctg	gcg	ctt	ggt	ccg	gtg	gcg	gaa	tat	ctc	tcc	tga		2219
	Ile	Pro	Ala	Leu	Ala	Leu	Gly	Pro	Val	Ala	Glu	Tyr	Leu	Ser			
							550					555					
	tgat	attgag	tgagc	actga	at	atg	agt	cgt	aaa	caa	ctg	gcg	cta	ttc	gaa		2271
						Met	Ser	Arg	Lys	Gln	Leu	Ala	Leu	Phe	Glu		
								560						565			
	cca	aca	ctt	gtc	gtt	cag	gcg	ctg	aaa	gaa	gcg	gtg	aaa	aaa	tta	aac	2319
	Pro	Thr	Leu	Val	Val	Gln	Ala	Leu	Lys	Glu	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Asn	
								575						580			
	ccg	cag	gcg	caa	tgg	cgc	aat	ccg	gtg	atg	ttt	atc	gtc	tgg	atc	ggc	2367
	Pro	Gln	Ala	Gln	Trp	Arg	Asn	Pro	Val	Met	Phe	Ile	Val	Trp	Ile	Gly	
							590							595			
	agt	ctg	ctg	acc	acc	tgt	att	agc	atc	gcg	atg	gca	agc	ggg	gcg	atg	2415
	Ser	Leu	Leu	Thr	Thr	Cys	Ile	Ser	Ile	Ala	Met	Ala	Ser	Gly	Ala	Met	
	600					605					610					615	
	ccc	ggc	aat	gcg	ctg	ttt	agc	gcg	gcc	att	agc	ggt	tgg	ctg	tgg	atc	2463
	Pro	Gly	Asn	Ala	Leu	Phe	Ser	Ala	Ala	Ile	Ser	Gly	Trp	Leu	Trp	Ile	
						620					625				630		
	acc	gta	ctg	ttc	gct	aat	ttc	gcc	gag	gcg	ctg	gca	gaa	ggc	cgc	agt	2511
	Thr	Val	Leu	Phe	Ala	Asn	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Arg	Ser	
									640						645		
	aaa	gcg	cag	gcc	aac	agt	ctg	aaa	ggg	gtg	aaa	aaa	act	gcc	ttt	gcc	2559
	Lys	Ala	Gln	Ala	Asn	Ser	Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Lys	Thr	Ala	Phe	Ala	
									655					660			
	cgc	aag	ctg	cg	gag	ccg	aaa	tat	ggc	gct	gcg	gcg	gac	aaa	gtt	cct	2607
	Arg	Lys	Leu	Arg	Glu	Pro	Lys	Tyr	Gly	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys	Val	Pro	
									670								
	gcc	gac	caa	ctt	cg	aaa	ggc	gat	atc	gta	ctg	gta	gaa	gct	ggc	gat	2655
	Ala	Asp	Gln	Leu	Arg	Lys	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	
																695	
	att	atc	ccc	tgc	gat	gg	gaa	gtt	att	gaa	ggg	ggt	gca	tcg	gtc	gat	2703
	Ile	Ile	Pro	Cys	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Glu	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	
																710	
	gaa	agc	gcc	atc	acc	ggg	gaa	tcg	gca	ccg	gtg	atc	cgt	gaa	tcc	ggc	2751
	Glu	Ser	Ala	Ile	Thr	Gly	Glu	Ser	Ala	Pro	Val	Ile	Arg	Glu	Ser	Gly	
	ggc	gat	ttt	gcc	tcc	gtc	acc	ggc	ggc	acg	cgt	att	ctt	tct	gac	tgg	2799
	Gly	Asp	Phe	Ala	Ser	Val	Thr	Gly	Gly	Thr	Arg	Ile	Leu	Ser	Asp	Trp	
	ctg	gtg	att	gag	tgt	agc	gtt	aac	ccc	ggc	gag	aca	ttt	ctg	gat	cg	2847
	Leu	Val	Ile	Glu	Cys	Ser	Val	Asn	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Leu	Asp	Arg	
	atg	atc	gcg	atg	gtg	gaa	ggc	gca	cag	cga	cg	aaa	acg	ccg	aac	gaa	2895
	Met	Ile	Ala	Met	Val	Glu	Gly	Ala	Gln	Arg	Arg	Lys	Thr	Pro	Asn	Glu	
																775	
	att	gcc	ctg	acc	att	ctg	ctg	att	gcc	ctg	act	atc	gtc	ttt	tta	ctg	2943
	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Val	Phe	Leu	Leu	
	gca	acc	gcc	acg	ctg	tgg	ccg	ttt	tcc	gcg	tgg	ggc	ggt	aat	gca	gtc	2991
	Ala	Thr	Ala	Thr	Leu	Trp	Pro	Phe	Ser	Ala	Trp	Gly	Gly	Asn	Ala	Val	
	agc	gta	acg	gta	ctg	gtg	gcg	ctg	ctg	gtc	tgt	ctg	atc	cca	acc	act	3039
	Ser	Val	Thr	Val	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Pro	Thr	Thr	
	att	ggc	ggc	ctg	tig	tca	gcg	atc	ggc	gtc	gcc	ggg	atg	agc	cg	atg	3087
	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Gly	Val	Ala	Gly	Met	Ser	Arg	Met	
	cta	ggc	gcg	aat	gtg	att	gcc	acc	agc	gga	cgt	gca	gtt	gaa	gcg	gca	3135
	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ile	Ala	Thr	Ser	Gly	Arg	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	

ES 2 631 360 T3

840	ggt gac gtt gac gtt ctg cta ctg gat aaa acc ggc acc atc aca ctg	845	ctg cta ctg gat aaa acc ggc acc atc aca ctg	850	ggt gac gtt gac gtt ctg cta ctg gat aaa acc ggc acc atc aca ctg	855	ggt gac gtt gac gtt ctg cta ctg gat aaa acc ggc acc atc aca ctg	3183
Gly Asp Val Asp Val 860	Leu Leu Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu	Leu Leu Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu	Leu Leu Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu	Leu Leu Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu	Leu Leu Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu	Leu Leu Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu	Leu Leu Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu	
ggt aac cgt cag gcg tcg gag ttt atc ccc gcg cag ggc gtg gat gaa	Asn Arg Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	gag ttt atc ccc gcg cag ggc gtg gat gaa	gag ttt atc ccc gcg cag ggc gtg gat gaa	gag ttt atc ccc gcg cag ggc gtg gat gaa	gag ttt atc ccc gcg cag ggc gtg gat gaa	gag ttt atc ccc gcg cag ggc gtg gat gaa	gag ttt atc ccc gcg cag ggc gtg gat gaa	3231
Gly Asn Arg Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	Gln Ala Ser Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu	
aaa acg ctg gct gac gcc gca caa ctg gct tcg ctg gct gat gaa acg	Lys Thr Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	gca caa ctg gct tcg ctg gct gat gaa acg	gca caa ctg gct tcg ctg gct gat gaa acg	gca caa ctg gct tcg ctg gct gat gaa acg	gca caa ctg gct tcg ctg gct gat gaa acg	gca caa ctg gct tcg ctg gct gat gaa acg	gca caa ctg gct tcg ctg gct gat gaa acg	3279
Lys Thr Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	Leu Ala Asp Ala Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr	
ccg gaa ggc cgc agt att gtg atc ctc gcc aag cag cgt ttt aac ctg	Pro Gu Gu Arg Ser Ile Val Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	gtg atc ctc gcc aag cag cgt ttt aac ctg	gtg atc ctc gcc aag cag cgt ttt aac ctg	gtg atc ctc gcc aag cag cgt ttt aac ctg	gtg atc ctc gcc aag cag cgt ttt aac ctg	gtg atc ctc gcc aag cag cgt ttt aac ctg	gtg atc ctc gcc aag cag cgt ttt aac ctg	3327
Pro Gu Gu Arg Ser Ile Val Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu	
gcg gag cgc gat gtg cag tcg ctc cat gcc acc ttt gta ccg ttt act	Arg Gu Arg Asp Val Gln Ser Leu His Ala Thr Phe Val Pro Phe Thr	cag tcg ctc cat gcc acc ttt gta ccg ttt act	cag tcg ctc cat gcc acc ttt gta ccg ttt act	cag tcg ctc cat gcc acc ttt gta ccg ttt act	cag tcg ctc cat gcc acc ttt gta ccg ttt act	cag tcg ctc cat gcc acc ttt gta ccg ttt act	cag tcg ctc cat gcc acc ttt gta ccg ttt act	3375
Arg Gu Arg Asp Val Gln Ser Leu His Ala Thr Phe Val Pro Phe Thr	Val Pro Phe Thr	Val Pro Phe Thr	Val Pro Phe Thr	Val Pro Phe Thr	Val Pro Phe Thr	Val Pro Phe Thr	Val Pro Phe Thr	
gcg caa agc cgg atg agc ggg atc aac atc gac aac cgc atg atc cgt	Ala Gln Ser Arg Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	atg agc ggg atc aac atc gac aac cgc atg atc cgt	atg agc ggg atc aac atc gac aac cgc atg atc cgt	atg agc ggg atc aac atc gac aac cgc atg atc cgt	atg agc ggg atc aac atc gac aac cgc atg atc cgt	atg agc ggg atc aac atc gac aac cgc atg atc cgt	atg agc ggg atc aac atc gac aac cgc atg atc cgt	3423
Ala Gln Ser Arg Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	Met Ser Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg	
aaa ggt tct gtc gat gcc att cgt cgc cat gtt gag gct aac ggt ggt	Lys Gly Ser Val Asp Ala Ile Arg Arg His Val Gu Ala Asn Gly Gly	gag gct aac ggt ggt	gag gct aac ggt ggt	gag gct aac ggt ggt	gag gct aac ggt ggt	gag gct aac ggt ggt	gag gct aac ggt ggt	3471
Lys Gly Ser Val Asp Ala Ile Arg Arg His Val Gu Ala Asn Gly Gly	Ala Asn Gly Gly	Ala Asn Gly Gly	Ala Asn Gly Gly	Ala Asn Gly Gly	Ala Asn Gly Gly	Ala Asn Gly Gly	Ala Asn Gly Gly	
cac ttc cct acc gat gtt gat caa aaa gtc gat cag gtt gcg cgt cag	His Phe Pro Thr Asp Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	gag gtt gcg cgt cag	gag gtt gcg cgt cag	gag gtt gcg cgt cag	gag gtt gcg cgt cag	gag gtt gcg cgt cag	gag gtt gcg cgt cag	3519
His Phe Pro Thr Asp Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	Val Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln	
gga gcc acg ccg ctg gtg gtg gtg gaa ggt tct cgt gtg ctg ggc gtt	Gly Ala Thr Pro Leu Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	gtg gtg gaa ggt tct cgt gtg ctg ggc gtt	gtg gtg gaa ggt tct cgt gtg ctg ggc gtt	gtg gtg gaa ggt tct cgt gtg ctg ggc gtt	gtg gtg gaa ggt tct cgt gtg ctg ggc gtt	gtg gtg gaa ggt tct cgt gtg ctg ggc gtt	gtg gtg gaa ggt tct cgt gtg ctg ggc gtt	3567
Gly Ala Thr Pro Leu Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	Val Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val	
att gcg ctg aaa gat atc gtc aaa ggc ggt att aaa gag cgc ttc	Ile Ala Leu Lys Asp Ile Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	gtc aaa ggc ggt att aaa gag cgc ttc	gtc aaa ggc ggt att aaa gag cgc ttc	gtc aaa ggc ggt att aaa gag cgc ttc	gtc aaa ggc ggt att aaa gag cgc ttc	gtc aaa ggc ggt att aaa gag cgc ttc	gtc aaa ggc ggt att aaa gag cgc ttc	3612
Ile Ala Leu Lys Asp Ile Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe	
gcc cag ctg cgc aaa atg ggc att aaa acg gtg atg att acc ggc	Ala Gln Leu Arg Lys Met Gly Ile Lys Thr Val Met Ile Thr Gly	gtg atg att acc ggc	gtg atg att acc ggc	gtg atg att acc ggc	gtg atg att acc ggc	gtg atg att acc ggc	gtg atg att acc ggc	3657
Ala Gln Leu Arg Lys Met Gly Ile Lys Thr Val Met Ile Thr Gly	Ile Thr Gly	Ile Thr Gly	Ile Thr Gly	Ile Thr Gly	Ile Thr Gly	Ile Thr Gly	Ile Thr Gly	
gat aac cgt ctg act gcc gaa gcc gcg att gct gcg gaa gcg ggt gtc	Asp Asn Arg Leu Thr Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	gaa gcg ggt gtc	gaa gcg ggt gtc	gaa gcg ggt gtc	gaa gcg ggt gtc	gaa gcg ggt gtc	gaa gcg ggt gtc	3702
Asp Asn Arg Leu Thr Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	Ala Ala Ala Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val	
gat ttt ctc gcc gaa gcc aca ccg gag gcc aag ctg gca ttg	Asp Asp Phe Leu Ala Gu Ala Thr Pro Gu Ala Lys Leu Ala Leu	gca ttg	gca ttg	gca ttg	gca ttg	gca ttg	gca ttg	3747
Asp Asp Phe Leu Ala Gu Ala Thr Pro Gu Ala Lys Leu Ala Leu	Ala Leu	Ala Leu	Ala Leu	Ala Leu	Ala Leu	Ala Leu	Ala Leu	
atc cgt cag tat cag gcg gaa ggt cgt ttg gta gcg atg acc ggc	Ile Arg Gln Tyr Gln Ala Gu Gly Arg Leu Val Ala Met Thr Gly	gta gcg atg acc ggc	gta gcg atg acc ggc	gta gcg atg acc ggc	gta gcg atg acc ggc	gta gcg atg acc ggc	gta gcg atg acc ggc	3792
Ile Arg Gln Tyr Gln Ala Gu Gly Arg Leu Val Ala Met Thr Gly	Met Thr Gly	Met Thr Gly	Met Thr Gly	Met Thr Gly	Met Thr Gly	Met Thr Gly	Met Thr Gly	
gac gcc acc aac gat gct ccg gcg ctg gcg cag gca gat gtc gcg	Asp Gly Thr Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Gln Ala Asp Val Ala	gca gat gtc gcg	gca gat gtc gcg	gca gat gtc gcg	gca gat gtc gcg	gca gat gtc gcg	gca gat gtc gcg	3837
Asp Gly Thr Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Gln Ala Asp Val Ala	Ala Asp Val Ala	Ala Asp Val Ala	Ala Asp Val Ala	Ala Asp Val Ala	Ala Asp Val Ala	Ala Asp Val Ala	Ala Asp Val Ala	
gtg gcg atg aac tcc gcc acc cag gcg gcg aaa gag gcg ggc aat	Val Ala Met Asn Ser Gly Thr Gln Ala Ala Lys Gu Ala Gly Asn	gag gcg ggc aat	gag gcg ggc aat	gag gcg ggc aat	gag gcg ggc aat	gag gcg ggc aat	gag gcg ggc aat	3882
Val Ala Met Asn Ser Gly Thr Gln Ala Ala Lys Gu Ala Gly Asn	Ala Gly Asn	Ala Gly Asn	Ala Gly Asn	Ala Gly Asn	Ala Gly Asn	Ala Gly Asn	Ala Gly Asn	
atg gtc gat ctc gac tct aac ccg acc aag ttg atc gag gtg gtg	Met Val Asp Leu Asp Ser Asn Pro Thr Lys Leu Ile Gu Val Val	gtg gtg	gtg gtg	gtg gtg	gtg gtg	gtg gtg	gtg gtg	3927
Met Val Asp Leu Asp Ser Asn Pro Thr Lys Leu Ile Gu Val Val	Val Val	Val Val	Val Val	Val Val	Val Val	Val Val	Val Val	
cac att ggc aaa cag atg ctg atg acc cgt ggc tcg ctg acc acc	His Ile Gly Lys Gln Met Leu Met Thr Arg Gly Ser Leu Thr Thr	ctg atg acc cgt ggc tcg ctg acc acc	ctg atg acc cgt ggc tcg ctg acc acc	ctg atg acc cgt ggc tcg ctg acc acc	ctg atg acc cgt ggc tcg ctg acc acc	ctg atg acc cgt ggc tcg ctg acc acc	ctg atg acc cgt ggc tcg ctg acc acc	3972
His Ile Gly Lys Gln Met Leu Met Thr Arg Gly Ser Leu Thr Thr	Thr Thr	Thr Thr	Thr Thr	Thr Thr	Thr Thr	Thr Thr	Thr Thr	
ttc agc att gcc aac gat gtg gcg aaa tac ttc gcc att att ccg	Phe Ser Ile Ala Asn Asp Val Ala Lys Tyr Phe Ala Ile Ile Pro	gtg gcg aaa tac ttc gcc att att ccg	gtg gcg aaa tac ttc gcc att att ccg	gtg gcg aaa tac ttc gcc att att ccg	gtg gcg aaa tac ttc gcc att att ccg	gtg gcg aaa tac ttc gcc att att ccg	gtg gcg aaa tac ttc gcc att att ccg	4017
Phe Ser Ile Ala Asn Asp Val Ala Lys Tyr Phe Ala Ile Ile Pro	Ile Ile Pro	Ile Ile Pro	Ile Ile Pro	Ile Ile Pro	Ile Ile Pro	Ile Ile Pro	Ile Ile Pro	
gcg gca ttc gcg gca acg tat ccg cag tta aat gcg ctg aac atc	Ala Ala Phe Ala Ala Thr Tyr Pro Gln Leu Asn Ala Leu Asn Ile	aat gcg ctg aac atc	aat gcg ctg aac atc	aat gcg ctg aac atc	aat gcg ctg aac atc	aat gcg ctg aac atc	aat gcg ctg aac atc	4062
Ala Ala Phe Ala Ala Thr Tyr Pro Gln Leu Asn Ala Leu Asn Ile	Ala Leu Asn Ile	Ala Leu Asn Ile	Ala Leu Asn Ile	Ala Leu Asn Ile	Ala Leu Asn Ile	Ala Leu Asn Ile	Ala Leu Asn Ile	
atg tgc ctg cat tcc gcc gac tcc gca atc ctc agt gcg gtg att	Met Cys Leu His Ser Pro Asp Ser Ala Ile Leu Ser Ala Val Ile	agt gcg gtg att	agt gcg gtg att	agt gcg gtg att	agt gcg gtg att	agt gcg gtg att	agt gcg gtg att	4107
Met Cys Leu His Ser Pro Asp Ser Ala Ile Leu Ser Ala Val Ile	Val Ile	Val Ile	Val Ile	Val Ile	Val Ile	Val Ile	Val Ile	
ttc aac gcc ttg att atc gtc ttt ttg att ccc ctg gcg tta aaa	Phe Asn Ala Leu Ile Ile Val Phe Leu Ile Pro Leu Ala Leu Lys	ctg gcg tta aaa	ctg gcg tta aaa	ctg gcg tta aaa	ctg gcg tta aaa	ctg gcg tta aaa	ctg gcg tta aaa	4152
Phe Asn Ala Leu Ile Ile Val Phe Leu Ile Pro Leu Ala Leu Lys	Leu Lys	Leu Lys	Leu Lys	Leu Lys	Leu Lys	Leu Lys	Leu Lys	
ggc gtg agt tat aaa ccg ctt acc gct tct gcc atg ttg cgc cgt	Gly Val Ser Tyr Lys Pro Leu Thr Ala Ser Ala Met Leu Arg Arg	atg ttg cgc cgt	atg ttg cgc cgt	atg ttg cgc cgt	atg ttg cgc cgt	atg ttg cgc cgt	atg ttg cgc cgt	4197
Gly Val Ser Tyr Lys Pro Leu Thr Ala Ser Ala Met Leu Arg Arg	Arg Arg	Arg Arg	Arg Arg	Arg Arg	Arg Arg	Arg Arg	Arg Arg	

ES 2 631 360 T3

1195 1200 1205
aac tta tgg att tac ggt ctg ggt ggg ctg ctg gtg ccg ttt at c 4242
Asn Leu Trp Ile Tyr Gly Leu Gly Gly Leu Leu Val Pro Phe Ile
1210 1215 1220
ggt atc aaa gtc att gat tta ctg ctg acc gtt tgc ggt ctg gtg 4287
Gly Ile Lys Val Ile Asp Leu Leu Leu Thr Val Cys Gly Leu Val
1225 1230 1235
tga ggtttacc atg agt gga tta cgt ccg gca tta tca aca ttt at c 4334
Met Ser Gly Leu Arg Pro Ala Leu Ser Thr Phe Ile
1240 1245 1250
ttt ctg tta ttg att act ggc ggc gtt tac ccg ctg ctg acc acc 4379
Phe Leu Leu Leu Ile Thr Gly Gly Val Tyr Pro Leu Leu Thr Thr
1255 1260 1265
gta ctg ggg caa tgg tgg ttt ccc tgg cag gcc aat ggt t c g t t g 4424
Val Leu Gly Gn Trp Trp Phe Pro Trp Gn Ala Asn Gly Ser Leu
1270 1275 1280
att cgt gaa ggt gat acg gtg cgc ggt t c g gca tta at c g g g c a g 4469
Ile Arg Gu Gly Asp Thr Val Arg Gly Ser Ala Leu Ile Gly Gn
1285 1290 1295
aat ttt acc ggc aac ggc tat ttt cat ggt cgc ccg t c g gca acg 4514
Asn Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Phe His Gly Arg Pro Ser Ala Thr
1300 1305 1310
gca gaa atg ccc tat aat cca cag gct t c t ggc ggg agc aat ct g 4559
Ala Gu Met Pro Tyr Asn Pro Gn Ala Ser Gly Gly Ser Asn Leu
1315 1320 1325
gcg gt c agt aac cct gag ctg gat aaa ct a at a gcc gca cgc gt t 4604
Ala Val Ser Asn Pro Gu Leu Asp Lys Leu Ile Ala Ala Arg Val
1330 1335 1340
gct gca tta cgg gcc gct aac ccg gat gcc agc gcg agc gtt ccg 4649
Ala Ala Leu Arg Ala Ala Asn Pro Asp Ala Ser Ala Ser Val Pro
1345 1350 1355
ggt gaa ctg gtg acg gca t c g gca agc ggg ctg gac aat at c 4694
Val Gu Leu Val Thr Ala Ser Ala Ser Gly Leu Asp Asn Asn Ile
1360 1365 1370
acc ccg caa cgg gcc ggc tgg caa at c cca cgc gtg gcg aaa gcg 4739
Thr Pro Gn Ala Ala Ala Trp Gn Ile Pro Arg Val Ala Lys Ala
1375 1380 1385
cgt aat ct c agc gtt gaa cag ct c at c caa ctg at c gca aaa t a c 4784
Arg Asn Leu Ser Val Gu Gn Leu Thr Gn Leu Ile Ala Lys Tyr
1390 1395 1400
agc caa caa ccg ctg gtg aaa tat at c ggc cag ccg gtt gt c aac 4829
Ser Gn Gn Pro Leu Val Lys Tyr Ile Gly Gn Pro Val Val Asn
1405 1410 1415
att gtt gaa ct c aat ctg gcg ctg gat aaa ctt gat gaa t a a 4871
Ile Val Gu Leu Asn Leu Ala Leu Asp Lys Leu Asp Gu
1420 1425
cgaaccctta cgt ccgacc ccgat cgt ct gct ggaacaa act gccgcgc cgc at cgggg 4931
gaagct gaaa gtt t t ct t c g gt gcct gt gc aggcgt cggg aagacct ggg cgc at cct ggc 4991
agaagcccag cgact gcggg cgcaaggcct ggat at t gt g gt t ggcgt gg t agaaaccca 5051
cgggcgaaaa gat accgcg ccat gct gga agggct ggct gt t ct gccgt t aaaaagcca 5111
ggcgt accgt gggcgcat a t cagcagtt t gat ct cgat gccgcct cg cccgccgccc 5171
ggcgt gat c tt aat ggacg aact ggcgca cagt aat gcg ccaggtt ccc gt cat cccaa 5231
acgct ggcag gat at cgaag aact gct gga agct ggcat t gat gt t t t ca ct accgt caa 5291
cgt t cagcat ct gaaaagt c t gaat gat gt ggt cagcggc gt caccgaa tt caggt acg 5351
ggaaccctg cccgat cct t t t t cgat gc cgcgacgac gt ggt gct gg t ggact t gcc 5411
cccggacgat ct gcgcccagc ggct gaaaga aggc aaagt c t at at t gccg ggcaggcgga 5471
gcgcgccat t gaacat t t t t t cgcgaaagg t aat ct gat c gccct gcgcg aact ggcact 5531
gcgcct act gccgat cgcg t t gat gagca aat gcgcgcc t ggcgggggc at cct ggcga 5591
agagaaagt g tggcacacgc gcgacgcgat cct t t t at gc at cggccat a acaccggcag 5651
cgaaaaact g gt ccgcgcag cggcgcggct ggct cagcg ct ggg t agcg t ct ggcacgc 5711
gggt at at gt t gaaaccct g cct gcaccg ct t accgaa aaaaaact c gggcaat t ct 5771
cagcgcct t a cgt ct ggcg aggaact ggg cgcggagacg gcaacact t t ct gat ccagc 5831
ggaagagaaa gcggt agt gc gt t at gccg t gaacat aat ct cggcaaga t t at t ct cgg 5891
t cgcggggcc t cgcgcccgt ggt ggcgt cg ggaacgt t t gct gaccgac t ggcgcgat 5951
cgccccgat ct cgat cagg t gct ggt cgc gct t gat gaa ccaccgccc gcacgat t aa 6011
caacgcgccc gat aaccgct c t t t t aaaga caagt ggcgt gt acaaat t c agggat gcgt 6071
gggt t gccgcc gcgt t at gcg ccgt t at cac ct t aat t gcc at gcagt ggc t gat ggcgt t 6131
t gat gccgcc aacct ggt ga t gct gt at ct gct t ggcgt g gt ggt ggt gg cgct at t t t a 6191
t ggacgt gg cct t cagt gg t t gccaccgt cat t aat gt a gt gagt t t c g at ct ct t t t t 6251

ES 2 631 360 T3

t at cgcccc cgcggcacgc t cgccgt ct c t gat gt gcaa t at ct gct ga cct t cgcggt 6311
gat gt t aacc gt cgggct gg t gat cgggaa cct t act gct ggcgt gcgt t at caggcgcg 6371
ggg agcccg t accgcgagc aacgcacacg gcact t at at gaaat gt cga aagct ct ggc 6431
ggg gggccgc agt ccgcagg at at cgct gc caccagcgaa caat t t at t g cct ccact t 6491
t cat gcccgc agt cagggt gt t gt t gcccg t gacaacggg aaat t gcagc cgt t aacaca 6551
t ccgcaagga at gacgccgt gggacgat gc cat cgcgcag t ggagt t t t g at aaaggcct 6611
gcc t cggggc gggggcaccg acacgt t acc cgggt gt accg t accagat t t t gccgct aaa 6671
aagcggcgag aaaacct acg ggct ggt ggt ggt ggagccg gggaat ct gc gccagt t gat 6731
gat ccgggaa cagcagcgcc t gct ggagac gt t t acgct g t t agt cgcca at gccct t ga 6791
gcggt gacg ct aaccgcc gcaagaaca ggcgcggat g gcaagcgaac gt gaacagat 6851
ccgcaacgcc ct gct ggccg cgct t t cgca t gat t t acgc acgccgct t a cggg gct gt t 6911
t ggt caggca gaaat ct t aa cgct cgat ct ggcaagcgaa ggat caccoc acgcccgcca 6971
ggccagcgag at ccgt cagc at gt gct gaa cact acccga ct ggt gaat a at ct act gga 7031
t at gcccgca at t cagt ccg cggct t t aa t t t gaagaaa gagt ggt t aa cgct ggaaga 7091
agt agt cggc agcgcgct gc aaat gct gga accgggt t t a t cgt cgccca t caat ct t t c 7151
t ct gccagaa ccgct gacct t aat ccact t gacgggcca ct ct t t gaac gggg gct gat 7211
t aat ct gct g gagaacgcgg t gaaat at gc gggg cgcag gccgaaat t g gt at cgat gc 7271
ccact t gag ggcgaaaat c t acaact gga t gt ct gggat aacggccccg gt ct t ccgc 7331
aggccaggag cagacgat at t t gat aagt t t gct cgcggg aat aaagagt cggcagt acc 7391
gggggt aggg ct t ggact gg caat t t gt cg ggcgat agt g gat gt acacg ggggcact at 7451
t accgcgt t c aaccgaccgg aaggt ggt gc ct gt t t t cgt gt t acaact t c cccagcaaac 7511
t gccct gaa ct t gaagaat t t cat gagga t at gt gacaa acgt t ct gat t gt t gaagat 7571
gaacaggct a t t cgt cgct t t ct gcgcag gcgct ggagg gcgacgggat gcgct ct t t 7631
gaggccgaaa cgct gcaacg cggct t gct g gaagcggcaa cccgt aagcc agat t t gat t 7691
at t ct cgat c t cggcct gcc cgat ggt gat gggat t gagt t t at ccgca cct gcgccag 7751
t ggagcggg t gccggg gat t gt gct t t cc gcacgcagcg aagagagcga caaaat cgcc 7811
gcgct ggat g cgggagcgg t gat t at ct g agt aagccgt t t ggcat t gg cgaat t gcag 7871
gcccgt ct gc cgt cgcat t acgccgccac t ct gccacca cgcgcgccga t ccgct ggt a 7931
aaat t t t ccg at gt t accgt cgat t t agcc gcccgct ga t t caccgggg t gaggaagag 7991
gt gcat ct ca caccaat t ga gt t ccgct g ct ggcggt gc t gct caacaa t gccgaaaa 8051
gt act cacc accgcagct cct t aaccag cct t gggggc caaacgcgt cgaacacagt t cccgcccgc 8111
cact at t t gc gt at t t at at gggacat ct g cgacaaaaac t ggaacagga t cccgcccgc 8171
ccacgcat t t cat t act ga aaccggt at t ggct at cggg t t at gct t t g aat at t aat t 8231
t t aat acagc ct gcct t t t a t t aat t aaag ccgt aat aat aaat agggct t t t t at ct t a 8291
aacaacacac aaaaat aaca at t caat at t t t at t act t t at t act aat aaaaag ct cat cat t a 8351
aat aat t aa gat t gat cat t t t t at t ga t cacct t cac agt t caaccg t at t t cct gg 8411
at agaat at c t t cacct t ca t t cacat cag gaaaggt aaa t t aat ggaa aat aacagcc 8471
gcact at gcc ccat at aagg cggacaact c 8501

<210> 2
<211> 557
5 <212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 2

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

10

ES 2 631 360 T3

180
 G y A l a L e u G n A s n P h e L e u P r o T y r G n A l a V a l A s n T h r V a l G u
 195
 G y A l a G n G n L e u L e u P r o M e t G y P r o V a l A l a S e r G n G u A l a
 210
 I l e L y s M e t L e u G y T h r A s n G y G y G y P h e P h e A s n A l a A s n S e r
 225
 S e r H i s P r o P h e G u A s n P r o T h r A l a L e u T h r A s n P h e V a l G n M e t
 245
 L e u A l a I l e P h e L e u I l e P r o T h r A l a L e u C y s P h e A l a P h e G y G u
 260
 V a l M e t G y A s p A r g A r g G n G y A r g M e t L e u L e u T r p A l a M e t S e r
 275
 V a l I l e P h e V a l I l e C y s V a l G y V a l V a l M e t T r p A l a G u V a l G n
 290
 G y A s n P r o H i s L e u L e u A l a L e u G y T h r A s p S e r S e r I l e A s n M e t
 305
 G u G y L y s G u S e r A r g P h e G y V a l L e u V a l S e r S e r L e u P h e A l a
 325
 V a l V a l T h r T h r A l a A l a S e r C y s G y A l a V a l I l e A l a M e t H i s A s p
 340
 S e r P h e T h r A l a L e u G y G y M e t V a l P r o M e t T r p L e u M e t G n I l e
 355
 G y G u V a l V a l P h e G y G y V a l G y S e r G y L e u T y r G y M e t M e t
 370
 L e u P h e V a l L e u L e u A l a V a l P h e I l e A l a G y L e u M e t I l e G y A r g
 385
 T h r P r o G u T y r L e u G y L y s L y s I l e A s p V a l A r g G u M e t L y s L e u
 405
 T h r A l a L e u A l a I l e L e u V a l T h r P r o T h r L e u V a l L e u M e t G y A l a
 420
 A l a L e u A l a M e t M e t T h r A s p A l a G y A r g S e r A l a M e t L e u A s n P r o
 435
 G y P r o H i s G y P h e S e r G u V a l L e u T y r A l a V a l S e r S e r A l a A l a
 445
 A s n A s n A s n G y S e r A l a P h e A l a G y L e u S e r A l a A s n S e r P r o P h e
 465
 T r p A s n C y s L e u L e u A l a P h e C y s M e t P h e V a l G y A r g P h e G y V a l
 485
 I l e I l e P r o V a l M e t A l a I l e A l a G y S e r L e u V a l S e r L y s L y s S e r
 500
 G n A l a A l a S e r S e r G y T h r L e u P r o T h r H i s G y P r o L e u P h e V a l
 515
 G y L e u L e u I l e G y T h r V a l L e u L e u V a l G y A l a L e u T h r P h e I l e
 530
 P r o A l a L e u A l a L e u G y P r o V a l A l a G u T y r L e u S e r
 545
 550

<210> 3
 <211> 682
 5 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 3

M e t S e r A r g L y s G n L e u A l a L e u P h e G u P r o T h r L e u V a l V a l G n
 1 5 10 15
 A l a L e u L y s G u A l a V a l L y s L y s L e u A s n P r o G n A l a G n T r p A r g
 20 25 30
 A s n P r o V a l M e t P h e I l e V a l T r p I l e G y S e r L e u L e u T h r T h r C y s
 35 40 45
 I l e S e r I l e A l a M e t A l a S e r G y A l a M e t P r o G y A s n A l a L e u P h e
 50 55 60
 S e r A l a A l a I l e S e r G y T r p L e u T r p I l e T h r V a l L e u P h e A l a A s n
 65 70 75 80
 P h e A l a G u A l a L e u A l a G u G y A r g S e r L y s A l a G n A l a A s n S e r
 85 90 95
 L e u L y s G y V a l L y s L y s T h r A l a P h e A l a A r g L y s L e u A r g G u P r o
 100 105 110

10

ES 2 631 360 T3

Lys Tyr Gly Ala Ala Ala Asp Lys Val Pro Ala Asp Gln Leu Arg Lys
 115 120 125
 Gly Asp Ile Val Leu Val Gly Ala Gly Asp Ile Ile Pro Cys Asp Gly
 130 135 140
 Gu Val Ile Gu Gly Gly Ala Ser Val Asp Gu Ser Ala Ile Thr Gly
 145 150 155 160
 Gu Ser Ala Pro Val Ile Arg Gu Ser Gly Asp Phe Ala Ser Val
 165 170 175
 Thr Gly Gly Thr Arg Ile Leu Ser Asp Trp Leu Val Ile Gu Cys Ser
 180 185 190
 Val Asn Pro Gly Gu Thr Phe Leu Asp Arg Met Ile Ala Met Val Gu
 195 200 205
 Gly Ala Gln Arg Arg Lys Thr Pro Asn Gu Ile Ala Thr Ile Leu
 210 215 220
 Leu Ile Ala Leu Thr Ile Val Phe Leu Leu Ala Thr Ala Thr Leu Trp
 225 230 235 240
 Pro Phe Ser Ala Trp Gly Gly Asn Ala Val Ser Val Thr Val Leu Val
 245 250 255
 Ala Leu Leu Val Cys Leu Ile Pro Thr Thr Ile Gly Gly Leu Ser
 260 265 270
 Ala Ile Gly Val Ala Gly Met Ser Arg Met Leu Gly Ala Asn Val Ile
 275 280 285
 Ala Thr Ser Gly Arg Ala Val Gu Ala Ala Gly Asp Val Asp Val Leu
 290 295 300
 Leu Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu Gly Asn Arg Gln Ala Ser
 305 310 315 320
 Gu Phe Ile Pro Ala Gln Gly Val Asp Gu Lys Thr Leu Ala Asp Ala
 325 330 335
 Ala Gln Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr Pro Gu Gly Arg Ser Ile
 340 345 350
 Val Ile Leu Ala Lys Gln Arg Phe Asn Leu Arg Gu Arg Asp Val Gln
 355 360 365
 Ser Leu His Ala Thr Phe Val Pro Phe Thr Ala Gln Ser Arg Met Ser
 370 375 380
 Gly Ile Asn Ile Asp Asn Arg Met Ile Arg Lys Gly Ser Val Asp Ala
 385 390 395 400
 Ile Arg Arg His Val Gu Ala Asn Gly Gly His Phe Pro Thr Asp Val
 405 410 415
 Asp Gln Lys Val Asp Gln Val Ala Arg Gln Gly Ala Thr Pro Leu Val
 420 425 430
 Val Val Gu Gly Ser Arg Val Leu Gly Val Ile Ala Leu Lys Asp Ile
 435 440 445
 Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe Ala Gln Leu Arg Lys Met Gly
 450 455 460
 Ile Lys Thr Val Met Ile Thr Gly Asp Asn Arg Leu Thr Ala Ala Ala
 465 470 475 480
 Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val Asp Asp Phe Leu Ala Gu Ala Thr Pro
 485 490 495
 Gu Ala Lys Leu Ala Leu Ile Arg Gln Tyr Gln Ala Gu Gly Arg Leu
 500 505 510
 Val Ala Met Thr Gly Asp Gly Thr Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Gln
 515 520 525
 Ala Asp Val Ala Val Ala Met Asn Ser Gly Thr Gln Ala Ala Lys Gu
 530 535 540
 Ala Gly Asn Met Val Asp Leu Asp Ser Asn Pro Thr Lys Leu Ile Gu
 545 550 555 560
 Val Val His Ile Gly Lys Gln Met Leu Met Thr Arg Gly Ser Leu Thr
 565 570 575
 Thr Phe Ser Ile Ala Asn Asp Val Ala Lys Tyr Phe Ala Ile Ile Pro
 580 585 590
 Ala Ala Phe Ala Ala Thr Tyr Pro Gln Leu Asn Ala Leu Asn Ile Met
 595 600 605
 Cys Leu His Ser Pro Asp Ser Ala Ile Leu Ser Ala Val Ile Phe Asn
 610 615 620
 Ala Leu Ile Ile Val Phe Leu Ile Pro Leu Ala Leu Lys Gly Val Ser
 625 630 635 640
 Tyr Lys Pro Leu Thr Ala Ser Ala Met Leu Arg Arg Asn Leu Trp Ile
 645 650 655
 Tyr Gly Leu Gly Gly Leu Leu Val Pro Phe Ile Gly Ile Lys Val Ile
 660 665 670
 Asp Leu Leu Leu Thr Val Cys Gly Leu Val
 675 680

- 5 <210> 4
- <211> 190
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli

- 10 <400> 4

ES 2 631 360 T3

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

<210> 5

5 <211> 894

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 5

10

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

ES 2 631 360 T3

Phe Phe Arg Lys Gly Asn Leu Ile Ala Leu Arg Gu Leu Ala Leu Arg
 210 215 220
 Arg Thr Ala Asp Arg Val Asp Gu Gn Met Arg Ala Trp Arg Gy His
 225 230 235
 Pro Gy Gu Gu Lys Val Trp His Thr Arg Asp Ala Ile Leu Leu Cys
 245 250 255
 Ile Gy His Asn Thr Gy Ser Gu Lys Leu Val Arg Ala Ala Ala Arg
 260 265 270
 Leu Ala Ser Arg Leu Gy Ser Val Trp His Ala Val Tyr Val Gu Thr
 275 280 285
 Pro Ala Leu His Arg Leu Pro Gu Lys Lys Arg Arg Ala Ile Leu Ser
 290 295 300
 Ala Leu Arg Leu Ala Gn Gu Leu Gy Ala Gu Thr Ala Thr Leu Ser
 305 310 315
 Asp Pro Ala Gu Gu Lys Ala Val Val Arg Tyr Ala Arg Gu His Asn
 325 330 335
 Leu Gy Lys Ile Ile Leu Gy Arg Pro Ala Ser Arg Arg Trp Trp Arg
 340 345 350
 Arg Gu Thr Phe Ala Asp Arg Leu Ala Arg Ile Ala Pro Asp Leu Asp
 355 360 365
 Gn Val Leu Val Ala Leu Asp Gu Pro Pro Ala Arg Thr Ile Asn Asn
 370 375 380
 Ala Pro Asp Asn Arg Ser Phe Lys Asp Lys Trp Arg Val Gn Ile Gn
 385 390 395
 Gy Cys Val Val Ala Ala Ala Leu Cys Ala Val Ile Thr Leu Ile Ala
 405 410 415
 Met Gn Trp Leu Met Ala Phe Asp Ala Ala Asn Leu Val Met Leu Tyr
 420 425 430
 Leu Leu Gy Val Val Val Val Ala Phe Tyr Gy Arg Trp Pro Ser
 435 440 445
 Val Val Ala Thr Val Ile Asn Val Val Ser Phe Asp Leu Phe Phe Ile
 450 455 460
 Ala Pro Arg Gy Thr Leu Ala Val Ser Asp Val Gn Tyr Leu Leu Thr
 465 470 475
 Phe Ala Val Met Leu Thr Val Gy Leu Val Ile Gy Asn Leu Thr Ala
 485 490 495
 Gy Val Arg Tyr Gn Ala Arg Val Ala Arg Tyr Arg Gu Gn Arg Thr
 500 505 510
 Arg His Leu Tyr Gu Met Ser Lys Ala Leu Ala Val Gy Arg Ser Pro
 515 520 525
 Gn Asp Ile Ala Ala Thr Ser Gu Gn Phe Ile Ala Ser Thr Phe His
 530 535 540
 Ala Arg Ser Gn Val Leu Leu Pro Asp Asp Asn Gy Lys Leu Gn Pro
 545 550 555
 Leu Thr His Pro Gn Gy Met Thr Pro Trp Asp Asp Ala Ile Ala Gn
 565 570 575
 Trp Ser Phe Asp Lys Gy Leu Pro Ala Gy Ala Gy Thr Asp Thr Leu
 580 585 590
 Pro Gy Val Pro Tyr Gn Ile Leu Pro Leu Lys Ser Gy Gu Lys Thr
 595 600 605
 Tyr Gy Leu Val Val Val Gu Pro Gy Asn Leu Arg Gn Leu Met Ile
 610 615 620
 Pro Gu Gn Gn Arg Leu Leu Gu Thr Phe Thr Leu Leu Val Ala Asn
 625 630 635
 Ala Leu Gu Arg Leu Thr Leu Thr Ala Ser Gu Gu Gn Ala Arg Met
 645 650 655
 Ala Ser Gu Arg Gn Ile Arg Asn Ala Leu Leu Ala Ala Leu Ser
 660 665 670
 His Asp Leu Arg Thr Pro Leu Thr Val Leu Phe Gy Gn Ala Gu Ile
 675 680 685
 Leu Thr Leu Asp Leu Ala Ser Gu Gy Ser Pro His Ala Arg Gn Ala
 690 695 700
 Ser Gu Ile Arg Gn His Val Leu Asn Thr Thr Arg Leu Val Asn Asn
 705 710 715
 Leu Leu Asp Met Ala Arg Ile Gn Ser Gy Gy Phe Asn Leu Lys Lys
 725 730 735
 Gu Trp Leu Thr Leu Gu Gu Val Val Gy Ser Ala Leu Gn Met Leu
 740 745 750
 Gu Pro Gy Leu Ser Ser Pro Ile Asn Leu Ser Leu Pro Gu Pro Leu

ES 2 631 360 T3

Thr 755
 770 Leu Ile His Val Asp Gly Pro Leu Phe Gu Arg Val Leu Ile Asn
 785 Leu Leu Gu Asn Ala Val Lys Tyr Ala Gly Ala Gn Ala Gu Ile Gy
 Ile Asp Ala His Val 805 Gu Gy Gu Asn Leu Gn Leu Asp Val Trp Asp
 Asn Gy Pro Gy Leu Pro Pro Gy Gn Gu Gn Thr Ile Phe Asp Lys
 Phe Ala Arg Gy Asn Lys Gu Ser Ala Val Pro Gy Val Gy Leu Gy
 Leu Ala Ile Cys Arg Ala Ile Val Asp Val His Gy Gy Thr Ile Thr
 Ala Phe Asn Arg Pro Gu Gy Gy Ala Cys Phe Arg Val Thr Leu Pro
 Gn Gn Thr Ala Pro Gu Leu Gu Gu Phe His Gu Asp Met
 885 890

<210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 6

Val Thr Asn Val Leu Ile Val Gu Asp Gu Gn Ala Ile Arg Arg Phe
 1 Leu Arg Thr Ala 5 Leu Gu Gy Asp Gy Met Arg Val Phe Gu Ala Gu
 Thr Leu Gn Arg Gy Leu Leu Gu Ala Ala Thr Arg Lys Pro Asp Leu
 Ile Ile Leu Asp Leu Gy Leu Pro Asp Gy Asp Gy Ile Gu Phe Ile
 Arg Asp Leu Arg Gn Trp Ser Ala Val Pro Val Ile Val Leu Ser Ala
 65 Arg Ser Gu Gu Ser Asp Lys Ile Ala Ala Leu Asp Ala Gy Ala Asp
 Asp Tyr Leu Ser Lys Pro Phe Gy Ile Gy Gu Leu Gn Ala Arg Leu
 Arg Val Ala Leu Arg Arg His Ser Ala Thr Thr Ala Pro Asp Pro Leu
 Val Lys Phe Ser Asp Val Thr Val Asp Leu Ala Ala Arg Val Ile His
 130 Arg Gy Gu Gu Gu Val His Leu Thr Pro Ile Gu Phe Arg Leu Leu
 145 Ala Val Leu Leu Asn Asn Ala Gy Lys Val Leu Thr Gn Arg Gn Leu
 Leu Asn Gn Val Trp Gy Pro Asn Ala Val Gu His Ser His Tyr Leu
 Arg Ile Tyr Met Gy His Leu Arg Gn Lys Leu Gu Gn Asp Pro Ala
 Arg Pro Arg His Phe Ile Thr Gu Thr Gy Ile Gy Tyr Arg Phe Met
 210 215 220

10

<210> 7
 <211> 7620
 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (543)..(2225)

20

<220>
 <221> CDS
 <222> (2228)..(4273)

25

<220>
 <221> CDS
 <222> (4284)..(4853)

<220>

ES 2 631 360 T3

<221> CDS
 <222> (4867)..(7542)

<400> 7

5

```

aggctggacc ccagc caaaa ccctgcaaat gatgttgagc tggccggggc atttgcagac 60
tacctactg cacgctttcg tcagtacgat agggatgtat cccgtcggtt ccctggttcg 120
cctggcgtct ggacgcatig cgctggtggt gaagggcggc gat aagcat t acagcgacc 180
t acggtgcat gtcttctggt cactgcacgc gcagcgggaa at caaacccg aggtgctgga 240
tctggcgac agtttttga ctgacagcat tgtgtgccc gaagat aacg gccgttggga 300
caacgtcgat ctgcgccgaa tctggtt gct ggacgccgcc t gat at tgcg ggtcgttttt 360
at acat tttt t acat ccccg acccgcat t t aaccctttc ttt at gtgcg ccagcgcaag 420
ct act cagca aat ccaat cc tctggaggtt gctgtgagt g caggcgt aat aaccggcat t 480
gtgctggtag tgttgtt gct gggct at ctg at ct at gccc t gtt aaat gc ggaggccttc 540
tg at g cgc gcc aat gcg ttt tta ctg atc gcg gtt tat ctg ctg ttg 587
Met Ala Ala Asn Ala Phe Leu Leu Ile Ala Val Tyr Leu Leu Leu
1 5 10 15
ctg atg gtg atg gcg caa ccg ctg ggg cgt ggg ctg gcc gcg ctg gtt 635
Leu Met Val Met Ala G n Pro Leu Gly Arg Gly Leu Ala Ala Leu Val
20 25 30
gcc gat aaa ccc ctcttt gca cgt gct gaa gcc ctg ctg tgg cgt ttt 683
Ala Asp Lys Pro Leu Phe Ala Arg Ala G u Ala Leu Leu Trp Arg Phe
35 40 45
t cg ggt gta caa gaa ggc ggt atg cgc tgg cag cac tac ctg ctg gca 731
Ser Gly Val G n G u Gly Gly Met Arg Trp G n H i s Tyr Leu Leu Ala
50 55 60
att ttg gtg ttc aac ctg ctt ggc ttc gtg gtg ctg ctg gcc atc cta 779
Ile Leu Val Phe Asn Leu Leu Gly Phe Val Val Leu Leu Ala Ile Leu
65 70 75
atg ttt cag gga gcg ttg ccg ctcaat ccg caa cat ctt ccc gga ctg 827
Met Phe G n Gly Ala Leu Pro Leu Asn Pro G n H i s Leu Pro Gly Leu
80 85 90 95
agc tgg gat ttg gcg ctg aat acc gct atc agt ttt gtc acc aac acc 875
Ser Trp Asp Leu Ala Leu Asn Thr Ala Ile Ser Phe Val Thr Asn Thr
100 105 110
aac tgg cag tct tat gcc ggt gaa agc acc ctg agt tac ttc agc cag 923
Asn Trp G n Ser Tyr Ala Gly G u Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Ser G n
115 120 125
atg gtc ggg ctg acg gtg cag aac ttc gtt tcc gcc gcc acc ggc atc 971
Met Val Gly Leu Thr Val G n Asn Phe Val Ser Ala Ala Thr Gly Ile
130 135 140
gcc gtg gcg ttt gcg ctg att cgc ggt ttt gct aat cgt t cg gtg gca 1019
Ala Val Ala Phe Ala Leu Ile Arg Gly Phe Ala Asn Arg Ser Val Ala
145 150 155
acc ctg ggc aac gcc tgg cgc gat tta acg cgc att aca ctctat gtc 1067
Thr Leu Gly Asn Ala Trp Arg Asp Leu Thr Arg Ile Thr Leu Tyr Val
160 165 170 175
ctg ttg ccg atc agc ctg ctg atg gcg ctg ttt ttt gtc agc cag ggc 1115
Leu Leu Pro Ile Ser Leu Leu Met Ala Leu Phe Phe Val Ser G n Gly
180 185 190
agc atc cag aac ttc ctg ccg tat cac aac gtc acc agc ctg gaa ggt 1163
Ser Ile G n Asn Phe Leu Pro Tyr H i s Asn Val Thr Ser Leu G u Gly
195 200 205
gcg cag caa acg ctg gca atg ggg ccg gtt gcc tct cag gaa gcc atc 1211
Ala G n G n Thr Leu Ala Met Gly Pro Val Ala Ser G n G u Ala Ile
210 215 220
aaa atg ctg ggc acc aac ggc ggc ttt ttc aac gtt aac tct gcg 1259
Lys Met Leu Gly Thr Asn Gly Gly Gly Phe Phe Asn Val Asn Ser Ala
225 230 235
cat ccg ttt gag aac cct acc gcg ctg agc aat ttc gta cag atg ctt 1307
H i s Pro Phe G u Asn Pro Thr Ala Leu Ser Asn Phe Val G n Met Leu
240 245 250 255
agt atc ttc ctg att cct gca gca ctctgc ttt gcc ttt ggc gaa agc 1355
Ser Ile Phe Leu Ile Pro Ala Ala Leu Cys Phe Ala Phe Gly G u Ser

```

ES 2 631 360 T3

gtt	aaa	gat	cgg	cgc	cag	ggc	tca	atg	tig	ctc	tgg	tcc	atg	acg	ttg	1403
Val	Lys	Asp	Arg	Arg	Gln	Gly	Ser	Met	Leu	Leu	Trp	Ser	Met	Thr	Leu	
			275					280					285			
atg	ttt	gtc	gtg	gct	gct	gcg	ctg	gtg	atg	tgg	gct	gaa	cta	cgt	ggc	1451
Met	Phe	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Leu	Val	Met	Trp	Ala	Glu	Leu	Arg	Gly	
		290					295					300				
aac	ccg	cac	ttt	ctg	acg	cta	ggg	gct	gac	agc	gcc	atc	aat	atg	gaa	1499
Asn	Pro	His	Phe	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala	Asp	Ser	Ala	Ile	Asn	Met	Glu	
	305					310					315					
ggc	aaa	gaa	acg	cgc	ttc	ggc	att	ctc	aac	tcc	agc	ctg	ttt	gcg	gtg	1547
Gly	Lys	Glu	Thr	Arg	Phe	Gly	Ile	Leu	Asn	Ser	Ser	Leu	Phe	Ala	Val	
	320				325					330				335		
att	acg	acg	gcg	gcg	tcc	tgc	ggt	gcg	gta	aac	gcg	atg	cat	gac	tcg	1595
Ile	Thr	Thr	Ala	Ala	Ser	Cys	Gly	Ala	Val	Asn	Ala	Met	His	Asp	Ser	
			340					345						350		
ttt	acg	gcg	ctg	ggc	ggt	atg	gtg	ccg	atg	ctg	ctg	atg	caa	ctg	ggc	1643
Phe	Thr	Ala	Leu	Gly	Gly	Met	Val	Pro	Met	Leu	Leu	Met	Gln	Leu	Gly	
			355					360					365			
gag	gtg	gtg	ttt	ggc	ggc	gtg	ggt	gcc	ggt	ctg	tac	ggg	atg	ctg	ctg	1691
Glu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Leu	Tyr	Gly	Met	Leu	Leu	
		370					375					380				
ttt	gtc	tta	ctg	gcg	gtg	ttt	att	gcc	ggg	tig	atg	att	ggc	cgc	aca	1739
Phe	Val	Leu	Leu	Ala	Val	Phe	Ile	Ala	Gly	Leu	Met	Ile	Gly	Arg	Thr	
	385					390					395					
ccg	gaa	ttc	ctc	ggc	aag	aaa	atc	gac	gta	tgg	gaa	atg	aaa	atg	acg	1787
Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Lys	Lys	Ile	Asp	Val	Trp	Glu	Met	Lys	Met	Thr	
	400			405					410					415		
gcc	ctg	gcg	att	ctg	gtc	acg	ccc	gcg	ctg	gtg	tig	atc	ggt	acg	gcg	1835
Ala	Leu	Ala	Ile	Leu	Val	Thr	Pro	Ala	Leu	Val	Leu	Ile	Gly	Thr	Ala	
			420					425					430			
att	gcg	atg	atg	acc	gac	gcc	gga	cgc	gca	ggt	atg	gca	aac	ccc	gga	1883
Ile	Ala	Met	Met	Thr	Asp	Ala	Gly	Arg	Ala	Gly	Met	Ala	Asn	Pro	Gly	
			435					440					445			
acg	cat	ggc	ttt	agt	gaa	gtc	ctg	tat	gcc	ggt	tcg	tcg	gcc	gcc	aat	1931
Thr	His	Gly	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Asn	
		450					455					460				
aac	aat	ggc	agc	gcc	ttt	gcg	ggc	ctg	aac	gcc	aat	acg	ccg	ttc	tgg	1979
Asn	Asn	Gly	Ser	Ala	Phe	Ala	Gly	Leu	Asn	Ala	Asn	Thr	Pro	Phe	Trp	
	465				470					475						
aac	ctg	ctg	ctg	gcg	gtg	tgt	atg	ttc	gta	ggt	cgc	ttc	ggc	atc	att	2027
Asn	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Cys	Met	Phe	Val	Gly	Arg	Phe	Gly	Ile	Ile	
	480			485					490				495			
att	ccg	gtc	atg	gcg	att	gcg	ggg	gca	atg	gcg	gtg	aaa	aaa	gtg	cag	2075
Ile	Pro	Val	Met	Ala	Ile	Ala	Gly	Ala	Met	Ala	Val	Lys	Lys	Val	Gln	
			500					505					510			
ccg	gta	ggt	aac	ggc	acg	ctc	cct	acg	cac	ggt	ccg	ctg	ttt	atc	gca	2123
Pro	Val	Gly	Asn	Gly	Thr	Leu	Pro	Thr	His	Gly	Pro	Leu	Phe	Ile	Ala	
			515					520					525			
ctg	ctg	gtc	ggt	acc	gtc	tig	tig	gtc	ggc	gcg	ctg	acc	ttt	att	cct	2171
Leu	Leu	Val	Gly	Thr	Val	Leu	Leu	Val	Gly	Ala	Leu	Thr	Phe	Ile	Pro	
		530					535					540				
gct	ctg	gcg	ctg	ggt	ccg	gtc	gcc	gag	cac	ctg	caa	ctt	att	cag	gga	2219
Ala	Leu	Ala	Leu	Gly	Pro	Val	Ala	Glu	His	Leu	Gln	Leu	Ile	Gln	Gly	
	545				550						555					
caa	taa	tc	atg	agt	cgt	caa	caa	cag	gtg	ttt	gac	gca	gcg	ctg	tta	2266
Gln			Met	Ser	Arg	Gln	Gln	Gln	Val	Phe	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	
	560					565						570				
cgt	acc	tca	gcg	atc	gat	gcg	gta	aaa	aaa	ctc	gat	cct	cgc	gtg	cag	2314
Arg	Thr	Ser	Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Asp	Pro	Arg	Val	Gln	
	575				580						585					
ttt	cgc	aat	ccg	gtc	atg	ttt	gtg	ggt	tac	ctg	ggc	agt	atc	ctg	acc	2362
Phe	Arg	Asn	Pro	Val	Met	Phe	Val	Val	Tyr		Gly	Ser	Ile	Leu	Thr	
	590				595				600					605		
tcg	att	ctg	gcc	ata	atg	atg	ttt	acc	gga	cac	cag	agc	ggc	agc	gcc	2410
Ser	Ile	Leu	Ala	Ile	Met	Met	Phe	Thr	Gly	His	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	
			610					615					620			
agc	ttt	acc	ggc	gcg	att	gcc	ctg	tgg	tta	tgg	ttc	acc	gtg	ctg	ttt	2458
Ser	Phe	Thr	Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Trp	Leu	Trp	Phe	Thr	Val	Leu	Phe	

ES 2 631 360 T3

gcc Ala	aac Asn	atg Met	625 Ala	gca Ala	gaa Glu	gcc Ala	ctg Leu	gcg Ala	630 Glu	gaa Glu	ggg Gly	cgc Arg	agt Ser	aaa Lys	635 Ala	gcc Ala	cag Gln	gca Ala	2506
aac Asn	agc Ser	ctg Leu	640 Lys	aaa Gly	ggc Val	gtt Val	aaa Lys	aag Lys	acc Thr	agc Ser	ttc Phe	gcc Ala	aaa Lys	aaa Lys	ctg Leu	tcg Ser			2554
gcg Ala	gcg Ala	cac His	tac Tyr	645 Gly	gca Ala	gcg Ala	tgg Trp	cag Gln	cag Gln	gtg Val	gcg Ala	gcc Ala	gat Asp	gcg Ala	ctg Leu	ctg Leu			2602
cgt Arg	aaa Lys	ggg Gly	gat Asp	650 Ala	gcc Val	gtg Leu	ctg Val	gta Val	gag Glu	gcc Ala	ggt Gly	gat Asp	gtg Val	atc Ile	ccc Pro	tgc Cys			2650
gac Asp	ggt Gly	gaa Glu	gtc Val	655 Val	gtg Glu	gaa Gly	ggg Gly	ggc Gly	gca Ala	tgc Ser	gtg Val	gac Asp	gag Glu	agc Ser	gcg Ala	atc Ile			2698
acc Thr	ggt Gly	gaa Glu	tgc Ser	660 Ala	ccg Pro	gtg Val	atc Ile	665 Arg	gaa Glu	tgc Ser	ggc Gly	ggg Gly	gat Asp	ttc Phe	gcc Ala				2746
tgc Ser	gtg Val	acc Thr	665 Gly	ggg Gly	aca Thr	cgc Arg	att Ile	ctg Leu	tct Ser	gac Asp	tgg Trp	ctg Leu	gtc Val	att Ile	acc Thr				2794
tgc Cys	agc Ser	gcc Ala	aac Asn	cca Pro	ggc Gly	gaa Glu	acc Thr	ttc Phe	ctg Leu	gac Asp	cgg Arg	atg Met	atc Ile	gcc Ala	atg Met				2842
gtc Val	gaa Glu	ggc Gly	gca Ala	cag Gln	670 Arg	cgt Arg	aaa Lys	acc Thr	ccg Pro	aat Asn	gag Glu	att Ile	gcc Ala	ctg Leu	acc Thr				2890
att Ile	ctg Leu	ctg Leu	675 Val	gtg Ser	ctc Leu	acc Thr	att Ile	gtg Val	ttt Phe	ctg Leu	tta Leu	gcc Ala	acc Thr	gtc Val	acg Thr				2938
ctg Leu	tgg Trp	cct Pro	680 Phe	tca Ser	gcc Ala	tgg Trp	ggc Gly	ggc Gly	acg Thr	ccg Pro	gtc Val	acc Thr	atc Ile	acc Thr	gta Val				2986
ctg Leu	gtg Val	gcg Ala	ctg Leu	ctg Leu	gta Val	tgc Cys	ctg Leu	atc Ile	ccg Pro	acc Thr	acc Thr	att Ile	ggc Gly	ggt Gly	ctg Leu				3034
ctg Leu	tcc Ser	gct Ala	atc Ile	ggc Gly	gtg Val	gcc Ala	ggg Gly	atg Met	agc Ser	cgg Arg	atg Met	ctg Leu	ggc Gly	gct Ala	aac Asn				3082
gtc Val	att Ile	gcc Ala	acc Thr	685 Ser	agt Gly	cgc Arg	gct Ala	gtt Val	gaa Glu	gct Ala	ggc Ala	gac Gly	gtg Val	gat Asp					3130
gtg Val	ctg Leu	atg Met	ctg Leu	gat Asp	aaa Lys	acc Thr	ggc Gly	acc Thr	atc Ile	acg Thr	ctg Leu	ggt Gly	aac Asn	cgt Arg	cag Gln				3178
gca Ala	acg Thr	cag Gln	690 Phe	tta Leu	ccg Pro	gct Ala	ccc Pro	ggc Gly	gtc Val	acg Thr	gaa Glu	gaa Glu	cag Gln	ctg Leu	gcg Ala				3226
gat Asp	gcg Ala	gcg Gln	cag Gln	ctg Leu	gcg Ala	tcc Ser	ctg Leu	gcg Ala	gat Asp	gaa Glu	acg Thr	ccg Pro	gaa Glu	ggg Gly	cgc Arg				3274
agc Ser	atc Ile	gtg Val	gtg Val	ctg Leu	gcg Ala	aag Lys	caa Lys	ttt Phe	aac Leu	ctg Arg	cgt Arg	gaa Glu	cgt Arg	gac Asp					3322
ctg Leu	agc Ser	agc Ser	atg Met	695 Gly	ggc Ala	agc Ser	ttt Phe	att Ile	ccc Pro	ttc Phe	tgc Ser	gct Ala	caa Gln	acc Thr	cgt Arg				3370
atg Met	agc Ser	ggc Gly	gtc Val	695 Asn	gta Val	cag Gln	gac Asp	cgc Leu	ctg Ile	atc Arg	cgt Lys	aaa Gly	ggt Gly	gcg Ala	gtc Val				3418
gat Asp	gcg Ala	gtg Val	cgc Arg	700 Arg	cat His	att Ile	gaa Glu	gcc Ala	agc Ser	cac His	ggt Gly	gcc Ala	ttt Phe	ccg Pro	gct Ala				3466
gag Glu	gtg Val	aac Asn	gcc Ala	705 Arg	cgt Val	gtt Val	gaa Glu	gag Glu	gtg Val	gcg Ala	cgg Arg	gcc Ala	ggt Gly	ggc Gly	aca Thr	ccg Pro			3514
ctg Leu	gtg Val	gtg Val	gcg Ala	710 Glu	gaa Gly	ggc Ala	aag Lys	gtg Val	ctg Leu	ggc Gly	gtg Val	gtg Val	gcg Ala	cta Leu	aaa Lys				3562

ES 2 631 360 T3

990	gat	atc	gtt	aaa	ggt	ggc	atc	aaa	gaa	cgt	ttt	gcg	gaa	ctg	cgc	3607
	Asp	Ile	Val	Lys	Gly	Gly	Ile	Lys	Glu	Arg	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	
					1010					1015					1020	
	aag	atg	ggc	att	aaa	acc	gtg	atg	atc	acc	ggt	gat	aac	ccg	ctc	3652
	Lys	Met	Gly	Ile	Lys	Thr	Val	Met	Ile	Thr	Gly	Asp	Asn	Pro	Leu	
					1025					1030					1035	
	acc	gcc	gcc	gcc	atc	ggc	gca	gag	gca	ggg	gtg	gat	gac	ttt	ctg	3697
	Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Asp	Phe	Leu	
					1040					1045					1050	
	tca	gaa	gcg	acg	ccg	gaa	gcc	aag	ctg	gca	ctg	att	cg	cag	tat	3742
	Ser	Glu	Ala	Thr	Pro	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Leu	Ile	Arg	Gln	Tyr	
					1055					1060					1065	
	cag	gcg	gag	ggg	cg	tta	gtc	gcg	atg	acc	ggt	gac	ggc	acc	aat	3787
	Gln	Ala	Glu	Gly	Arg	Leu	Val	Ala	Met	Thr	Gly	Asp	Gly	Thr	Asn	
					1070					1075					1080	
	gac	gcg	cca	gcg	ttg	gcc	cag	gcg	gac	gtg	gcg	gtc	gcc	atg	aac	3832
	Asp	Ala	Pro	Ala	Leu	Ala	Gln	Ala	Asp	Val	Ala	Val	Ala	Met	Asn	
					1085					1090					1095	
	tcg	ggt	act	cag	gcg	gcg	aaa	gaa	gcg	ggc	aac	atg	gtc	gat	ctg	3877
	Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Asn	Met	Val	Asp	Leu	
					1100					1105					1110	
	gac	tcg	aac	ccc	acc	aaa	ctg	ctg	gaa	gtg	gtg	cac	att	ggt	aag	3922
	Asp	Ser	Asn	Pro	Thr	Lys	Leu	Leu	Glu	Val	Val	His	Ile	Gly	Lys	
					1115					1120					1125	
	cag	atg	ctg	atg	acg	cg	ggt	tcc	ttg	acc	ttc	agt	atc	gcc	3967	
	Gln	Met	Leu	Met	Thr	Arg	Gly	Ser	Leu	Thr	Thr	Phe	Ser	Ile	Ala	
					1130					1135					1140	
	aat	gac	gtt	gcc	aag	tat	ttc	gcc	atc	atc	ccg	gcc	gcc	ttt	gct	4012
	Asn	Asp	Val	Ala	Lys	Tyr	Phe	Ala	Ile	Ile	Pro	Ala	Ala	Phe	Ala	
					1145					1150					1155	
	gca	acc	tat	cca	cag	tta	aat	atg	ctc	aac	gtg	atg	cag	ctg	cac	4057
	Ala	Thr	Tyr	Pro	Gln	Leu	Asn	Met	Leu	Asn	Val	Met	Gln	Leu	His	
					1160					1165					1170	
	tcg	ccc	gca	tcg	gcc	atc	ctg	tcg	gcc	gtg	att	ttt	aac	gcc	cta	4102
	Ser	Pro	Ala	Ser	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Val	Ile	Phe	Asn	Ala	Leu	
					1175					1180					1185	
	gtg	att	gta	ttc	ctg	atc	cct	ctg	gcg	ctt	aaa	ggt	gtc	agc	tat	4147
	Val	Ile	Val	Phe	Leu	Ile	Pro	Leu	Ala	Leu	Lys	Gly	Val	Ser	Tyr	
					1190					1195					1200	
	cg	ccc	ttg	agt	gcc	gca	tcg	ctg	ttg	cg	ctg	aat	tta	ctg	att	4192
	Arg	Pro	Leu	Ser	Ala	Ala	Ser	Leu	Leu	Arg	Arg	Asn	Leu	Leu	Ile	
					1205					1210					1215	
	tat	ggg	tta	ggt	ggg	ctg	ctg	gtg	ccc	ttt	gtc	ggc	atc	aaa	gcg	4237
	Tyr	Gly	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Val	Pro	Phe	Val	Gly	Ile	Lys	Ala	
					1220					1225					1230	
	att	gat	atg	ttg	ctc	gtg	ctg	tct	ggt	atg	gcc	tga	ggagat	taa	atg	4286
	Ile	Asp	Met	Leu	Leu	Val	Leu	Ser	Gly	Met	Ala				Met	
					1235					1240						
	agt	cag	tta	cg	ccg	gcg	att	ttc	ctg	ctt	ttg	ctg	cta	acg	ggt	4331
	Ser	Gln	Leu	Arg	Pro	Ala	Ile	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Val	
					1245					1250					1255	
	gtg	tgc	ggc	gtc	ggt	tat	cct	ttg	ctt	acc	acg	gga	ctg	tcg	caa	4376
	Val	Cys	Gly	Val	Val	Tyr	Pro	Leu	Leu	Thr	Thr	Gly	Leu	Ser	Gln	
					1260					1265					1270	
	ctg	ctg	ttt	ccc	tgg	cag	gct	aac	ggg	tca	gta	ttg	aat	gtc	gat	4421
	Leu	Leu	Phe	Pro	Trp	Gln	Ala	Asn	Gly	Ser	Val	Leu	Asn	Val	Asp	
					1275					1280					1285	
	ggc	gaa	gaa	cgg	gga	tca	gcg	ctg	att	ggt	cag	aat	ttt	agc	cag	4466
	Gly	Glu	Glu	Arg	Gly	Ser	Ala	Leu	Ile	Gly	Gln	Asn	Phe	Ser	Gln	
					1290					1295					1300	
	ccc	ggt	tat	ttc	tgg	ggg	cg	cct	tct	gca	acc	ggt	gat	aag	cct	4511
	Pro	Gly	Tyr	Phe	Trp	Gly	Arg	Pro	Ser	Ala	Thr	Gly	Asp	Lys	Pro	
					1305					1310					1315	
	tat	aat	cct	ctg	gcc	tcc	agc	ggc	agc	aac	ctg	gcg	gcc	agc	aac	4556
	Tyr	Asn	Pro	Leu	Ala	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Leu	Ala	Ala	Ser	Asn	
					1320					1325					1330	
	ccg	gcg	ctg	gat	aag	gct	gta	gcc	gag	cg	gtg	gcg	gct	ttg	cg	4601
	Pro	Ala	Leu	Asp	Lys	Ala	Val	Ala	Glu	Arg	Val	Ala	Ala	Leu	Arg	

ES 2 631 360 T3

acg	gcg	aat	ccg	cag	gct	aac	ggg	gcg	gt a	ccg	gt c	gag	ct g	gt a	4646
Thr	Al a	Asn	Pro	G n	Al a	Asn	G y	Al a	Val	Pro	Val	G u	Leu	Val	
acc	acc	t cg	gcc	agt	gga	ct g	gac	ccg	gag	at t	t cg	cct	gag	gct	4691
Thr	Thr	Ser	Al a	Ser	G y	Leu	Asp	Pro	G u	l l e	Ser	Pro	G u	Al a	
gcg	ct g	t gg	cag	gca	ccg	cgt	at c	gcg	gcg	gca	cgt	cag	ct g	ccg	4736
Al a	Leu	Tr p	G n	Al a	Pro	Arg	l l e	Al a	Al a	Al a	Arg	G n	Leu	Pro	
ct g	gcg	aaa	gt g	gat	gcc	ct g	gt a	gac	agc	at g	acg	cag	cg c	ccg	4781
Leu	Al a	Lys	Val	Asp	Al a	Leu	Val	Asp	Ser	Met	Thr	G n	Arg	Pro	
ct g	ct g	ccc	t t t	at c	ggc	gaa	ccg	act	gt c	aat	gt g	ct g	cag	ct t	4826
Leu	Leu	Pro	Phe	l l e	G y	G u	Pro	Thr	Val	Asn	Val	Leu	G n	Leu	
aat	ct g	gcg	ct g	aac	gac	ct c	aaa	t aa	ct gt	aag gat	gct	at g	aac	cac	4875
Asn	Leu	Al a	Leu	Asn	Asp	Leu	Lys					Met	Asn	His	
gaa	ccg	ct g	cg c	ccc	gat	ccg	gat	gcg	ct g	ct g	cag	acc	agc	agc	4920
G u	Pro	Leu	Arg	Pro	Asp	Pro	Asp	Al a	Leu	Leu	G n	Thr	Ser	Ser	
gac	agc	cat	cg c	ggc	aaa	ct g	aaa	at c	t at	t t t	ggc	gcc	t gt	gcg	4965
Asp	Ser	His	Arg	G y	Lys	Leu	Lys	l l e	Tyr	Phe	G y	Al a	Cys	Al a	
ggc	gt a	gga	aaa	acc	t at	gcc	at g	t t g	cag	gag	gcg	cag	cg g	ct g	5010
G y	Val	G y	Lys	Thr	Tyr	Al a	Met	Leu	G n	G u	Al a	G n	Arg	Leu	
cgt	gcc	cag	ggg	ct g	gat	gt g	ct g	gt g	ggc	gt a	gt g	gaa	acg	cac	5055
Arg	Al a	G n	G y	Leu	Asp	Val	Leu	Val	G y	Val	Val	G u	Thr	His	
gaa	cgt	ccg	gaa	aca	cg c	cag	ct t	ct t	aac	gga	ct g	gt g	ct g	t t g	5100
G u	Arg	Pro	G u	Thr	Al a	G n	Leu	Leu	Asn	G y	Leu	Val	Leu	Leu	
ccg	cg c	cg g	cg c	acg	ggc	cgt	t cg	cg g	cat	cg c	gag	t t c	gac	ct t	5145
Pro	Arg	Arg	Al a	Thr	G y	Arg	Ser	Arg	His	Al a	G u	Phe	Asp	Leu	
gat	gcc	cg c	ct g	cg c	cg c	cat	ccg	gca	gt a	at t	t t g	at g	gat	gag	5190
Asp	Al a	Al a	Leu	Al a	Arg	His	Pro	Al a	Val	l l e	Leu	Met	Asp	G u	
ct g	gcg	cac	acg	aac	gt g	aag	ggc	t ca	cgt	cat	ccc	aaa	cg c	t gg	5235
Leu	Al a	His	Thr	Asn	Val	Lys	G y	Ser	Arg	His	Pro	Lys	Arg	Tr p	
cag	gat	at t	gag	gaa	ct g	ct g	gag	gcg	ggc	at t	gat	gt c	ct g	acg	5280
G n	Asp	l l e	G u	G u	Leu	Leu	G u	Al a	G y	l l e	Asp	Val	Leu	Thr	
aca	gt g	aat	gt t	cag	cat	ct g	gaa	agt	ct g	aat	gat	gt g	gt c	ggt	5325
Thr	Val	Asn	Val	G n	His	ct g	G u	Ser	Leu	Asn	Asp	Val	Val	G y	
ggc	gt c	acc	ggc	at t	cag	gt g	cgt	gaa	acc	gt t	ccc	gat	ccc	t t t	5370
G y	Val	Thr	G y	l l e	G n	Val	Arg	G u	Thr	Val	Pro	Asp	Pro	Phe	
t t c	gac	gct	gcc	gat	gaa	gt g	gt a	ct g	gt t	gat	ct c	ccg	cct	gac	5415
Phe	Asp	Al a	Al a	Asp	G u	Val	Val	Leu	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asp	
gat	ct c	cg c	cag	cg c	ct g	aaa	gag	ggc	aag	gt c	t ac	at t	ggc	gat	5460
Asp	Leu	Arg	G n	Arg	Leu	Lys	G u	G y	Lys	Val	Tyr	l l e	G y	Asp	
cgt	gcc	gaa	cg c	gcc	at c	gaa	aat	t t c	t t t	cgt	aag	ggc	aac	ct g	5505
Arg	Al a	G u	Arg	Al a	l l e	G u	Asn	Phe	Phe	Arg	Lys	G y	Asn	Leu	
t at	gcc	ct g	cgt	gag	ct g	cg c	ct g	cg c	cg c	act	gcc	gac	cg g	gt c	5550
Tyr	Al a	Leu	Arg	G u	Leu	Al a	Leu	Arg	Arg	Thr	Al a	Asp	Arg	Val	
gat	gac	cag	at g	cg c	gcc	t gg	cg c	gac	agt	caa	ggc	cg c	gat	cg g	5595
Asp	Asp	G n	Met	Arg	Al a	Tr p	Arg	Asp	Ser	G n	G y	Arg	Asp	Arg	
gt c	t gg	cac	acg	cgt	gat	gcc	at t	t t a	t t g	t gt	at t	ggg	gac	gat	5640
Val	Tr p	His	Thr	Arg	Asp	Al a	l l e	Leu	Leu	Cys	l l e	G y	Asp	Asp	

ES 2 631 360 T3

1675	acc Thr	ggc Gly	agt Ser	gaa Glu	aaa Lys	ctg Leu	1680	gtg Val	cgg Arg	acg Thr	gcg Ala	gcg Ala	1685	cgg Arg	ctg Leu	gcc Ala	gcc Ala	5685
1690	agg Arg	ctg Leu	ggc Gly	agc Ser	gaa Glu	tgg Trp	1695	cat His	gcc Ala	gtt Val	tac Tyr	gtg Val	1700	gaa Glu	acg Thr	ccc Pro	cgg Arg	5730
1705	ctt Leu	aac Asn	cgg Arg	cta Leu	ccg Pro	gaa Glu	1710	gcg Ala	cgg Arg	cgt Arg	cgg Arg	gcc Ala	1715	att Ile	tta Leu	cgc Arg	acg Thr	5775
1720	ctg Leu	aag Lys	ctg Leu	gcg Ala	cag Glu	gat Asp	1725	atg Met	ggg Gly	gcg Ala	gag Glu	acg Thr	1730	gcg Ala	acg Thr	ctg Leu	tcc Ser	5820
1735	gac Asp	cct Pro	gat Asp	gag Glu	gcg Ala	cag Glu	1740	gcg Ala	gtc Val	ctg Leu	cgt Arg	tac Tyr	1745	gcg Ala	cgg Arg	gaa Glu	cat His	5865
1750	aat Asn	ctg Leu	ggt Gly	aag Lys	att Ile	gtg Val	1755	aca Thr	ggc Gly	cga Arg	cgc Arg	ccg Pro	1760	gcg Ala	cgc Arg	cgc Arg	tgg Trp	5910
1765	cgg Arg	cgt Arg	gac Asp	agc Ser	ttt Phe	gcc Ala	1770	gag Glu	cgg Arg	ctg Leu	ggg Gly	cag Glu	1775	tig Leu	ggt Gly	ccc Pro	gat Asp	5955
1780	ctg Leu	gat Asp	ctg Leu	tig Leu	gtc Val	gtg Val	1785	gcg Ala	ctc Leu	aat Asn	gag Glu	cct Pro	1790	atc Ile	cag Glu	gat Asp	gcg Ala	6000
1795	ccc Pro	cat His	ccg Pro	tta Leu	gcc Ala	gag Glu	1800	gat Asp	cgg Arg	gtt Val	aac Asn	agc Ser	1805	gac Asp	aaa Lys	tgg Trp	cgg Arg	6045
1810	ctg Leu	cag Glu	ctg Leu	cgc Arg	ggc Gly	gtc Val	1815	atg Leu	gtg Met	gcg Ala	ctg Leu	gtg Val	1820	ctg Leu	tgt Cys	att Ile	gtg Val	6090
1825	gtc Val	acc Thr	gcc Ala	gca Ala	ggg Gly	cag Glu	1830	ttc Ser	gtg Val	ctg Leu	atc Ile	agc Ser	1835	ttc Phe	gat Asp	ccg Pro	gcc Ala	6135
1840	aac Asn	tgt Cys	gtg Val	atg Met	atc Ile	tat Tyr	1845	tta Leu	ctg Leu	gcg Ala	gtg Val	gtg Val	1850	atc Ile	gtc Val	cgc Ala	tig Leu	6180
1855	cgc Arg	tat Tyr	gga Gly	cga Arg	tgg Trp	ccc Pro	1860	tcc Ser	gtt Val	atc Ile	gcc Ala	acc Thr	1865	gtc Val	atg Met	aac Asn	atc Ile	6225
1870	att Ile	gcc Ala	ttt Phe	gac Asp	ctg Leu	ttt Phe	1875	ttc Phe	gtc Val	gca Ala	cct Pro	acc Thr	1880	ggc Gly	acg Thr	gtc Val	gcg Ala	6270
1885	gtc Val	tcg Ser	gat Asp	tig Leu	caa Glu	tac Tyr	1890	ctg Leu	gtg Val	acc Thr	ttt Phe	ggg Gly	1895	gtg Val	atg Met	ctg Leu	gcg Ala	6315
1900	gtc Val	ggg Gly	gtc Val	att Ile	gtt Val	ggc Gly	1905	aac Asn	ctg Leu	acg Thr	gcc Ala	ggc Gly	1910	gtt Val	cgc Arg	tac Tyr	cag Glu	6360
1915	gcg Ala	cgg Arg	gtt Val	gcc Ala	cgc Arg	tac Tyr	1920	cgg Arg	gag Glu	cag Glu	cgc Arg	acg Thr	1925	cgg Arg	cag Glu	ctt Leu	tac Tyr	6405
1930	gaa Glu	atg Met	gcc Ala	aag Lys	tcg Ser	ctg Leu	1935	gga Gly	agc Ser	ggc Gly	ctg Leu	acg Thr	1940	cct Pro	gaa Glu	gat Asp	atc Ile	6450
1945	gcc Ala	gcg Thr	acc Ser	agc Glu	cag Arg	cgg Arg	1950	gtg Val	tig Leu	gag Glu	gcg Ala	acc Thr	1955	tta Leu	cag Glu	cgc Ala	cga Arg	6495
1960	tgc Cys	ctg Leu	ctg Leu	ctg Leu	cta Leu	ccc Pro	1965	gat Asp	gag Glu	cag Glu	ggc Gly	gaa Glu	1970	ctg Leu	cac His	acg Thr	ctg Leu	6540
1975	ggc Gly	aac Asn	cgc Ala	ctg Leu	ccg Pro	ggc Gly	1980	aac Asn	gaa Glu	ccg Pro	gat Asp	tgg Trp	1985	gct Ala	atc Ile	cgc Ala	aaa Lys	6585
1990	tgg Trp	agc Ser	ttc Phe	agc Ser	aag Lys	ggc Gly	1995	cag Glu	cca Pro	gca Ala	ggc Gly	gca Ala	2000	ggc Gly	acg Thr	gac Asp	acc Thr	6630
2005	tta Leu	ccg Pro	gcg Ala	gtg Val	ccc Pro	tat Tyr	2010	cag Glu	att Ile	ctg Leu	ccg Pro	ctg Leu	2015	aaa Lys	gtg Val	ggc Gly	gat Asp	6675

ES 2 631 360 T3

2020	ctg tgt cgc gga ttg ctg	2025	gtt gaa ccg cag	2030	aat gtg cgt cag	6720
Leu Cys	Arg Gly Leu Leu	Val Val	G u Pro G n	Asn Val	Arg G n	
2035	ctg atg gtg ccg gaa cag	2040	caa cgg ctg ctg gaa	2045	acc ttc acc gtg	6765
Leu Met	Val Pro G u G n	G n Arg	Leu Leu G u	Thr Phe	Thr Val	
2050	ctg att gcc aat gcc ctg	2055	gag cgg atg gcg ctg	2060	tcc cag agt gag	6810
Leu lle	Ala Asn Ala Leu	G u Arg	Met Ala Leu	Ser G n	Ser G u	
2065	gcg gct tcc cgg ctg tca	2070	gct gaa cgt gag cag	2075	ctg cgt aat gct	6855
Ala Ala	Ser Arg Leu Ser	Ala G u	Ala Arg G u	G n Leu	Arg Asn Ala	
2080	ttg ctg tcc cgc ctg tcc	2085	cat gaa cgt gag cag	2090	ctg cgt aat gct	6900
Leu Leu	Ser Ala Leu Ser	His Asp	Leu Arg Thr	Pro Leu	Thr Val	
2095	ctg ttt ggt cag gca gaa	2100	atg ctg atg ctg gac	2105	ctg gcc agc gat	6945
Leu Phe	Gly G n Ala G u	Met Leu	Met Leu Asp	Leu Ala	Ser Asp	
2110	aac tca aag tat gtg ccc	2115	cag gcc agc cag att	2120	cgt gaa caa acc	6990
Asn Ser	Lys Tyr Val Pro	G n Ala	Ser G n lle	Arg G u	G n Thr	
2125	ctg agt acc att cgt ctg	2130	gtc agc aac atg ctg	2135	gat atg gcg cgt	7035
Leu Ser	Thr lle Arg Leu	Val Ser	Asn Met Leu	Asp Met	Ala Arg	
2140	att cag tca ggc ggc ctg	2145	aat tta cgc gaa gag	2150	tgg ctg gcg ctg	7080
lle G n	Ser Gly Gly Leu	Asn Leu	Arg G u G u	Trp Leu	Ala Leu	
2155	gaa gag gtg att ggt ggc	2160	gcg ctg agt agc atg	2165	gcg ccg tcc ctg	7125
G u G u	Val lle Gly Gly	Ala Leu	Ser Ser Met	Ala Pro	Ser Leu	
2170	aag gga aga gag gtc gaa	2175	ctc gat ctg cct gaa	2180	gat att gtc ctg	7170
Lys Gly	Arg G u Val G u	Leu Asp	Leu Pro G u	Asp lle	Val Leu	
2185	atc aaa ggc gac agt acg	2190	ttg ctg gag cgg gta	2195	ttt acc aac ctg	7215
lle Lys	Gly Asp Ser Thr	Leu Leu	G u Arg Val	Phe Thr	Asn Leu	
2200	att gaa aac agc ctg aag	2205	tac gct ggc aac tgt	2210	gcg ccc cgc ggc	7260
lle G u	Asn Ser Leu Lys	Tyr Ala	Gly Asn Cys	Ala Pro	Arg Gly	
2215	ata cgt gcc tgg tgt gaa	2220	aat acc cgg ctg gaa	2225	atc gcc atc tgg	7305
lle Arg	Ala Trp Cys G u	Asn Thr	Arg Leu G u	lle Ala	lle Trp	
2230	gac ggc ggg ccg ggc atc	2235	gcc caa aac gac ctg	2240	acg cgg att ttc	7350
Asp Gly	Gly Pro Gly lle	Ala G n	Asn Asp Leu	Thr Arg	lle Phe	
2245	gac aaa ttt tca cgc ggt	2250	gat aaa gaa tcc gcc	2255	gta ccg ggc gtt	7395
Asp Lys	Phe Ser Arg Gly	Asp Lys	G u Ser Ala	Val Pro	Gly Val	
2260	ggg ctg gga ctg gcg att	2265	tgt aaa acg att atc	2270	gaa agc cac ggc	7440
Gly Leu	Gly Leu Ala lle	Cys Lys	Thr lle lle	G u Ser	His Gly	
2275	ggt cag atc tgg gcg gaa	2280	aat cgt gct gaa ggc	2285	ggt gcc tgc ttt	7485
Gly G n	lle Trp Ala G u	Asn Arg	Ala G u Gly	Gly Ala	Cys Phe	
2290	cgt ctg tct tta cca ctt	2295	cca ccc gtt cct gaa	2300	att tct cct gaa	7530
Arg Leu	Ser Leu Pro Leu	Pro Pro	Val Pro G u	lle Ser	Pro G u	
2305	ggc ttg aaa taa cttcacagat	2310	gatcggttat aatgcgcgac	2315	cttactgatt	7582
Gly Leu	Lys					
2320	atgattggga aattatggaa		cgttttaccg aaaacctg			7620

<210> 8
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Pantoea ananatis

5

<400> 8

ES 2 631 360 T3

Met Ala Ala Asn Ala Phe Leu Leu Ile Ala Val Tyr Leu Leu Leu Leu
1 Met Val Met Ala Ala 5 Pro Leu Gly Arg Gly Leu Ala Ala Leu Val Ala
20 Asp Lys Pro Leu Phe Ala Arg Ala Gly Ala Leu Leu Trp Arg Phe Ser
35 Gly Val Gln Gu Gly Gly Met Arg Trp Gln His Tyr Leu Leu Ala Ile
50 Leu Val Phe Asn Leu Leu Gly Phe Val Val Leu Leu Ala Ile Leu Met
65 Phe Gln Gly Ala Leu Pro Leu Asn Pro Gln His Leu Pro Gly Leu Ser
85 Trp Asp Leu Ala Leu Asn Thr Ala Ile Ser Phe Val Thr Asn Thr Asn
100 Trp Gln Ser Tyr Ala Gly Gu Ser Thr Leu Ser Tyr Phe Ser Gln Met
115 Val Gly Leu Thr Val Gln Asn Phe Val Ser Ala Ala Thr Gly Ile Ala
130 Val Ala Phe Ala Leu Ile Arg Gly Phe Ala Asn Arg Ser Val Ala Thr
145 Leu Gly Asn Ala Trp Arg Asp Leu Thr Arg Ile Thr Leu Tyr Val Leu
165 Leu Pro Ile Ser Leu Leu Met Ala Leu Phe Phe Val Ser Gln Gly Ser
180 Ile Gln Asn Phe Leu Pro Tyr His Asn Val Thr Ser Leu Gu Gly Ala
195 Gln Gln Thr Leu Ala Met Gly Pro Val Ala Ser Gln Gu Ala Ile Lys
210 Met Leu Gly Thr Asn Gly Gly Gly Phe Phe Asn Val Asn Ser Ala His
225 Pro Phe Gu Asn Pro Thr Ala Leu Ser Asn Phe Val Gln Met Leu Ser
245 Ile Phe Leu Ile Pro Ala Ala Leu Cys Phe Ala Phe Gly Gu Ser Val
260 Lys Asp Arg Arg Gln Gly Ser Met Leu Leu Trp Ser Met Thr Leu Met
275 Phe Val Val Ala Ala Ala Leu Val Met Trp Ala Gu Leu Arg Gly Asn
290 Pro His Phe Leu Thr Leu Gly Ala Asp Ser Ala Ile Asn Met Gu Gly
305 Lys Gu Thr Arg Phe Gly Ile Leu Asn Ser Ser Leu Phe Ala Val Ile
325 Thr Thr Ala Ala Ser Cys Gly Ala Val Asn Ala Met His Asp Ser Phe
340 Thr Ala Leu Gly Gly Met Val Pro Met Leu Leu Met Gln Leu Gly Gu
355 Val Val Phe Gly Gly Val Gly Ala Gly Leu Tyr Gly Met Leu Leu Phe
370 Val Leu Leu Ala Val Phe Ile Ala Gly Leu Met Ile Gly Arg Thr Pro
385 Gu Phe Leu Gly Lys Lys Ile Asp Val Trp Gu Met Lys Met Thr Ala
405 Leu Ala Ile Leu Val Thr Pro Ala Leu Val Leu Ile Gly Thr Ala Ile
420 Ala Met Met Thr Asp Ala Gly Arg Ala Gly Met Ala Asn Pro Gly Thr
435 His Gly Phe Ser Gu Val Leu Tyr Ala Val Ser Ser Ala Ala Asn Asn
450 Asn Gly Ser Ala Phe Ala Gly Leu Asn Ala Asn Thr Pro Phe Trp Asn
465 Leu Leu Leu Ala Val Cys Met Phe Val Gly Arg Phe Gly Ile Ile Ile
485 Pro Val Met Ala Ile Ala Gly Ala Met Ala Val Lys Lys Val Gln Pro
500 Val Gly Asn Gly Thr Leu Pro Thr His Gly Pro Leu Phe Ile Ala Leu
515 Leu Val Gly Thr Val Leu Leu Val Gly Ala Leu Thr Phe Ile Pro Ala
530 Leu Ala Leu Gly Pro Val Ala Gu His Leu Gln Leu Ile Gln Gly Gln
545 550 555 560

<210> 9
5 <211> 681
<212> PRT
<213> Pantoea ananatis

<400> 9

10

ES 2 631 360 T3

Met	Ser	Arg	Gln	Gln	Gln	Val	Phe	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	Arg	Thr	Ser
1			5						10					15	
Ala	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Asp	Pro	Arg	Val	Gln	Phe	Arg	Asn
			20					25					30		
Pro	Val	Met	Phe	Val	Val	Tyr	Leu	Gly	Ser	Ile	Leu	Thr	Ser	Ile	Leu
		35					40					45			
Ala	Ile	Met	Met	Phe	Thr	Gly	His	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr
		50				55					60				
Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Trp	Leu	Trp	Phe	Thr	Val	Leu	Phe	Ala	Asn	Met
65					70					75				80	
Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Arg	Ser	Lys	Ala	Gln	Ala	Asn	Ser	Leu
				85					90				95		
Lys	Gly	Val	Lys	Lys	Thr	Ser	Phe	Ala	Lys	Lys	Leu	Ser	Ala	Ala	His
			100					105					110		
Tyr	Gly	Ala	Ala	Trp	Gln	Gln	Val	Ala	Ala	Asp	Ala	Leu	Arg	Lys	Gly
		115					120					125			
Asp	Ala	Val	Leu	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Val	Ile	Pro	Cys	Asp	Gly	Glu
					135						140				
Val	Val	Glu	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Asp	Glu	Ser	Ala	Ile	Thr	Gly	Glu
145					150					155				160	
Ser	Ala	Pro	Val	Ile	Arg	Glu	Ser	Gly	Gly	Asp	Phe	Ala	Ser	Val	Thr
				165					170					175	
Gly	Gly	Thr	Arg	Ile	Leu	Ser	Asp	Trp	Leu	Val	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala
			180					185					190		
Asn	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Leu	Asp	Arg	Met	Ile	Ala	Met	Val	Glu	Gly
		195					200					205			
Ala	Gln	Arg	Arg	Lys	Thr	Pro	Asn	Glu	Ile	Ala	Leu	Thr	Ile	Leu	Leu
		210				215					220				
Val	Ser	Leu	Thr	Ile	Val	Phe	Leu	Leu	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Trp	Pro
225					230					235				240	
Phe	Ser	Ala	Trp	Gly	Gly	Thr	Pro	Val	Thr	Ile	Thr	Val	Leu	Val	Ala
			245						250					255	
Leu	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Pro	Thr	Thr	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala
			260					265					270		
Ile	Gly	Val	Ala	Gly	Met	Ser	Arg	Met	Leu	Gly	Ala	Asn	Val	Ile	Ala
		275					280					285			
Thr	Ser	Gly	Arg	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Asp	Val	Leu	Met
		290				295					300				
Leu	Asp	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	Thr	Leu	Gly	Asn	Arg	Gln	Ala	Thr	Gln
305					310					315				320	
Phe	Leu	Pro	Ala	Pro	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Gln	Leu	Ala	Asp	Ala	Ala
				325					330					335	
Gln	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Arg	Ser	Ile	Val
			340					345					350		
Val	Leu	Ala	Lys	Gln	Lys	Phe	Asn	Leu	Arg	Glu	Arg	Asp	Leu	Ser	Ser
		355					360					365			
Met	Gly	Ala	Ser	Phe	Ile	Pro	Phe	Ser	Ala	Gln	Thr	Arg	Met	Ser	Gly
		370				375					380				
Val	Asn	Val	Gln	Asp	Arg	Leu	Ile	Arg	Lys	Gly	Ala	Val	Asp	Ala	Val
385					390					395				400	
Arg	Arg	His	Ile	Glu	Ala	Ser	His	Gly	Ala	Phe	Pro	Ala	Glu	Val	Asn
				405						410				415	
Ala	Arg	Val	Glu	Glu	Val	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly	Thr	Pro	Leu	Val	Val
			420					425					430		
Ala	Glu	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Gly	Val	Val	Ala	Leu	Lys	Asp	Ile	Val
		435					440					445			
Lys	Gly	Gly	Ile	Lys	Glu	Arg	Phe	Ala	Glu	Leu	Arg	Lys	Met	Gly	Ile
		450				455					460				
Lys	Thr	Val	Met	Ile	Thr	Gly	Asp	Asn	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Ile

ES 2 631 360 T3

465 Ala Ala Glu Ala Gly 470 Val Asp Asp Phe Leu Ser 475 Glu Ala Thr Pro Glu
 Ala Lys Leu Ala Gly 485 Ile Arg Gln Tyr 490 Gln Ala Glu Gly Arg 495 Leu Val
 Ala Met Thr Gly Asp Gly Thr Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Gln Ala 510
 Asp Val Ala Val Ala Met Asn Ser Gly Thr Gln Ala Ala Lys Gu Ala 525
 Gly Asn Met Val Asp Leu Asp Ser Asn Pro Thr Lys Leu Leu Gu Val 540
 Val His Ile Gly Lys 550 Gln Met Leu Met Thr Arg Gly Ser Leu Thr Thr 560
 Phe Ser Ile Ala Asn Asp Val Ala Lys Tyr Phe Ala Ile Ile 575 Pro Ala 580
 Ala Phe Ala Ala Thr Tyr Pro Gln Leu Asn Met Leu Asn Val Met Gln 590
 Leu His Ser Pro Ala Ser Ala Ile Leu Ser Ala Val Ile Phe Asn Ala 605
 Leu Val Ile Val Phe Leu Ile Pro Leu Ala Leu Lys Gly Val Ser Tyr 620
 Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ser Leu Leu Arg Arg Asn Leu Leu Ile Tyr 635
 Gly Leu Gly Gly Leu Leu Val Pro Phe Val Gly Ile Lys Ala Ile Asp 640
 Met Leu Leu Val Leu Ser Gly Met Ala 655 665 670 680

<210> 10
 <211> 189
 5 <212> PRT
 <213> Pantoea ananatis

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 891
 <212> PRT
 15 <213> Pantoea ananatis

<400> 11

Met Asn His Gu Pro Leu Arg Pro Asp Pro Asp Ala Leu Leu Gln Thr
 1 5 10 15
 Ser Ser Asp Ser His Arg Gly Lys Leu Lys Ile Tyr Phe Gly Ala Cys

20

ES 2 631 360 T3

Ser Lys Gly Gln Pro Ala Gly Ala Gly Thr Asp Thr Leu Pro Ala Val
 580
 Pro Tyr Gln Ile Leu Pro Leu Lys Val Gly Asp Leu Cys Arg Gly Leu
 595
 Leu Val Val Gu Pro Gln Asn Val Arg Gln Leu Met Val Pro Gu Gln
 610
 Gln Arg Leu Leu Gu Thr Phe Thr Val Leu Ile Ala Asn Ala Leu Gu
 625
 Arg Met Ala Leu Ser Gln Ser Gu Ala Ala Ser Arg Leu Ser Ala Gu
 645
 Arg Gu Gln Leu Arg Asn Ala Leu Leu Ser Ala Leu Ser His Asp Leu
 660
 Arg Thr Pro Leu Thr Val Leu Phe Gly Gln Ala Gu Met Leu Met Leu
 675
 Asp Leu Ala Ser Asp Asn Ser Lys Tyr Val Pro Gln Ala Ser Gln Ile
 690
 Arg Gu Gln Thr Leu Ser Thr Ile Arg Leu Val Ser Asn Met Leu Asp
 705
 Met Ala Arg Ile Gln Ser Gly Gly Leu Asn Leu Arg Gu Gu Trp Leu
 725
 Ala Leu Gu Gu Val Ile Gly Gly Ala Leu Ser Ser Met Ala Pro Ser
 740
 Leu Lys Gly Arg Gu Val Gu Leu Asp Leu Pro Gu Asp Ile Val Leu
 755
 Ile Lys Gly Asp Ser Thr Leu Leu Gu Arg Val Phe Thr Asn Leu Ile
 770
 Gu Asn Ser Leu Lys Tyr Ala Gly Asn Cys Ala Pro Arg Gly Ile Arg
 785
 Ala Trp Cys Gu Asn Thr Arg Leu Gu Ile Ala Ile Trp Asp Gly Gly
 805
 Pro Gly Ile Ala Gln Asn Asp Leu Thr Arg Ile Phe Asp Lys Phe Ser
 820
 Arg Gly Asp Lys Gu Ser Ala Val Pro Gly Val Gly Leu Gly Leu Ala
 835
 Ile Cys Lys Thr Ile Ile Gu Ser His Gly Gly Gln Ile Trp Ala Gu
 850
 Asn Arg Ala Gu Gly Gly Ala Cys Phe Arg Leu Ser Leu Pro Leu Pro
 865
 Pro Val Pro Gu Ile Ser Pro Gu Gly Leu Lys
 885
 890

<210> 12
 <211> 1215
 5 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (301)..(975)

<400> 12

gcgt acggcg caaaat gat t t t at gacgag aat aagt ccg gt acat ggat t cct cct gac 60
 gaaaagt cgg t t aaat gt ga t ct gcat cca at att acgcc t gat t gt gt a at t t t act ac 120
 t cat ct gacc act aaat t t g acgct t t t t t gt act gt t aa t gacaat ct g aaaat t agt t 180
 acat t t t ggt t aaat aat gg t t t t gacgat gat ct t t agc gcgat t cgat ggcaacacgg 240
 acgaaaggct gaaaagt t ga t acagt gt at t t t ccct t t t caggcaat gg caggat t ggc 300
 gt g acc acg gtt t ta atc att gaa gat gag aaa gaa att cgc cgc t t c 348
 Val Thr Thr Val Leu Ile Ile Gu Asp Gu Lys Gu Ile Arg Arg Phe
 1 5 10 15
 gt g cgc atc gcg t t g gaa agc gaa ggc ct g aag gtt t t c gat gcc gaa 396
 Val Arg Ile Ala Leu Gu Ser Gu Gly Leu Lys Val Phe Asp Ala Gu
 20 25 30
 acg ct a caa cgt ggg t t g att gag gcg gcg acg cga aaa ccc gat ct g 444
 Thr Leu Gln Arg Gly Leu Ile Gu Ala Ala Thr Arg Lys Pro Asp Leu
 35 40 45
 gt c att ct c gat ct c ggc ct g ccc gat ggc gat ggc aaa acc t t t att 492
 Val Ile Leu Asp Leu Gly Leu Pro Asp Gly Asp 60
 50 55 60

15

ES 2 631 360 T3

ggc gag ctg cgt cag tgg agc acg ctg ccc gtg att gtg ctg t cg gcc 540
 Gly Gu Leu Arg Gln Trp Ser Thr Leu Pro Val Ile Val Leu Ser Ala
 65 70 75 80
 cga atc gac gaa cag gat aaa att gac gcg ctg gat gca ggg gcc gac 588
 Arg Ile Asp Gu Gln Asp Lys Ile Asp Ala Leu Asp Ala Gly Ala Asp
 85 90 95
 gat tac ctg acg aaa ccc ttc ggt att ggt gaa ctg ctg gca cgc gtt 636
 Asp Tyr Leu Thr Lys Pro Phe Gly Ile Gly Gu Leu Leu Ala Arg Val
 100 105 110
 cgc gtc gcc gac gtt acc gtg gat att gcg gcc cgc aga gtg ctg cgc 684
 Arg Val Ala Leu Arg Arg His gca gga Gln His Thr Asp ccc aag gtc
 115 120 125
 agc ttc gcc gac gtt acc gtg gat att gcg gcc cgc aga gtg ctg cgc 732
 Ser Phe Ala Asp Val Thr Val Asp Ile Ala Ala Arg Val Leu Arg
 130 135 140
 gct ggc gag gaa gtg cac ctt acg ccg ata gag ttt cgt ttg ctg acg 780
 Ala Gly Gu Gu Val His Leu Thr Pro Ile Gu Phe Arg Leu Leu Thr
 145 150 155 160
 acg ctg ctg aac aac gcg ggc aaa gtg ctg acc cag cgg cag ctg ttg 828
 Thr Leu Leu Asn Asn Ala Gly Lys Val Leu Thr Gln Arg Gln Leu Leu
 165 170 175
 agc cag gtg tgg gga cca aac gcc gtt gaa cac agc cac tat ctg cgg 876
 Ser Gln Val Trp Gly Pro Asn Ala Val Gu His Ser His Tyr Leu Arg
 180 185 190
 atc tat atg ggg cac ctg cgg caa aag ctg gag gcg aat cct acc cag 924
 Ile Tyr Met Gly His Leu Arg Gln Lys Leu Gu Ala Asn Pro Thr Gln
 195 200 205
 ccg gta cat ctg ctg acg gaa acc ggc atc ggc tac cgg ttt atg cca 972
 Pro Val His Leu Leu Thr Gu Thr Gly Ile Gly Tyr Arg Phe Met Pro
 210 215 220
 taa aaaagcgcg acc ttaggcg ttttttcatt taacagc gca atcaggcgtt 1025
 tttcagcact tgcgtgacaa tctctaccgc tttttttct atctgcgcgc ggtgttctgc 1085
 gccagagaaa ctttcacaat agattttgia tgcattctcg gtgcctgaag gacgggccgc 1145
 aaaccagccg ttttccgtca tcactttcag gccgccgat a gacgcgccat tgcgccgcg 1205
 agcggtcaga 1215

<210> 13
 <211> 224
 5 <212> PRT
 <213> Pantoea ananatis

<400> 13

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

<210> 14
 <211> 1308
 15 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

ES 2 631 360 T3

<400> 14

at gagcagaa	t cat gacgcc	cgt gaact gg	gaagcct gca	gcagcgaggc	gcagcaggcg	60
ct gt t ggcac	gccct gcgct	cgct cgt ct	gacagcat ca	gccagat cgt	gcgcat gt g	120
t t ggt cagag	t gaaagagga	aggcgt gcg	gct t t acgag	aat t cagcgc	gcgct t t gac	180
aaggt t gaaa	cagacgacct	gcgct t acg	ccacagcaga	t gcagggcggc	cagcgt cgc	240
ct t ggt gacg	agct gaaaca	ggcgt ggcc	gt ggccat t g	gcaat at t ga	aacct t t cac	300
cgt gcgcaga	t cct gccgcc	ggg ggt gt g	gaaacgcagc	ccggcgt gcg	ct gt cagcaa	360
at t acgcgcc	cgt gaaat c	ggg gggct t g	t at at t ccgg	gcggt t ct gc	cccgt gt t t	420
t ct accgt t c	t gat gct ggc	t accccggcg	cggat t gcgg	gct gt ggt cg	cgt ggt gct g	480
t gct cgcccc	cgccgat t gc	t gat gaaat t	ct ct acgcgg	ccaaaci t t g	cggt gt ggaa	540
gaagt gt t cc	aggt gggg gg	at cacaggcg	at t gccgcc	t ggct t t gg	caccgaaagc	600
at ccct aagg	t agat aaaat	t t t t ggt ccg	ggcaacgcgt	gggt t accga	agccaaacgt	660
caggt cagcc	agcgcct t ga	t ggcgcggcg	at t gat at gc	ccgt gcgcc	gt cggagt g	720
ct ggt gat t g	ccgat gaagg	t gccacaccg	gcct t cgt t g	ct ct gat ct	gct gt cgcag	780
gcggaacacg	gcct gaci c	gcaggt gat t	t t act gacgc	ct t cgt ggc	gct gcccag	840
cgct cgccg	aggcggg gga	ggat cagct g	gcccagt t gc	cacgt gcggc	gacagcccgc	900
caggcact gg	aaagcagccg	cct gat cgt c	gcccgggat a	t gcagcaat g	cat t gcgat c	960
t ccaaccgt	at ggt ccgga	gcacct gat t	ct gcaaacc	gcacgccacg	ggat ct ggt g	1020
gaacagat t a	ccagcgccgg	t t cgt t t t c	ct gggcgact	ggt caccgga	at ccgcagga	1080
gat t at gct t	cgggcaccaa	ccacgt gct g	ccgacct acg	gct at accgc	gacat gct cc	1140
agcct gggcc	t ggccgact t	t cagaaacgc	at gacggt ac	aggagct gac	gccgcagggc	1200
t t cct gaacc	t ggccggcgac	cat cgaaacc	ct ggccggcg	ct gaacagct	gcacgcccac	1260
aaaaat gccg	t cacgt t gcg	cgt t gccgca	ct caaggagc	aagcat ga	1308	

5

<210> 15
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> cebador

15

ccat agcggg	t ggagat cgc	aat gcat t gc	t gcat at ccc	t gaagcct gc	t t t t t at ac	60
t aagt t gg						68

20

<210> 16
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> cebador

30

gcccggcagg	cact ggaaag	cagccgcct g	at cgt cgccc	cgct caagt t	agt at aaaaa	60
agct gaac						68

35

<210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> cebador

45

<400> 17

tagcgagatc	tctgatgtcc	ggcgggtgctt	ttg	33
------------	------------	-------------	-----	----

50

<210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

55

<220>

ES 2 631 360 T3

	<223> cebador	
	<400> 18	
5	aaaagagct cttacgccc gcctgccac tc	32
	<210> 19	
	<211> 34	
	<212> ADN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
15	<400> 19	
	caggatctag aaggagacat gaacgatgaa catc	34
	<210> 20	
20	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> cebador	
	<400> 20	
	gataaggatc cgaaataaaa gaaatgcca atagga	36
30	<210> 21	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 21	
40	ccttgagct cgcgggcagt gagcgcaacg c	31
	<210> 22	
	<211> 48	
45	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 22	
	ctagagcggc cgccgatcgg gatcctcctg tgtgaaatg tgttatccgc	48
55	<210> 23	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 23	
65	ctctacgatc gaggaggta taaaaatgg atattaatac tg	42

ES 2 631 360 T3

<210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 24
 10 tcaaagcggc cgcttctcg tctgttcta ctgga 36
 <210> 25
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> cebador
 20
 <400> 25
 cctttggtac cgcgggcagt gagcgcaacg c 31
 25 <210> 26
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 26
 35 aacaggaatt cttgcctgg cggcagtagc gcgg 34
 <210> 27
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> cebador P1
 45 <400> 27
 ctagtaagat ctgaagcct gctttttat actaagtgg 40
 <210> 28
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> cebador P2
 <400> 28
 55 atgatcgaat tcgaaatcaa ataatgatt tattttgact g 41
 60
 <210> 29
 <211> 120
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65
 <220>

ES 2 631 360 T3

	<223> fragmento de ADN que contiene attL		
	<400> 29		
5	agat ctt gaa gcct gct ttt tt at act aag tt ggcatt at aaaaaagcat t gct t at caa ttt gt t gcaa cgaacaggc act at cagtc aaaat aaaat catt att t ga ttt cgaatt c	60 120	
	<210> 30		
	<211> 41		
	<212> ADN		
10	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador P3		
15	<400> 30		
	atgccactgc agtctgttac aggtcactaa taccatctaa g	41	
	<210> 31		
20	<211> 46		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> cebador P4		
	<400> 31		
30	accgtaagc ttctagacg ctcaagttag tataaaaaag ctgaac	46	
	<210> 32		
	<211> 184		
	<212> ADN		
35	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> fragmento de ADN que contiene attR		
40	<400> 32		
	ct gcagt ct g tt acaggt ca ct aat accat ct aagt agt t gat t cat agt gact gcat at gt t gt g t t t acagt at t at gt agt ct gt t t t t at gcaa aat ct aat t t aat at at t ga t at t at at c at t t t acgt t t ct cgt t cag ct t t t t at a ct aact t gag cgt ct agaaa gct t	60 120 180 184	
	<210> 33		
	<211> 38		
45	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador P5		
50	<400> 33		
	ttcttagacg tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgc	38	
55	<210> 34		
	<211> 37		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
60	<220>		
	<223> cebador P6		

ES 2 631 360 T3

<400> 34
 taacagagat ctgcgcgaga aaaaaaggat ctcaaga 37

5 <210> 35
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador P7

<400> 35

15 aacagagatc taagcttaga tcctttgctt ggcggcagta gcgcgg 46

<210> 36
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador P8

25 <400> 36

ataaactgca gcaaaaagag tttgtagaaa cgcaa 35

<210> 37
 <211> 1388
 <212> ADN
 <213> Artificial

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

<400> 37

gaat t ct cat	gt t t gacagc	t t at cat cga	t aagct t t aa	t gcggt agt t	t at cacagt t	60
aaat t gct aa	cgcagt cagg	caccgt gt at	gaaat ct aac	aat gcgct ca	t cgt cat cct	120
cggcaccgt c	accct ggat g	ct gt aggcac	aggct t ggt t	at gccggt ac	t gccgggcct	180
ct t gcgggat	at cgt ccat t	ccgacagcat	cgccagt cac	t at ggcgt gc	t gct agcgt	240
at at gcgt t g	at gcaat t t c	t at gcgacc	cgt t ct cgga	gcact gt ccg	accgct t t gg	300
ccgccgcca	gt cct gct cg	ct t cgct act	t ggagccact	at cgact acg	cgat cat ggc	360
gaccacacc	gt cct gt gga	t cct ct acgc	cggacgcat c	gt ggccggca	t caccggcgc	420
cacaggt gcg	gt t gct ggcg	cct at at cgc	cgacat cacc	gat ggggaag	at cgggct cg	480
ccact t cggg	ct cat gageg	ct t gt t t cgg	cgt ggt at g	gt ggcaggcc	ccgt ggccgg	540
gggact gt t g	ggcgccat ct	cct t gcat gc	accat t cct t	gcggcggcgg	t gct caacgg	600
cct caacct a	ct act gggct	gct t cct aat	gcaggagt cg	cat aaggag	agcgt cgacc	660
gat gccct t g	agagcct t ca	accagt cag	ct cct t ccgg	t gggcgcggg	gcat gact at	720
cgt cgcgca	ct t at gact g	t ct t ct t t at	cat gcaact c	gt aggacagg	t gccggcagc	780
gct ct gggc	at t t t cggcg	aggaccgt t	t cgt ggagc	gcgacgat ga	t cggcct gt c	840
gct t gcggg a	t t cggaat ct	t gcacgcct	cgct caagcc	t t cgt cact g	gt cccgccac	900
caaacgt t t c	ggcgagaagc	aggccat t at	cgccggcat g	gcggccgacg	cgct gggct a	960
cgt ct t gct g	gcgt t cgcga	cgcgaggct g	gat ggcct t c	cccat t at ga	t t ct t ct cgc	1020
t t ccggcggc	at cgggat gc	ccgcgt t gca	ggccat gct g	t ccaggcagg	t agat gacga	1080
ccat caggga	cagct t caag	gat cgt cgc	ggct ct t acc	agcct aact t	cgat cact gg	1140
accgct gat c	gt cacggcga	t t t at gccgc	ct cggcgagc	acat ggaacg	ggt t ggcag g	1200
gat t gt aggc	gccgccct at	acct t gt ct g	cct ccccgcg	t t gcgt cgcg	gt gcat ggag	1260
ccgggccacc	t cgacct gaa	t ggaagccgg	cggcacct cg	ct aacggat t	caccact cca	1320
act agaaagc	t t aacacaga	aaaaagcccg	cacct gacag	t gcgggct t t	t t t t t cgac	1380
cact gcag						1388

40 <210> 38
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador P9

ES 2 631 360 T3

	<400> 38	
5	agtaattcta gaaagcttaa cacagaaaaa agccccg	36
	<210> 39	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> cebador P10	
	<400> 39	
15	ctagtaggat ccctgcagtg gtcgaaaaaa aaagccccgca ctg	43
	<210> 40	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador 1	
25	<400>40	
	ggaagatcta tttgccttcg cacatcaacc tgg	33
30	<210> 41	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador 2	
	<400> 41	
40	cggggtacct tgtaaatatt ttaaccgcc	30
	<210> 42	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador 3	
50	<400> 42	
	ggaagatcta aggagacctt aatgagcga cacaacgatc ctgcaaaaca gtacct	56
	<210> 43	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador 4	
	<400> 43	
65	cggggtacct cgtagagggt tactggcgct tatccagcg	39
	<210> 44	

ES 2 631 360 T3

<211> 864
 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

5 <400> 44

at gt ct gaac	aaact at ca	gccccgt aaa	gt ct ggaagt	gggaccccga	agcgaaggt	60
aat ggt gcca	aaact aaccg	ccct accgct	ggcccaacc	at gaaaaagc	cct gccggt t	120
ggt aagcat c	cgct gcagct	ct act ct ct g	ggcacgcct a	acggccagaa	agt cact at t	180
ct gct ggaag	agt t gct ggc	gct gaacgt g	aacgat gcag	agt acgat gc	ct ggt t aat c	240
aat at t ggt g	aaggcgacca	gt t cagcagc	ggt t t t gt t g	agat caacc	caact ccaaa	300
at cccggcac	t gi gcgat ca	t t cagccaca	ccaccgat t c	gcgt at t t ga	at ccggt aac	360
at cct gct ct	at ct gggcga	aaaat acggt	t at t t cct gc	cgaagat cc	ggccaaacgc	420
accgaaacgc	t gaact ggc	gt t ct ggc t g	caaggct cag	ccct t acct	t gggggcggc	480
t t t ggt cact	t ct at cat t a	cgcgccagaa	aagat t gaat	acgccat caa	ccgct t ct ca	540
ct ggaagcca	aacgt cagt t	t gacgt gct g	gaccgt cagc	t t gccgat aa	ccgt t at ct g	600
gcggt gacg	at t acaccat	cgccgat at c	gccacct ggc	cgf ggt acgg	cagcat ggt g	660
ct gt at aacc	agt acaat gc	ggcagaat t c	ct cgacct t c	agt cct acaa	aaat gt ggt g	720
cgct gggccg	aagagat cgc	t ct gcgt ccg	gccgt t at gc	gcgcccgcaa	ggt gaaccgt	780
gt gat gggcg	aaccggccga	t cagct gcgc	gagcgccat g	acgcat cggg	ct t t gat acg	840
caaaccacaag	acaagcaagc	ct ga				864

<210> 45
 <211> 918
 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

10 <400> 45

<400> 45

15

at gt cagcac	gagt ct ggt g	t ct ggggt gat	gccgt ggt gg	acct gct t cc	ggacgggccc	60
gggcat t t aa	t acagt gt gc	aggcgggggc	cccgccaat g	t ggcggt ggg	cat t gccccg	120
t t acagggcc	gcagcggt t	t at t ggcgg	gt t ggggacg	at cct t t t gg	t cact t t at g	180
cagcacacgc	t ggcgact ga	acaggt t gat	accgct at a	t gacgct gga	cagcgcccag	240
cgcacct caa	cggt ggt ggt	ggcgct ggat	caggaaggt g	agcggact t t	t acct t t at g	300
gt gcgcccc	gt gcagat ct	gt t t ct ggaa	caaggcgat c	t ccccaggt t	t gagcaaggt	360
gaat ggc t c	act gct gct c	aat t gccct g	gcggcagaac	ct t cgcgct c	caccacct t t	420
t ct gccat gc	agcagat cag	cgat gccggt	ggct t t gt ga	gct t t gat cc	caat at t cgt	480
cacgat ct gt	ggcagcagca	t gcccaact g	cgggact gt g	t gaaccgggc	gt t acagt g	540
gcccgat ct gg	t caagct gt c	t gaggaagag	ct ggct t t t c	t gact ccggg	ggcgcaaac	600
gct gacagca	t gcaggcgt	ggcggaacgc	t t t gcgat t a	gcct gct gat	ggt caccag	660
ggcaagggcag	gagt gaaagt	ct ggc at cag	ggt aaacat t	at cact at cc	cacgct gcct	720
gt ggt gagcg	t ggacaccac	cgggcgaggg	gat gcgt t t g	t cgccgggct	gct at ggggg	780
ct ggcggaaa	aggggat gcc	cgct aat gag	gccgagct gg	cggcagcact	cagcagcgca	840
cagcagt gt g	ggcgct ggc	gacgacggca	aaagggcca	t gaccgcgt t	gcct t at cgt	900
caccaaat t g	aaggat ga					918

<210> 46
 <211> 3095
 <212> ADN
 <213> Pantoea ananatis

20 <400> 46

<400> 46

25

agact gccat	gacct ggac	agagat t cat	t agcggccgt	act cgcccgg	cgcgact ggg	60
aaaaccccgg	cgt cagcgaa	cat aaccggc	t ggaagccca	t ccgcccgt t t	t acagct ggc	120
gcagcgct ga	ggcgcccat	aacaacgcgc	cat cggcgca	gcgaaaaagc	ct gagcggcg	180
aat ggaagt t	t gct t t t t c	cct gcgccc	aggcggg gcc	ggat agct gg	cgcaaccagg	240
at t t gcaggc	ggcagcgacg	at t accgt gc	cgf cagt ct g	gcaaat gcag	ggct at gat g	300
t t ccgat t t a	caccaat gt t	acct at ccca	t t ccggt t ga	t cccccgcgc	gt t ccggt g	360
aaaaat cct ac	gggat gt t at	t cgct cacat	t t aat gt gga	t gcagact gg	ct gcaacat g	420
gacaaacccg	aat t at t t t t	gacggcgt ga	at t cagcct t	ct at ct ct gg	t gcaacggac	480
gct ggggt ggg	ct acggggcg	gacagccgct	t gccgt ct ga	at t t gat ct g	agcgaat t t c	540
t gcggaagg	t gaaaaat cgc	ct ggcggt ga	t ggt gt t gcg	ct ggagcgt	ggcagct at c	600
t ggaagat ca	ggat at gt gg	cgcat gagt g	gt at t t t ccg	cgat gt t t cc	ct gct gcat a	660
agcct gccag	ccat ct t cgc	gat ct gcgca	t t cgt acgca	t t t caat gac	gat t t cagt c	720
gt gcgcgct	ggaagct gag	gt gcgggt t g	ccggagcact	ggat gacgat	t t acgggt ca	780
gcgt gcagct	ct t cgcgggt	gacacgct aa	ccggagaagc	gacgt cgccc	t t gggcagcg	840
cgat t at t ga	cgagcggcgc	gcgt ggagcg	at cggacaac	gct gt gcat c	aacgt t gct a	900
accct gcgct	gt ggagt gcg	gaaacgcgc	at ct ct accg	ggcgggt t gt g	cagt t acacc	960
ggacggacgg	t acgt gat t	gaggggagg	cct gcgacgt	gggat t ccgg	cacgt cagca	1020
t cgaaaaat gg	cct gct gct g	ct caacgt c	agccact gct	cat ccgccc	accaaccgcc	1080
acgagcat ca	t cct gaacgc	ggt caggt ga	t ggat cgt ga	cact at ggt g	caggat at t t	1140
t gct gat gaa	gcagaat aac	t t caacgcgg	t gcgct gct c	ccat t acct	aacgat cccc	1200
t gt ggt at ag	cct gt gt gac	cact accgt	t gt acgt cgt	ggat gaagcc	aacat cgaaa	1260
cgcat ggcat	ggt gccgat g	aat cgct ga	gcgacgat cc	cgt ct ggct t	cccgcgat ga	1320

ES 2 631 360 T3

gcccagcgcgt cacgcgcat g gt gcagcgcg at cgt aat ca cccct gcat t at t at ct ggt 1380
 cact gggg aa cgaat cgggc cacggt gct a accat gat gc gct ct accgc t ggct gaaaa 1440
 gt gaagat cc t t cccgcccg gt ccagt acg aaggt ggcgg ggccaat acc gcagcgaccg 1500
 at at t at ct g t ccgat gt at gcgcgggt cg at gaggat ca acct t t cccg gccgt gccga 1560
 aat ggt ccat t aaaaaat gg ct gt ct at gc caggcgagca gcgt ccgct t at t ct ct gt g 1620
 aat at gct ca t gccat ggga aacagcct t g gt ggct acgc aaaaat act gg caggcat t t c 1680
 gt cagt at cc t gcct gcag ggcggt t t t g t ci gggact g ggt cgat cag t cgct cat aa 1740
 aat at gacga t aacggcgaa ccct gggct g cct acggg gg gact t t ggt gat acgcct a 1800
 at gat cgcca gt t ct gcat g aacgggct gg t ct t t gccga cgggacgcc cat cct cgc 1860
 t ct acgaagc ccgccat gcg cagcagt t ct t ccagt t cag gct gct accg ggcagcgagc 1920
 gcacgct gga agt gaccagc gaat acct gt t ccggcacag t gat aat gaa at cct gcact 1980
 ggt cggg ggc t caggat ggc aacct gct gg ccgcccgt ga agt cagct g gat at cgcg 2040
 cacagggccc ccagcagat c gcact cccgg aggt gccgct gcct caat ct gccggccagc 2100
 t ct ggct gac ggt gcgggt g gaacagcct c agccgacggc ct ggt cagaa gccggt cat a 2160
 t cagcgct g gcagcagt gg ccact ggagg cgat cct gaa t gt ggccct g ccgct cagg 2220
 cggcgagt gc gccacagct c agccgcggcg aagacacct t cagcgt ggcg gt gaacaacc 2280
 agcgt gggc at t cagccgt cagcagggcg t gct cagca gt act ggat c gacgat cagc 2340
 cgcagct cct gt cgccgct g cgcat cagt t t accgct gc t t accgct gat gccgct ggat aacgat at cg 2400
 gcgt cagcga agt cacgcgc at cgacct a at gcct gggg cgagcgct gg aaagcggcg 2460
 ggcact at ca gt ct gagg t accacct gc agt gcaccgc cgaagcgt c t ccgacgccg 2520
 t cgt gat caa caccgt t cat gcct ggcagt t ccagggcaa aacgct gt t t at t agccgt a 2580
 aagt gt accg t at t gat gga t t t ggcgaga t ggcggt gac ggt gaacgt a gagat cgga 2640
 gcggcacgcc t t at ccggca cgcat cggg a t gact gt ca gct caccag at cgt cgagc 2700
 gagi gaact g gt aggcct g gggccgcat g aaaaat t accc ggat cgct g acci cggcct 2760
 gct t t gaccg ct gggat t t a ccgct gagt g aaat gt acac cccgt at gt t t t cccaccg 2820
 aaaacggcct gcgct gcggc acgct gaac t caact at gg t gcgcaccag t ggcgt ggcg 2880
 at t t ccagt t caacat cagt cgct acagcc agacacagct gat ggaaacc t gccat cgcc 2940
 acct gt t acg gcct gaggcg ggcacgt ggc t caat at t ga t ggct t ccac at gggcgt cg 3000
 gcggt gacga t t cct ggagc ccgt cggg at caccggaat t cct gct cagt gcaggacgt t 3060
 acagct acca gt t t at ct gg gggcaacaaa aat aa 3095

<210> 47
 <211> 34
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 47

gcttaagatc tcctgttga caattaatca tcgg 34

15 <210> 48
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 48

25 agt acggccc ct aat gaat c t ct gt ccagg gt cat ggcag t ct cct t gt g t gaaat t gt t 60
 at ccgct cac 70

<210> 49
 <211> 39
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 49

cggttagatc tcgctcaagt tagtataaaa aagctgaac 39

<210> 50
 40 <211> 70
 <212> ADN

ES 2 631 360 T3

<213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 50
 t agcgggct g at agt gtt gt t cagacat ga t gaggt t cgc ctt gaagcct gct ttttt at 60
 act aagt t gg 70
 10 <210> 51
 <211> 78
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 51
 20 cg t tgggaca acgt cgat ct gcgccgaat c t ggt t gct gg acgccgcct g t gaagcct gc 60
 t t t t t at ac t aagt t gg 78
 <210> 52
 <211> 80
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 52
 caacagcaga t aaaccgca t cagt aaaaa cgcat tggcc gccat ggcag t ct cct t gt g 60
 t gaaat t gt t at ccgct cac 80
 <210> 53
 35 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 53
 45 catgtcttct ggtcact 17
 <210> 54
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 54
 55 caagcagggt gaacac 16
 <210> 55
 <211> 32
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 631 360 T3

<223> cebador

<400> 55

5 cccaagcttc cctgatcaat gaggagcgt tc

32

<210> 56

<211> 33

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 56

cgggatccga cgatcggggg cgggacgtaa ggg

33

<210> 57

20 <211> 557

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> secuencia consenso de KdpA de P. anantis y E. coli

<220>

<221> variación

30 <222> 4, 5, 11, 12, 15, 19, 21, 25, 29, 31, 32, 34, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 45, 47, 49, 50, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 61, 64, 6, 69, 71, 74, 75, 78, 79, 80, 82, 83, 85, 86, 93, 107, 119, 122, 131, 139, 143, 148, 154, 156, 157, 158, 169, 161, 168, 171, 176, 179, 182, 185, 190, 191, 194, 195, 202, 203, 205, 207, 213, 215, 238, 241, 251, 258, 264, 273, 274, 275, 281, 286, 288, 289, 290, 293, 294, 295, 296, 297, 303, 304, 309, 311, 314, 317, 325, 329, 331, 338, 348, 364, 368, 378, 384, 404, 412, 416, 426, 430, 432, 434, 443, 446, 450, 475, 478, 483, 487, 496, 506, 512, 514, 528, 532, 555, 557

35 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 57

Mét	Al a	Al a	Xaa	Xaa	Phe	Leu	Leu	I l e	Al a	Xaa	Xaa	Leu	Leu	Xaa	Leu
1				5					10					15	
Mét	Val	Xaa	Al a	Xaa	Pro	Leu	G y	Xaa	G y	Leu	Al a	Xaa	Leu	Xaa	Xaa
			20					25					30		
Asp	Xaa	Pro	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	G u	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Arg
		35					40					45			
Xaa	Xaa	G y	Val	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Mét	Xaa	Tr p	Xaa	Xaa	Tyr	Leu	Xaa
		50				55					60				
Al a	I l e	Leu	Xaa	Xaa	Asn	Xaa	Leu	G y	Xaa	Xaa	Val	Leu	Xaa	Xaa	Xaa
65					70				75						80
Leu	Xaa	Xaa	G n	Xaa	Xaa	Leu	Pro	Leu	Asn	Pro	G n	Xaa	Leu	Pro	G y
			85						90					95	
Leu	Ser	Tr p	Asp	Leu	Al a	Leu	Asn	Thr	Al a	Xaa	Ser	Phe	Val	Thr	Asn
			100					105					110		
Thr	Asn	Tr p	G n	Ser	Tyr	Xaa	G y	G u	Xaa	Thr	Leu	Ser	Tyr	Phe	Ser
		115					120						125		
G n	Mét	Xaa	G y	Leu	Thr	Val	G n	Asn	Phe	Xaa	Ser	Al a	Al a	Xaa	G y
		130				135					140				
I l e	Al a	Val	Xaa	Phe	Al a	Leu	I l e	Arg	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Ser	Xaa
145					150					155					160
Xaa	Thr	Leu	G y	Asn	Al a	Tr p	Xaa	Asp	Leu	Xaa	Arg	I l e	Thr	Leu	Xaa
				165				170						175	
Val	Leu	Xaa	Pro	Xaa	Xaa	Leu	Leu	Xaa	Al a	Leu	Phe	Phe	Xaa	Xaa	G n
			180					185					190		
G y	Xaa	Xaa	G n	Asn	Phe	Leu	Pro	Tyr	Xaa	Xaa	Val	Xaa	Xaa	Xaa	G u
		195					200						205		
G y	Al a	G n	G n	Xaa	Leu	Xaa	Mét	G y	Pro	Val	Al a	Ser	G n	G u	Al a
		210				215					220				
I l e	Lys	Mét	Leu	G y	Thr	Asn	G y	G y	G y	Phe	Phe	Asn	Xaa	Asn	Ser
225					230					235					240
Xaa	His	Pro	Phe	G u	Asn	Pro	Thr	Al a	Leu	Xaa	Asn	Phe	Val	G n	Mét
				245					250					255	
Leu	Xaa	I l e	Phe	Leu	I l e	Pro	Xaa	Al a	Leu	Cys	Phe	Al a	Phe	G y	G u

ES 2 631 360 T3

Xaa Xaa Xaa 260
 Asp Arg Arg Gln Gly Xaa 265
 Met Leu Leu Trp Xaa 270
 Xaa Xaa Phe 275
 Val Xaa Xaa Xaa 280
 Xaa Val Met Trp Ala 285
 Xaa 290
 Phe Val Met Trp Ala 300
 Gly Asn Pro His Xaa Leu Xaa 295
 Leu Gly Xaa Asp Ser Xaa Ile Asn Met 320
 305
 Gly Lys Gly Xaa Arg Phe Gly Xaa 315
 Leu Xaa Ser Ser Leu Phe Ala 335
 325
 Val Xaa Thr Thr Ala Ala Ser Cys Gly Ala Val Xaa Ala Met His Asp 350
 340
 Ser Phe Thr Ala Leu Gly Gly Met Val Pro Met Xaa Leu Met Gln Xaa 365
 355
 Gly Gly Val Val Phe Gly Gly Val Gly Xaa Gly Leu Tyr Gly Met Xaa 380
 370
 Leu Phe Val Leu Leu Ala Val Phe Ile Ala Gly Leu Met Ile Gly Arg 400
 385
 Thr Pro Gly Xaa Leu Gly Lys Lys Ile Asp Val Xaa Gly Met Lys Xaa 415
 405
 Thr Ala Leu Ala Ile Leu Val Thr Pro Xaa Leu Val Leu Xaa Gly Xaa 430
 420
 Ala Xaa Ala Met Met Thr Asp Ala Gly Arg Xaa Xaa Met Xaa Asn Pro 445
 435
 Gly Xaa His Gly Phe Ser Gly Val Leu Tyr Ala Val Ser Ser Ala Ala 460
 450
 Asn Asn Asn Gly Ser Ala Phe Ala Gly Leu Xaa Ala Asn Xaa Pro Phe 480
 465
 Trp Asn Xaa Leu Leu Ala Xaa Cys Met Phe Val Gly Arg Phe Gly Xaa 495
 485
 Ile Ile Pro Val Met Ala Ile Ala Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Lys Xaa 510
 500
 Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Thr Leu Pro Thr His Gly Pro Leu Phe Xaa 525
 515
 Xaa Leu Leu Xaa Gly Thr Val Leu Leu Val Gly Ala Leu Thr Phe Ile 540
 530
 Pro Ala Leu Ala Leu Gly Pro Val Ala Gly Xaa Leu Xaa 555
 545
 550

<210> 58
 <211> 681
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> secuencia consenso de KdpB de P. anantis y E. coli

10 <220>
 <221> Variación
 <222> 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 26, 28, 29, 31, 38, 40, 41, 44, 47, 48, 49, 50, 52, 54, 55,
 15 57, 58, 59, 61, 63, 65, 66, 69, 70, 74, 81, 104, 107, 110, 111, 112, 113, 118, 119, 120, 122, 125, 131, 139, 147,
 190, 193, 226, 227, 237, 248, 249, 251, 252, 305, 320, 321, 323, 326, 331, 332, 354, 359, 367, 368, 370, 371,
 373, 375, 378, 381, 386, 388, 390, 392, 397, 401, 405, 408, 411, 414, 415, 417, 418, 419, 421, 422, 426, 426,
 428, 434, 437, 438, 443, 459, 475, 492, 559, 604, 607, 609, 614, 627, 642, 645, 647, 648, 649, 655, 667, 671,
 674, 677, 678, 679, 681
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20 <400> 58
 Met Ser Arg Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Val Lys Lys Leu Xaa Pro Xaa Xaa Gln Xaa Arg
 20 25 30
 Asn Pro Val Met Phe Xaa Val Xaa Xaa Gly Ser Xaa Leu Thr Xaa Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Ile Xaa Met Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ala Xaa Phe
 50 55 60
 Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa Trp Leu Trp Xaa Thr Val Leu Phe Ala Asn

ES 2 631 360 T3

65 Xaa Ala Gu Ala Leu Ala Gu Gly Arg Ser Lys Ala Gn Ala Asn Ser
 85 Leu Lys Gly Val Lys Lys Thr Xaa Phe Ala Xaa Lys Leu Xaa Xaa Xaa
 100 Xaa Tyr Gly Ala Ala Xaa Xaa Xaa Val Xaa Ala Asp Xaa Leu Arg Lys
 115 Gly Asp Xaa Val Leu Val Gu Ala Gly Asp Xaa Ile Pro Cys Asp Gly
 130 Gu Val Xaa Gu Gly Gly Ala Ser Val Asp Gu Ser Ala Ile Thr Gly
 145 Gu Ser Ala Pro Val Ile Arg Gu Ser Gly Gly Asp Phe Ala Ser Val
 165 Thr Gly Gly Thr Arg Ile Leu Ser Asp Trp Leu Val Ile Xaa Cys Ser
 180 Xaa Asn Pro Gly Gu Thr Phe Leu Asp Arg Met Ile Ala Met Val Gu
 195 Gly Ala Gn Arg Arg Lys Thr Pro Asn Gu Ile Ala Leu Thr Ile Leu
 210 Leu Xaa Xaa Leu Thr Ile Val Phe Leu Leu Ala Thr Xaa Thr Leu Trp
 225 Pro Phe Ser Ala Trp Gly Gly Xaa Xaa Val Xaa Xaa Thr Val Leu Val
 245 Ala Leu Leu Val Cys Leu Ile Pro Thr Thr Ile Gly Gly Leu Leu Ser
 260 Ala Ile Gly Val Ala Gly Met Ser Arg Met Leu Gly Ala Asn Val Ile
 275 Ala Thr Ser Gly Arg Ala Val Gu Ala Ala Gly Asp Val Asp Val Leu
 290 Xaa Leu Asp Lys Thr Gly Thr Ile Thr Leu Gly Asn Arg Gn Ala Xaa
 305 Xaa Phe Xaa Pro Ala Xaa Gly Val Xaa Gu Xaa Xaa Leu Ala Asp Ala
 325 Ala Gn Leu Ala Ser Leu Ala Asp Gu Thr Pro Gu Gly Arg Ser Ile
 340 Val Xaa Leu Ala Lys Gn Xaa Phe Asn Leu Arg Gu Arg Asp Xaa Xaa
 355 Ser Xaa Xaa Ala Xaa Phe Xaa Pro Phe Xaa Ala Gn Xaa Arg Met Ser
 370 Gly Xaa Asn Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Ile Arg Lys Gly Xaa Val Asp Ala
 385 Xaa Arg Arg His Xaa Gu Ala Xaa Xaa Gly Xaa Phe Pro Xaa Xaa Val
 405 Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Val Ala Arg Xaa Gly Xaa Thr Pro Leu Val
 420 Val Xaa Gu Gly Xaa Xaa Val Leu Gly Val Xaa Ala Leu Lys Asp Ile
 435 Val Lys Gly Gly Ile Lys Gu Arg Phe Ala Xaa Leu Arg Lys Met Gly
 440 Ile Lys Thr Val Met Ile Thr Gly Asp Asn Xaa Leu Thr Ala Ala Ala
 465 Ile Ala Ala Gu Ala Gly Val Asp Asp Phe Leu Xaa Gu Ala Thr Pro
 485 Gu Ala Lys Leu Ala Leu Ile Arg Gn Tyr Gn Ala Gu Gly Arg Leu
 500 Val Ala Met Thr Gly Asp Gly Thr Asn Asp Ala Pro Ala Leu Ala Gn
 515 Ala Asp Val Ala Val Ala Met Asn Ser Gly Thr Gn Ala Ala Lys Gu
 530 Ala Gly Asn Met Val Asp Leu Asp Ser Asn Pro Thr Lys Leu Xaa Gu
 545 Val Val His Ile Gly Lys Gn Met Leu Met Thr Arg Gly Ser Leu Thr
 565 Thr Phe Ser Ile Ala Asn Asp Val Ala Lys Tyr Phe Ala Ile Ile Pro
 580 Ala Ala Phe Ala Ala Thr Tyr Pro Gn Leu Asn Xaa Leu Asn Xaa Met
 595 Xaa Leu His Ser Pro Xaa Ser Ala Ile Leu Ser Ala Val Ile Phe Asn
 610 Ala Leu Xaa Ile Val Phe Leu Ile Pro Leu Ala Leu Lys Gly Val Ser
 625 Tyr Xaa Pro Leu Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Leu Arg Arg Asn Leu Xaa Ile
 645 Tyr Gly Leu Gly Gly Leu Leu Val Pro Phe Xaa Gly Ile Lys Xaa Ile
 660 Asp Xaa Leu Leu Xaa Xaa Xaa Gly Xaa
 675 680

5 <210> 59
 <211> 189

ES 2 631 360 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> secuencia consenso de KdpC de P. anantis y E. coli

<220>
 <221> variation

10 <222> 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 28, 30, 32, 33, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 60, 61, 62, 66, 73,
 74, 75, 80, 83, 89, 93, 97, 98, 100, 107, 111, 113, 114, 115, 123, 130, 131, 133, 135, 138, 141, 144, 146, 149,
 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 159, 160, 161, 162, 163, 165, 168, 169, 170, 173, 175, 178, 178, 179, 180,
 186, 187, 188, 189

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15 <400> 59

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Microorganismo *Pantoea ananatis* modificado que presenta la capacidad de producir ácido L-glutámico y ha sido modificado de manera que el sistema ATPasa de tipo P (*kdp*) que transporta potasio, codificado por el operón *kdp*, esté aumentado en comparación con una cepa sin modificar, en el que el sistema *kdp* se aumenta de manera que se aumente la actividad de ATPasa de tipo P del microorganismo, incrementando la expresión de dicho operón *kdp* o uno o más genes que constituyen dicho operón *kdp*, y/o incrementando la traducción de dicho operón *kdp* o de dichos genes, incrementando el número de copias de dicho operón *kdp* o uno o más de dichos genes, o modificando una secuencia de control de la expresión de dicho operón.
- 10 2. Microorganismo según la reivindicación 1, en el que el operón *kdp* contiene por lo menos los genes *kdpA*, *kdpB* y *kdpC*.
- 15 3. Microorganismo según la reivindicación 2, en el que el gen *kdpA* es un gen que codifica una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº 2 u 8 o la subunidad A del sistema *kdp* que presenta la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 u 8 incluyendo sustituciones, eliminaciones, inserciones o adiciones de uno a 20 restos de aminoácidos.
- 20 4. Microorganismo según la reivindicación 2 o 3, en el que el gen *kdpB* es un gen que codifica una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº 3 o 9 o la subunidad B del sistema *kdp* que presenta una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 3 o 9 incluyendo sustituciones, eliminaciones, inserciones o adiciones de uno a 20 restos de aminoácidos.
- 25 5. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el gen *kdpC* es un gen que codifica una proteína que presenta la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID nº 4 o 10 o la subunidad C del sistema *kdp* que presenta una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4 o 10 incluyendo sustituciones, eliminaciones, inserciones o adiciones de uno a 20 restos de aminoácidos.
- 30 6. Microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el operón *kdp* es un ADN definido en cualquiera de los (a) a (d) siguientes:
- (a) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de los números de nucleótido 546 a 4871 de SEC ID nº 1,
- 35 (b) un ADN que codifica el sistema *kdp* e hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de (a) o con una sonda, que se ha preparado a partir de dicha secuencia de nucleótidos,
- (c) un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de los números de nucleótido 543 a 4853 de SEC ID nº 7,
- 40 (d) un ADN que codifica el sistema *kdp* e hibrida en condiciones rigurosas con la secuencia de nucleótidos de (c) o con una sonda, que se ha preparado a partir de dicha secuencia de nucleótidos.
- 45 7. Procedimiento para producir ácido L-glutámico que comprende cultivar el microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en un medio para producir y acumular ácido L-glutámico en el medio o las células y recoger el ácido L-glutámico del medio o de las células.

Fig. 1

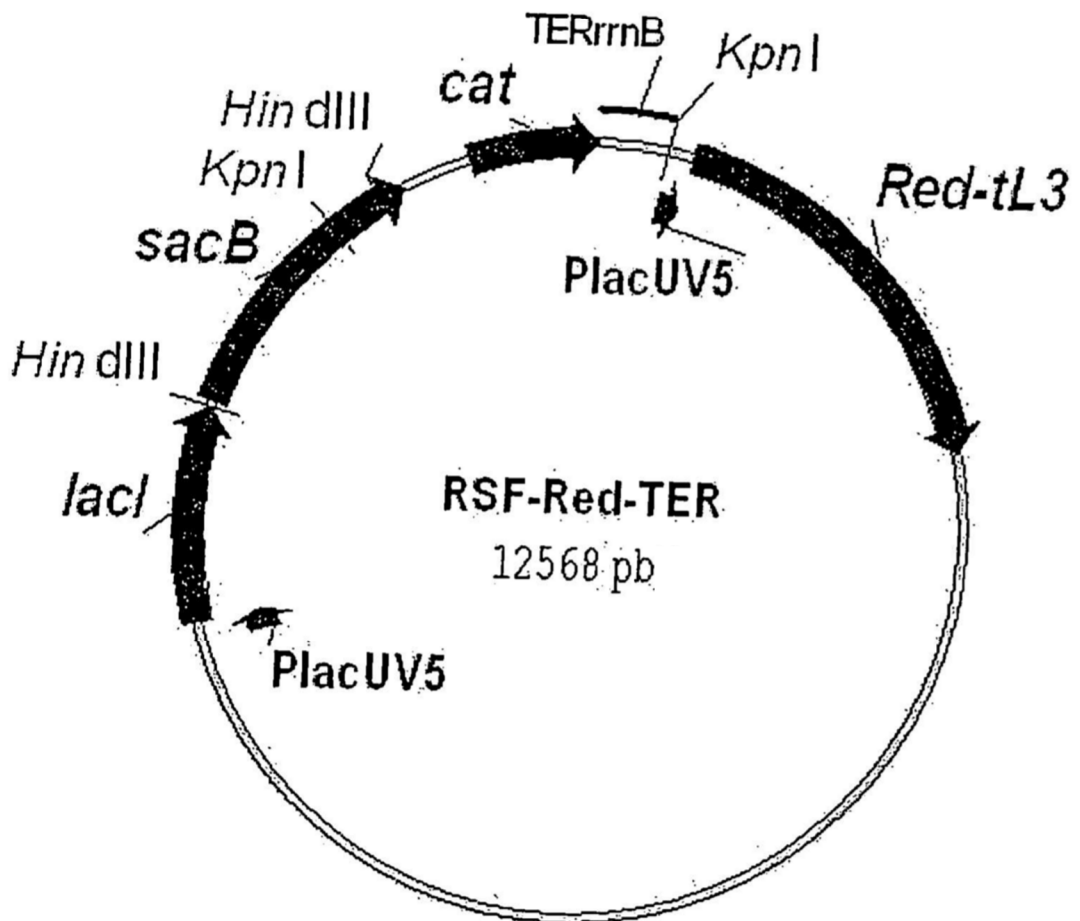


Fig. 2

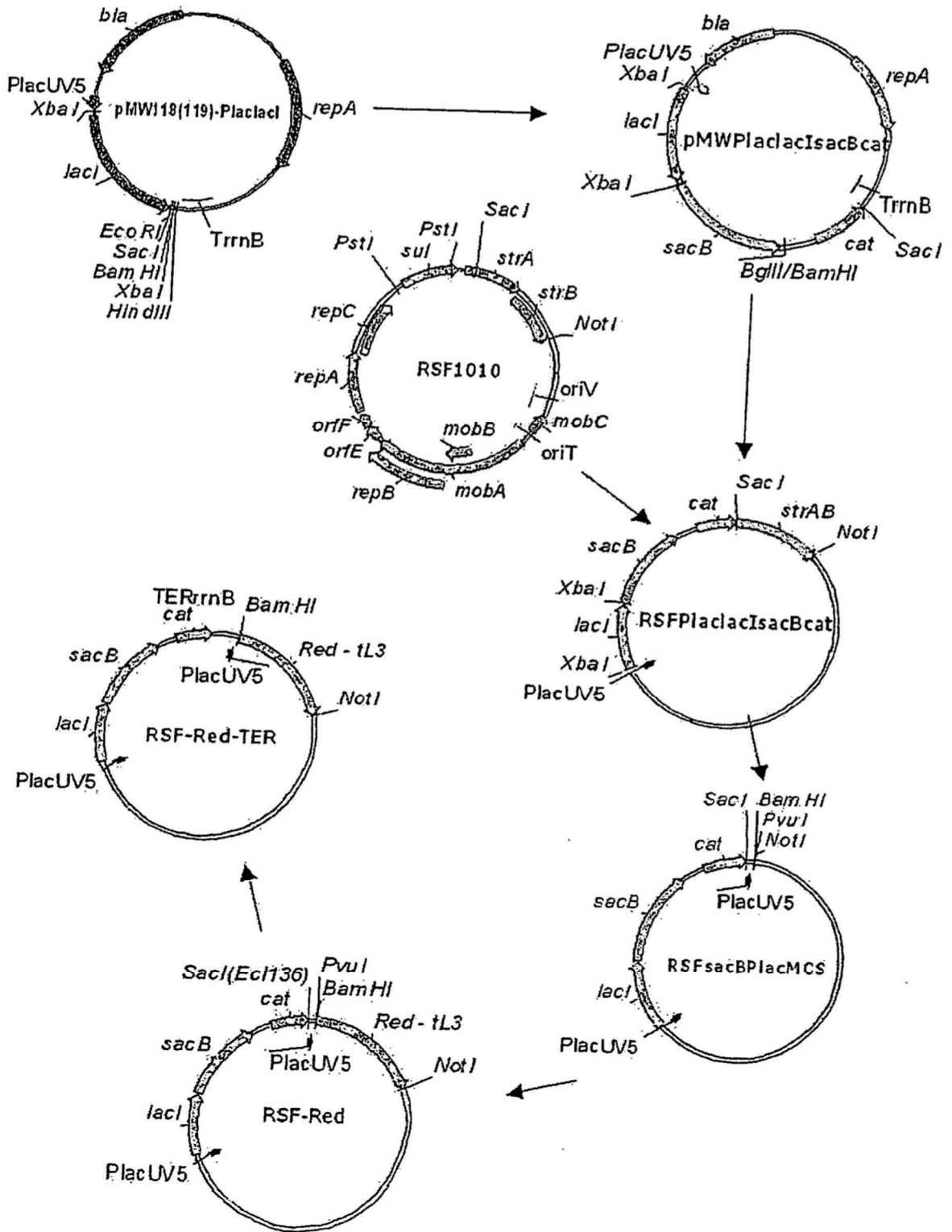


Fig. 3

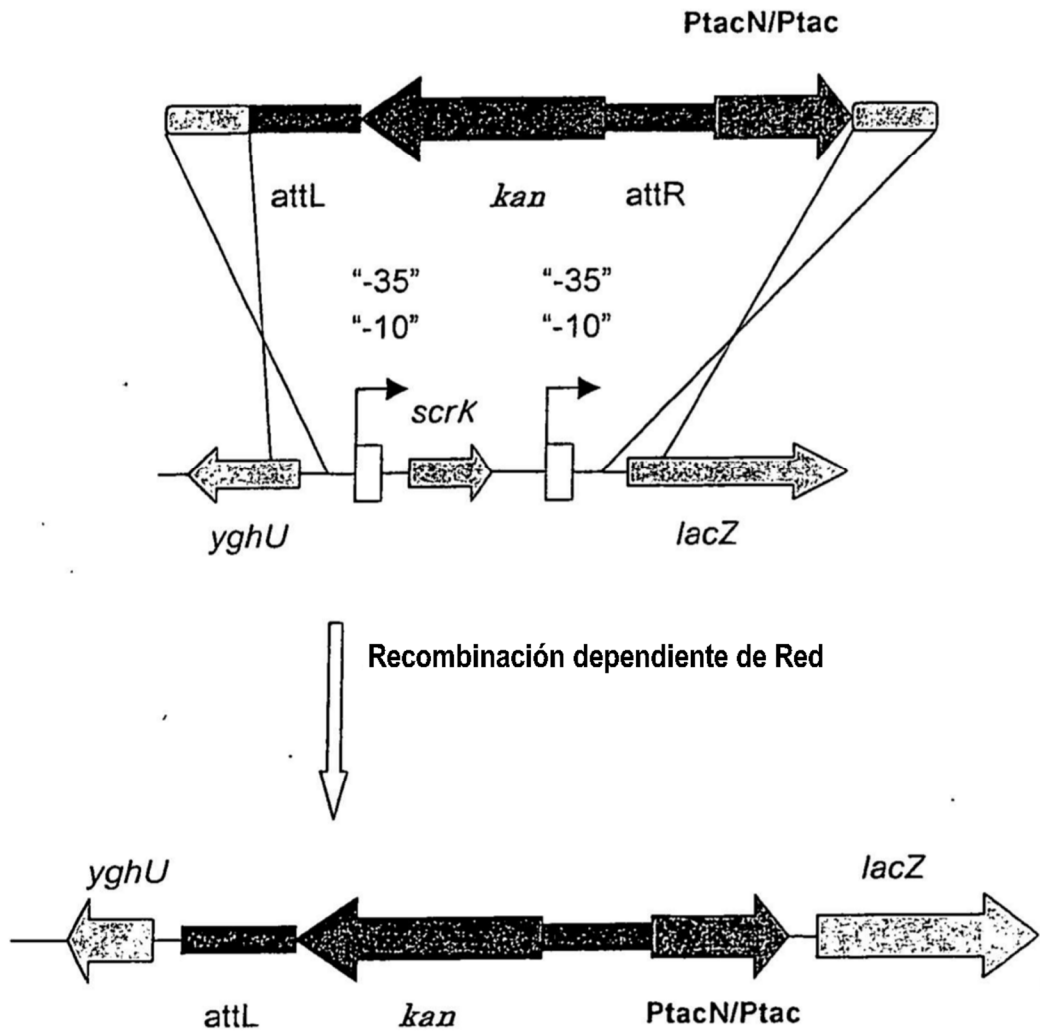


Fig. 4

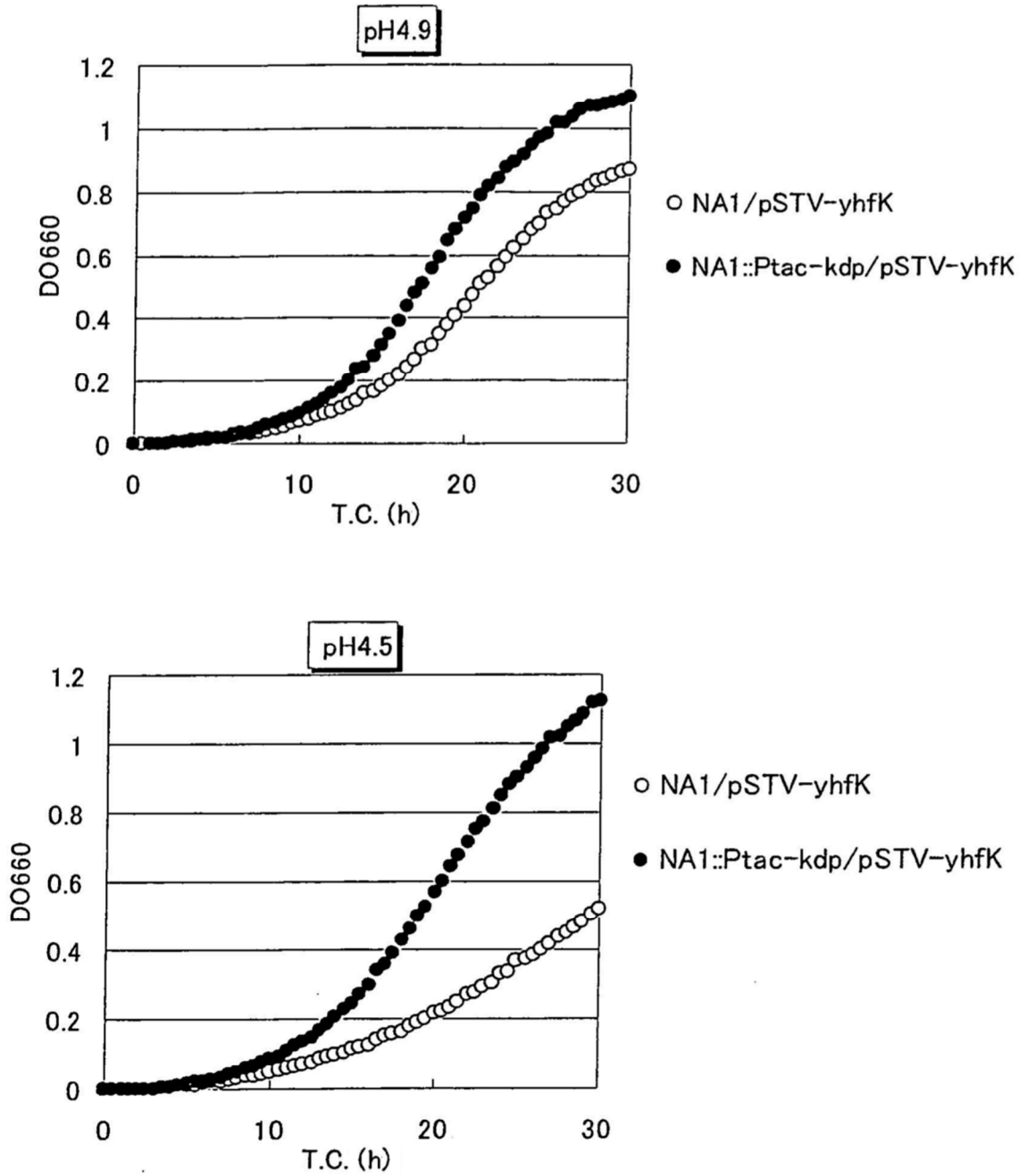


Fig. 5

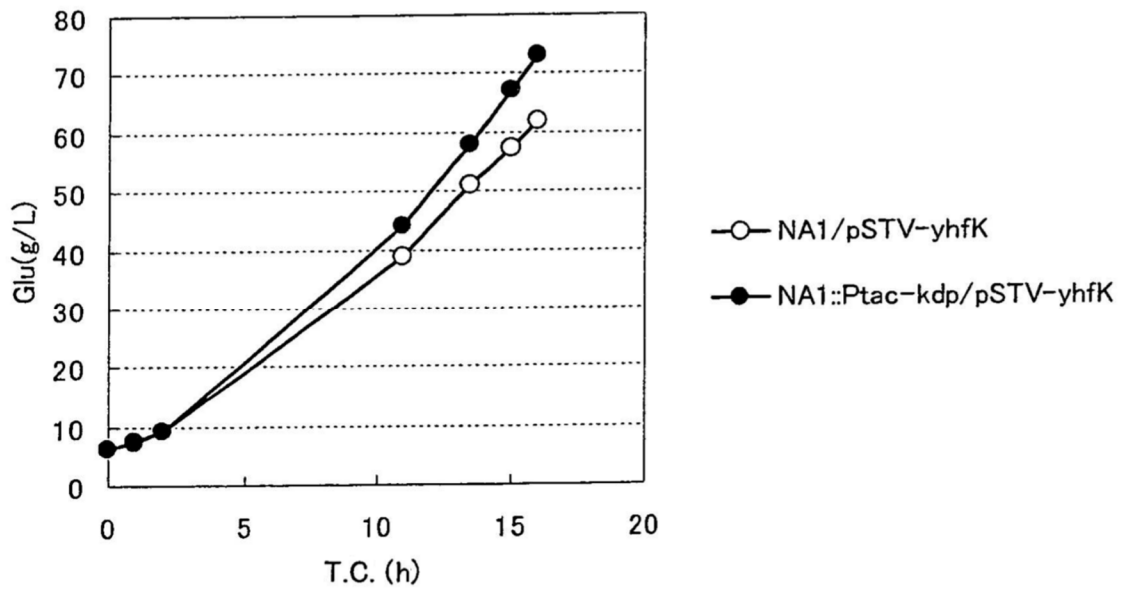
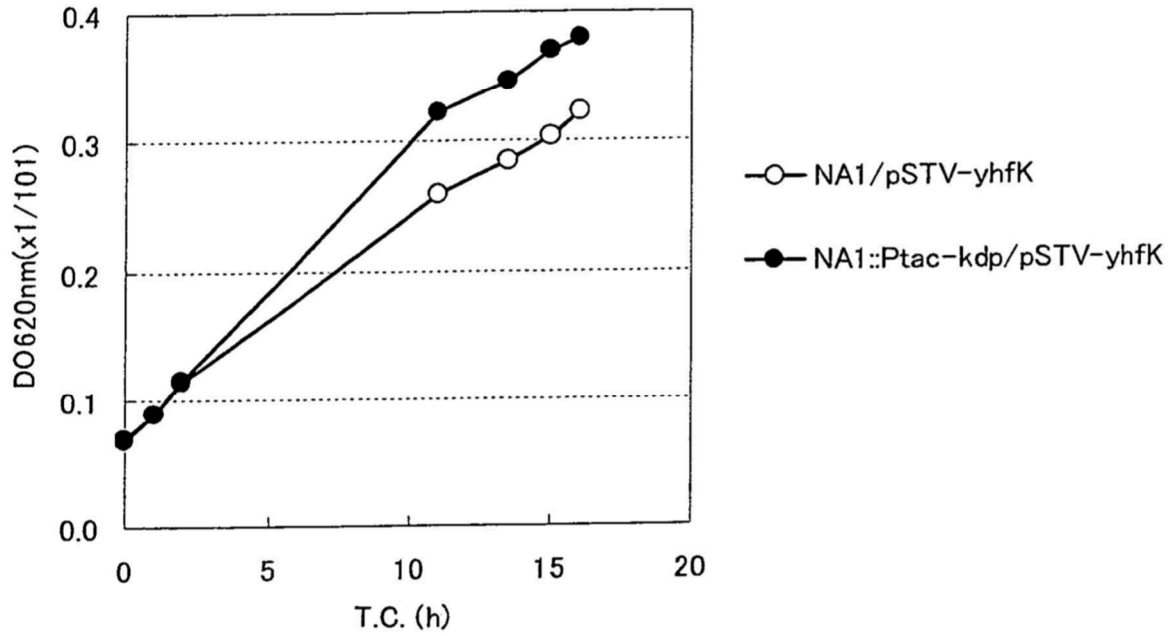


Fig. 6

		1	50
KdpA_P. ananatis	(1)	MAANAFLLIAVYLLLLMVAQPLGRGLAALVADKPLFAR--AEALLWRFS	
KdpA_E. coli	(1)	MAAQGFLLIATFLLVLMVLARPLGSGLARLINDIPLPGTTGVERVLFRAL	
Consenso		MAAXFLLIAXLLXLMVXAXPLGXGLAXLXXDXPLXXXXXXEXLXRX	
		51	100
KdpA_P. ananatis	(49)	GVQEGGMRWQHYYLLAILVFNLLGFVLLAILMFQGalPLNPQHLPGLSWD	
KdpA_E. coli	(51)	GVSDREMNWQYLCAILGLNMLGLAVLFFMLLGGHYLPLNPQQLPGLSWD	
Consenso		GVXXXMXWXXYLXAILXXNLGXVVLXXXLXXQXXLPLNPQXLPGLSWD	
		101	150
KdpA_P. ananatis	(99)	LALNTAISFVTNTNWQSYAGESTLSYFSQMVGLTVQNfVSAATGIAVAFa	
KdpA_E. coli	(101)	LALNTAVSFVTNTNWQSYSGETTLsYFSQmAGLTVQNfLSAASGIAVIFa	
Consenso		LALNTAXSFVTNTNWQSYGEXTLSYFSQmXGLTVQNfXSAAXGIAVXFA	
		151	200
KdpA_P. ananatis	(149)	LIRGFANRSVATLGNawRDLTRITLYVLLPISLLMAlFFVsqGSIQnFLP	
KdpA_E. coli	(151)	LIRAFTRQSMSTLGNawVDLLRITLWVLPVALLIALFFIQQGalQnFLP	
Consenso		LIRXFXXSXXTLGNawDXLXRI TLXVLPXXLLXALFFXXGXQnFLP	
		201	250
KdpA_P. ananatis	(199)	YHNvTSLEGAQQTLAMGPVAsQEAIKMLGTNGGGFFNVNSAHPFENPTAL	
KdpA_E. coli	(201)	YQAVNTVEGAQQLLPMGPVAsQEAIKMLGTNGGGFFNANSSHPFENPTAL	
Consenso		YXXVXXXEGAQQXLXMGpVAsQEAIKMLGTNGGGFFNXSHPFENPTAL	
		251	300
KdpA_P. ananatis	(249)	SNFVQMLsIFLIPAAALCFaFGESVkdRRRQGSMLLWSMTLMFVVAALVMW	
KdpA_E. coli	(251)	TNFVQMLAIFLIPTALCFaFGEVMGDRRQGRMLLWAMSVIFVICVGVVMW	
Consenso		XNFVQMLXIFLIPXALCFaFGEXXXDRRQGXMLLWXMXXFVXXXXVMW	
		301	350
KdpA_P. ananatis	(299)	AELRGnPHFLTLGADSAINMEGKETRFgILNSSLFAVITTAASCGAVNAM	
KdpA_E. coli	(301)	AEVQGNPHLLALGTDSINMEGKESRFGLVSSSLFAVVTAAASCGAVIAM	
Consenso		AEXXGNPHXLXLGXDSXINMEGKEXRFGLXSSSLFAVXTTAASCGAVXAM	
		351	400
KdpA_P. ananatis	(349)	HDSFTALGGMVPMLLQlGEVVFgGvGAGLYGMLLfvLLAVFIAGLMIGR	
KdpA_E. coli	(351)	HDSFTALGGMVPWMLMQlGEVVFgGvGSGLYGMMLfvLLAVFIAGLMIGR	
Consenso		HDSFTALGGMVPXMLMQXGEVVFgGvGXLYGMXLFvLLAVFIAGLMIGR	
		401	450
KdpA_P. ananatis	(399)	TPEFLGKKIDVWEMKMTALAILVTPALVLIgTAIAMMTDAGRAGMANPGT	
KdpA_E. coli	(401)	TPEYLGKKIDVREMKLtALAILVTPtLVLMGAALAMMTDAGRSAMLNPGP	
Consenso		TPEXLGKKIDVXEMKXTALAILVTPXLVLXGXAXAMMTDAGRXXMXNPGX	
		451	500
KdpA_P. ananatis	(449)	HGFSEVLYAVSSAANNNGSAFAGLNANTPFWNLLLAVCMFVGRFGIIPV	
KdpA_E. coli	(451)	HGFSEVLYAVSSAANNNGSAFAGLSANSPFWNCLLAFCMFVGRFGVIIPV	
Consenso		HGFSEVLYAVSSAANNNGSAFAGLXANXPFWNXLLAXCMFVGRFGXIIPV	
		501	550
KdpA_P. ananatis	(499)	MAIAGAMAVKKVQpVGNGLPthGpLFIALLVgTVLLVgALTFIPALALG	
KdpA_E. coli	(501)	MAIAGSLVSKKSQAASSGTLpthGpLfvGLLIGTVLLVgALTFIPALALG	
Consenso		MAIAGXXXXKXQXXXXGTLpthGpLFXLLXGTVLLVgALTFIPALALG	
		551	562
KdpA_P. ananatis	(549)	PVAEHLQLIQGG	
KdpA_E. coli	(551)	PVAEYLS	
Consenso		PVAEXLX	

Fig. 7

KdpB_P. ananatis	(1)	1	50
KdpB_E. coli	(1)	MSR-QQQVFDAALLRTSAIDAVKKLDPRVQFRNPVMFVVYLGSIILTSILA	
Consenso		MSRXQXXXFXXXLXXXXXXXXAVKKLXPXXQRNPVMFVXXGSXLTXXX	
KdpB_P. ananatis	(50)	51	100
KdpB_E. coli	(51)	IMMFTGHQSGSASFTGAIALWLWFTVLFANMAEALAEGRSKAQANSLKGV	
Consenso		IAMASGAMPGNALFSAAISGWLWITVLFANFAEALAEGRSKAQANSLKGV	
KdpB_P. ananatis	(100)	101	150
KdpB_E. coli	(101)	KKTSFAKKLSAAHYGAAWQQVAADALRKGDAVLVEAGDVIPCDGEVVEGG	
Consenso		KKTAFARKLREPKYGAAADKVPADQLRKGDIVLVEAGDIIPCDGEVIEGG	
KdpB_P. ananatis	(150)	151	200
KdpB_E. coli	(151)	ASVDESAITGESAPVIRESGGFASVTGGTRILSDWLVI TCSANPGETFL	
Consenso		ASVDESAITGESAPVIRESGGFASVTGGTRILSDWLVI XCSXNPGETFL	
KdpB_P. ananatis	(200)	201	250
KdpB_E. coli	(201)	DRMIAMVEGAQRRKTPNEIALTILLVSLTIVFLLATVTLWPFSAWGGTPV	
Consenso		DRMIAMVEGAQRRKTPNEIALTILLIALTIVFLLATATLWPFSAWGGNAV	
KdpB_P. ananatis	(250)	251	300
KdpB_E. coli	(251)	TITVLVALLVCLIPPTTIGGLLSAIGVAGMSRMLGANVIATSGRAVEAAGD	
Consenso		XXTVLVALLVCLIPPTTIGGLLSAIGVAGMSRMLGANVIATSGRAVEAAGD	
KdpB_P. ananatis	(300)	301	350
KdpB_E. coli	(301)	VDVLM LDKTGTITLGNRQATQFLPAPGVTEEQLADAAQLASLADETP EGR	
Consenso		VDVLL LDKTGTITLGNRQASEFIPAQGVDEKTLADAAQLASLADETP EGR	
KdpB_P. ananatis	(350)	351	400
KdpB_E. coli	(351)	SIVVLAKQKFNLRERDLSSMGASFIPFSAQTRMSGVNVQDR LIRKGA VDA	
Consenso		SIVILAKQRFNLRERDVQSLHATFVPFTAQSRMSG INIDNRMIRKGSVDA	
KdpB_P. ananatis	(400)	401	450
KdpB_E. coli	(401)	VRRHIEASHGAFPAE VNRVEEVARAGGTPLVVAEGAKVLGVVALKDIVK	
Consenso		IRRHVEANGGHFPTD VQKVDQVARQGATPLVVVEGSRVLGVIALKDIVK	
KdpB_P. ananatis	(450)	451	500
KdpB_E. coli	(451)	GGIKERFAELRKMGIKTVMITGDNPLTAAAI AAEAGVDDFLSEATPEAKL	
Consenso		GGIKERFAQLRKMGIKTVMITGDNRLTAAAI AAEAGVDDFLAEATPEAKL	
KdpB_P. ananatis	(500)	501	550
KdpB_E. coli	(501)	ALIRQYQAEGRLVAMTGDGTNDAPALAQADVAVAMNSGTQAAKEAGNMVD	
Consenso		ALIRQYQAEGRLVAMTGDGTNDAPALAQADVAVAMNSGTQAAKEAGNMVD	
KdpB_P. ananatis	(550)	551	600
KdpB_E. coli	(551)	LDSNPTKLLLEV VHI GKQMLMTRGSLTTFSIANDVAKYFAIIPAAFAATYP	
Consenso		LDSNPTKLLIEV VHI GKQMLMTRGSLTTFSIANDVAKYFAIIPAAFAATYP	
KdpB_P. ananatis	(600)	601	650
KdpB_E. coli	(601)	QLNMLNVMQLHSPASAILS AVIFNALIVFLIPLALKGVSYRPLSAASLL	
Consenso		QLNALNIMCLHSPDSAILS AVIFNALIIVFLIPLALKGVSYKPLTASAML	
KdpB_P. ananatis	(650)	651	683
KdpB_E. coli	(651)	RRNLLIYGLGGLLV PFGIKVIDMLLVLSGMA	
Consenso		RRNLWIYGLGGLLV PFIGIKVIDLLTVCGLV	
		RRNLXIYGLGGLLV PFXGIXIXLXXXGX	

Fig. 8

		1	50
KdpC_P. ananatis	(1)	MSQLRPAIFLLLLLTVVCGVVYPLTTGLSOLLFPWQANGSVLNVDGEER	
KdpC_E. coli	(1)	MSGLRPALSTFIFLLLITGGVYPLTTVLGQWWFPWQANGSLIREGDTVR	
Consenso		MSXLRPAXXXXXLXXXXGXVYPLTTXLXQXXFPWQANGSXXXXXXXXR	
		51	100
KdpC_P. ananatis	(51)	GSALIGQNFSQPGYFWGRPSATGDKPYNPLASSGSNLAASNPAIDKAVAE	
KdpC_E. coli	(51)	GSALIGQNFTGNGYFHGGRPSATAEMPYNPQASGGSNLAVSNPELDKLIAA	
Consenso		GSALIGQNFXXXGYFXGRPSATXXXPYNPXASXGSNLAXSNPXLDKXXXA	
		101	150
KdpC_P. ananatis	(101)	RVAALRTANPQANGAVPVELVTTSASGLDPEISPEAALWQAPRIAAARQL	
KdpC_E. coli	(101)	RVAALRAANPDASASVPVELVTASASGLDNNITPQAAAWQIPRVAKARNL	
Consenso		RVAALRXANPXAXXXVPVELVTXSASGLDXXIXPAXXWQXPRXAXARXL	
		151	191
KdpC_P. ananatis	(151)	PLAKVDALVDSMTQRPLLPFIGEPTVNVLQLNLALNDLK	
KdpC_E. coli	(151)	SVEQLTQLIAKYSQQPLVKYIGQPVVNIVELNLALDKLDE	
Consenso		XXXXXXXXLXXXXXQXPLXXXIGXPXVNXNXXLNLALXXLX	