

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 650**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)
C12P 13/10 (2006.01)
C12P 13/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05811360 .6**
96 Fecha de presentación: **25.11.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1814987**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **BACTERIA PRODUCTORA DE L-AMINOÁCIDOS Y PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR L-AMINOÁCIDOS.**

30 Prioridad:
25.11.2004 JP 2004340187

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.03.2012

73 Titular/es:
AJINOMOTO CO., INC.
15-1 KYOBASHI 1-CHOME, CHUO-KU
TOKYO 104-8315, JP

72 Inventor/es:
Fukui, Keita;
Nakamura, Jun y
Kojima, Hiroyuki

74 Agente: **Fúster Olaguibel, Gustavo Nicolás**

ES 2 375 650 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).

DESCRIPCION

Bacteria productora de L-aminoácidos y procedimiento para producir L-aminoácidos

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir L-aminoácidos generados por ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio durante la fermentación de bacterias corineformes, particularmente los L-aminoácidos L-ácido glutámico, L-arginina, L-glutamina, L-prolina, L-valina, L-alanina y L-lisina.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 Un L-aminoácido, tal como el ácido glutámico, se genera por ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio, y convencionalmente se ha producido a escala industrial mediante procedimientos de fermentación utilizando bacterias corineformes, incluyendo *Brevibacterium* y *Corynebacterium*, que tienen la capacidad de producir L-aminoácidos. Para mejorar la productividad L-aminoácidos de bacterias corineformes, se han usado cepas aisladas de mutantes naturales o artificiales de las mismas (documentos JP07-121228B, JP07-121228B, JP06-237779A, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2003; 79: 59-112. J. Biotechnol. 4 de sep. de 2003; 104(1-3): 155-72 y WO95/34672).

15 Cuando se cultivan bacterias aeróbicas, especialmente bacterias corineformes, en condiciones limitadas de oxígeno, se acumulan ácidos orgánicos distintos de la sustancia diana, tales como ácido láctico y ácido acético, en cantidades en exceso en forma de subproductos. Dicha acumulación inhibe el crecimiento de las bacterias y reduce en gran medida su productividad durante la fermentación. Además, son necesarias cantidades en exceso de contraiones que neutralicen dichos ácidos orgánicos, lo que aumenta el coste de producción. Por consiguiente, se ha deseado la creación de cepas que produzcan menos ácido acético durante el cultivo, tales como cepas en las que se reduce o elimina la actividad de una enzima que cataliza la producción de ácido acético.

20 Los ejemplos de un procedimiento de fermentación que usa una cepa en la que se reduce o elimina la actividad de una enzima que cataliza la producción de ácido acético incluyen la producción de L-aminoácidos usando *Escherichia coli* que es deficiente en actividades de fosfoacetiltransferasa (pta) y lactato deshidrogenasa (ldh) (documento WO99/06532), la producción de L-aminoácidos usando la familia *Enterobacteriaceae* que es deficiente en actividad de piruvato oxidasa (poxB), y la producción de D-ácido pantoteico usando *Enterobacteriaceae* que es deficiente en la actividad de piruvato oxidasa (poxB) (documento WO02/36797).

25 Se han reseñado acetato cinasa (ack) y fosfotransacetilasa (pta) como enzimas que están implicadas en la asimilación del ácido acético en bacterias corineformes (Microbiology, feb. de 1999; 145(Pt2): 503-13). Además, se ha reseñado una bacteria corineforme en la que está alterada la enzima productora de acetato piruvato oxidasa (poxB) (documento EP1096013A).

30 La acetil-CoA hidrolasa es una enzima (3.1.2.1) que produce ácido acético a partir de acetil-CoA y H₂O, y se ha dado a conocer la secuencia nucleotídica predicha que codifica acetil-coA hidrolasa de *Corynebacterium glutamicum* (documento EP1108790A). Sin embargo, no se ha reseñado el análisis de clonación y expresión real del gen; y por lo tanto la función real del gen no se ha confirmado todavía.

35 DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Es un objeto de la presente invención proporcionar una bacteria corineforme que tenga una capacidad mejorada para producir L-aminoácidos que se generan por ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio, y proporcionar un procedimiento para producir de forma eficaz los L-aminoácidos que se han mencionado anteriormente usando una bacteria de este tipo.

40 Los inventores de la presente invención han estudiado extensamente para conseguir los objetos que se han mencionado anteriormente. Como resultado, descubrieron que disminuyendo la actividad de acetil-CoA hidrolasa en una bacteria corineforme, aumenta la capacidad para producir L-aminoácidos, particularmente L-ácido glutámico, L-valina y L-alanina, y realizaron de esta manera la presente invención.

45 Es un objeto de la presente invención proporcionar una bacteria corineforme que tenga capacidad de producir L-aminoácidos, en la que dicha bacteria corineforme se modifica para que la actividad de acetil-CoA hidrolasa disminuya en comparación de una cepa de tipo natural o no modificada como resultado de una mutación en la región codificante o una región reguladora de la expresión de un gen cromosómico de acetil-CoA hidrolasa, o como resultado de la alteración del gen cromosómico de acetil-CoA hidrolasa, y en la que dicho L-aminoácido es uno o más L-aminoácidos generados por una ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio, en la que dicho gen de acetil-CoA hidrolasa se selecciona entre el grupo que consiste en:

50 (A) un gen que comprende los nucleótidos 1037 a 2542 de la SEQ ID NO: 23; y

(B) un ADN que puede hibridar en condiciones rigurosas con polinucleótido que comprende los nucleótidos 1037 a 2542 de la SEQ ID NO: 23, y que codifica una proteína que tiene actividad de acetil-CoA hidrolasa.

55 Es un objeto más de la presente invención proporcionar la bacteria corineforme como se ha descrito anteriormente, en la que dicha acetil-CoA hidrolasa se selecciona entre el grupo que consiste en:

(A) Una proteína que comprende una secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 24; y

(B) Una proteína que comprende una secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 24, con lo que uno o varios aminoácidos en dicha proteína se sustituyen, eliminan, insertan o añaden, y en la que dicha proteína tiene actividad de acetil-CoA hidrolasa.

5 Es un objeto más de la presente invención proporcionar la bacteria corineforme como se ha descrito anteriormente, en la que dicha bacteria corineforme se modifica adicionalmente para aumentar la actividad de glutamato deshidrogenasa mediante transformación con un plásmido que contiene un gen que codifica glutamato deshidrogenasa; integrando dicho gen en un cromosoma por recombinación homóloga, conjugación o transposición, o introduciendo una mutación en una región promotora de dicho gen o sustituyendo por un promotor fuerte.

Es un objeto más de la presente invención proporcionar la bacteria corineforme como se ha descrito anteriormente, en la que dicho L-aminoácido es uno o más L-aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en L-ácido glutámico, L-arginina, L-glutamina, L-prolina, L-alanina, L-valina y L-lisina.

10 Es un objeto más de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir un L-aminoácido que comprende: cultivar la bacteria corineforme como se ha descrito anteriormente en un medio, y recoger el L-aminoácido del medio, y en el que dicho L-aminoácido es uno o más L-aminoácidos generados a través de ácido pirúvico como intermedio.

15 Es un objeto más de la presente invención proporcionar el procedimiento que se ha descrito anteriormente, en el que dichos L-aminoácidos son uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en L-ácido glutámico, L-arginina, L-glutamina, L-prolina, L-alanina, L-valina y L-lisina.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un esquema que muestra el procedimiento de la construcción del plásmido pBS3.

La Fig. 2 es un esquema que muestra el procedimiento de la construcción del plásmido pBS4.

La Fig. 3 es un esquema que muestra el procedimiento de la construcción del plásmido pBS5T.

20 La Fig. 4 es un esquema que muestra el procedimiento de la construcción del plásmido $\Delta dh56-1$.

La Fig. 5 es un esquema que muestra el procedimiento de construir el plásmido pBS4S:: Δach .

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

En lo sucesivo en este documento, se describirán en detalle realizaciones de la presente invención.

25 <1> Bacteria corineforme que tiene la capacidad de producir L-aminoácidos generados por ruta sintética usando ácido pirúvico como intermedio

En la presente invención, los ejemplos de bacteria corineforme incluyen una bacteria corineforme convencional, y también incluyen bacterias que se habían clasificado en el género *Brevibacterium*, pero que actualmente se clasifican en el género *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991)), así como bacterias *Brevibacterium* que están muy cercanas a las bacterias *Corynebacterium*. Los ejemplos de dicha bacteria corineforme incluyen los siguientes:

30 *Corynebacterium acetoacidophilum*

Corynebacterium acetoglutamicum

Corynebacterium alkanolyticum

Corynebacterium callunae

Corynebacterium glutamicum

35 *Corynebacterium lilium*

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogenes (*Corynebacterium efficiens*)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum

40 *Brevibacterium flavum*

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

45 *Brevibacterium thiogenitalis*

Brevibacterium ammoniagenes

Brevibacterium album

Brevibacterium cerinum

Microbacterium ammoniaphilum

Son ejemplos específicos de bacteria corineforme los que se indican a continuación.

- 5 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium alkanolyticum ATCC21511
Corynebacterium callunae ATCC15991
Corynebacterium glutamicum ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060, ATCC13869
- 10 *Corynebacterium lilium* ATCC15990
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes AJ12340 (FERM BP-1539)
Corynebacterium herculis ATCC13868
Brevibacterium divaricatum ATCC 14020
- 15 *Brevibacterium flavum* ATCC13826, ATCC14067, AJ12418 (FERM BP-2205) *Brevibacterium immariophilum* ATCC14068
Brevibacterium lactofermentum (Corynebacterium glutamicum) ATCC13869
Brevibacterium roseum ATCC13825
Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066
- 20 *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC19240
Brevibacterium ammoniagenes ATCC6871, ATCC6872
Brevibacterium album ATCC15111
Brevibacterium cerinum ATCC 15112
Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354
- 25 Estas cepas están disponibles en la Colección de cultivos tipo estadounidense "American Type Culture Collection" (ATCC, dirección: código postal 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos de América). Es decir, a cada cepa se le da en un número de registro único que se enumera en el catálogo de la ATCC. Las cepas pueden ordenarse usando este número de registro. La cepa AJ12340 se depositó en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, Ministerio de Comercio e Industria Internacional "National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry" (actualmente Depositario del Organismo Internacional de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Avanzada "International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology" en Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-5466, Japón) el 27 de octubre de 1989 según las disposiciones del tratado de Budapest y se le dio el número de acceso FERM BP-1539. La cepa AJ12418 se depositó en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, Ministerio de Comercio e Industria Internacional "National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry" el 5 de enero de 1989 según las disposiciones del tratado de Budapest y se le dio el número de acceso FERM BP-2205.
- 30 "L-Aminoácidos generados por ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio" significa preferiblemente aquellos que tienen estructuras de carbono derivadas de ácido pirúvico. Los ejemplos de dichos L-aminoácidos incluyen L-ácido glutámico, L-arginina, L-glutamina, L-prolina, L-alanina, L-valina y L-lisina. Como se usa en este documento, "la capacidad para producir L-aminoácidos por ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio" se refiere a la capacidad de las bacterias corineformes de la presente invención de causar la acumulación de uno o más de los L-aminoácidos que se han mencionado anteriormente en un medio cuando se cultivan en el medio.
- 35 La capacidad para producir L-aminoácidos puede ser una capacidad original de una cepa de tipo natural de bacteria corineforme o una capacidad que se ha conferido mediante crianza. Además, la capacidad para producir L-aminoácidos puede conferirse mediante una modificación que da como resultado un descenso en la actividad de acetil-CoA hidrolasa, como se describe posteriormente.
- 40 Para conferir la capacidad de producir L-aminoácidos, pueden usarse procedimientos convencionales que se han usado en la crianza de bacterias corineformes, tal como la creación de cepas mutantes de regulación metabólica, o la creación de cepas recombinantes que tienen actividad potenciada de enzimas biosintéticas de sustancias diana
- 45
- 50

("Amino Acid Fermentation", Center for Academic Publications Japan Co., Ltd., 1ª ed. publicada el 30 de mayo de 1986, pág. 77 a 100). En estos procedimientos, la introducción de una mutación de regulación metabólica, y la potenciación de las enzimas biosintéticas de sustancia diana pueden usarse en solitario o en combinación. Además, pueden introducirse dos o más mutaciones, y pueden potenciarse dos o más actividades enzimáticas.

5 Un ejemplo de un procedimiento para conferir capacidad de producir L-ácido glutámico es potenciar la expresión de un gen que codifica una enzima biosintética de L-ácido glutámico. Los ejemplos de las enzimas que están implicadas en la biosíntesis de L-ácido glutámico incluyen glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa, glutamato sintetasa, isocitrato deshidrogenasa, aconitato hidratasa, citrato sintasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, piruvato carboxilasa, piruvato deshidrogenasa, piruvato cinasa, fosfoenolpiruvato sintasa, enolasa, fosfogliceromutasa, fosfoglicerato cinasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, fructosa biofosfato aldolasa, fosfofructo cinasa y glucosa fosfato isomerasa.

10 Puede conseguirse potenciar la expresión de estos genes insertando un fragmento de ADN que contiene un gen de este tipo en un plásmido apropiado que pueda replicarse de forma autónoma en la bacteria corineforme, y transformando las células bacterianas con el plásmido resultante; integrando un gen de este tipo en un cromosoma mediante recombinación homóloga, conjugación, transposición (documentos EP0756007B, EP0332488A, EP0771879A), etc.; o introduciendo una mutación en una región promotora de un gen de este tipo (documento WO/0018935) o sustituyendo por un promotor fuerte.

15 Cuando los genes que se han mencionado anteriormente se introducen mediante un plásmido o se integran en un cromosoma, puede ser un promotor para la expresión de los genes cualquier promotor, siempre que pueda funcionar en la bacteria corineforme. Los ejemplos de dichos promotores incluyen promotor lac, promotor trp, promotor trc, promotor PS2 y promotor pL. También puede usarse un promotor nativo para cada gen.

20 Los ejemplos de microorganismos modificados para que se potencie la expresión del gen citrato sintetasa, el gen fosfoenolpiruvato carboxilasa y/o el gen glutamato deshidrogenasa incluyen los microorganismos dados a conocer en los documentos JP2001-333769A (EP1078989A), JP2000-106869A (EP955368A), JP2000-189169A (EP952221A) y JP2001-333769A (EP1078989A).

25 La modificación para conferir la capacidad de producir L-ácido glutámico incluye también disminuir o eliminar una actividad de una enzima que cataliza la síntesis de un compuesto distinto de L-ácido glutámico, y la ramificación a partir de una ruta de biosíntesis de L-ácido glutámico. Los ejemplos de dichas enzimas incluyen isocitrato liasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa, fosfotransacetilasa, acetato cinasa, acetohidroxiácido sintasa, acetolactato sintasa, formiato acetiltransferasa, lactato deshidrogenasa y glutamato descarboxilasa.

30 Para disminuir o eliminar la actividad de las enzimas que se han descrito anteriormente, puede introducirse una mutación o delección que cause un descenso o pérdida de la actividad de las enzimas en los genes de las enzimas en el cromosoma. Esto puede conseguirse, por ejemplo, alterando un gen que codifica la enzima en el cromosoma, o modificando una secuencia de control de la expresión, tal como un promotor y/o una secuencia Shine Dargarno (SD) del gen. Además, las actividades de dichas enzimas pueden disminuirse o eliminarse introduciendo una mutación de aminoácido que cause una sustitución de aminoácidos, una mutación finalizadora que genere un codón de terminación o una mutación con desplazamiento de marco que añada o elimine uno o más nucleótidos en la región codificante, o eliminando una porción del gen (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)). Además, las actividades de dichas enzimas pueden disminuirse o eliminarse construyendo un gen que codifique una enzima mutante que tenga su región codificante eliminada y un gen cromosómico reemplazado por el gen resultante mediante recombinación homóloga. Los ejemplos de bacteria corineforme en los que la actividad de α -cetoglutarato deshidrogenasa disminuye incluyen las cepas dadas a conocer en los documentos JP7-834672A y JP06-237779.

35 Además, un ejemplo de un procedimiento para conferir la capacidad de producir L-ácido glutámico incluye un procedimiento para modificar una cepa para potenciar la expresión de un gen que codifica el gen yggB o para introducir la mutación en el gen yggB (NCgl 1221; NP_600492. Reports small-conductance... [gi: 19552490]) (Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 60/715131).

40 La capacidad de producir L-ácido glutámico también puede conferirse cribando una cepa resistente a análogos de ácidos orgánicos, inhibidores respiratorios o generadores de superóxido, o cribando una cepa sensible a inhibidores de la síntesis de la pared celular. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen conferir resistencia a benzopirona o naftoquinona (documento JP56-1889A), conferir resistencia a ácido monofluoracético (JP 50-113209A), conferir resistencia a adenina o timina (JP57-065198) conferir resistencia a HOQNO (JP56-140895A), conferir resistencia a α -cetomalónico (JP57-2689A), conferir resistencia a guanidina (JP56-35981 A), conferir resistencia a daunomicina (JP58-158192A) y conferir sensibilidad a la penicilina (JP04-88994A).

Los ejemplos específicos de dicha bacteria incluyen las siguientes cepas.

45 *Brevibacterium flavum* AJ3949 (FERM BP-2632; documento JP 50-113209A)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736; documento JP 57-065198A)

Brevibacterium flavum AJ11355 (FERM P-5007; documento JP56-1889A)

Corynebacterium glutamicum AJ11355 (FERM P-5020; documento JP56-1889A)

Brevibacterium flavum AJ11217 (FERM P-4318; documento JP57-2689A)

60 *Corynebacterium glutamicum* AJ11218 (FERM P-4319; documento JP57-2689A)

Brevibacterium flavum AJ11564 (FERM P-5472; documento JP56-140895A)

Brevibacterium flavum AJ11439 (FERM P-5136; documento JP56-35981A)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004; documento JP04-88994A)

Brevibacterium lactofermentum AJ11426 (FERM P5123; documento JP56-048890A)

5 *Corynebacterium glutamicum* AJ11440 (FERM P5137; documento JP56-048890A)

Brevibacterium lactofermentum AJ11796 (FERM P6402; documento JP58-158192A)

10 Un ejemplo de un procedimiento para conferir la capacidad de producir L-valina incluye un procedimiento de modificación de una cepa para potenciar la expresión de un gen que codifica una enzima biosintética de L-valina. Los ejemplos de una enzima biosintética de L-valina incluyen enzimas codificadas por un gen del operón *ilvBNC*, es decir, acetohidroxiácido sintetasa codificada por *ilvBN* e isómero reductasa codificada por *ilvC* (documento WO00/50624). El operón *ilvBNC* se somete a represión transcripcional mediante cualquier combinación de L-valina, L-isoleucina y L-leucina, de modo que es deseable liberar la atenuación para evitar la represión transcripcional por L-valina como producto.

15 Conferir la capacidad de producir L-valina a las bacterias corineformes puede realizarse disminuyendo o eliminando la actividad de al menos una enzima que cataliza una reacción que disminuye la producción de L-valina. Por ejemplo, la capacidad de producir L-valina puede conferirse disminuyendo la actividad de treonina deshidratasa, que cataliza la síntesis de L-leucina, o disminuyendo la actividad de una enzima que cataliza la síntesis de D-pantotenato (documento WO00/50624).

20 La capacidad de producir L-valina también puede conferirse impartiendo resistencia a los análogos de aminoácidos o similares a una bacteria corineforme.

25 Por ejemplo, pueden usarse cepas mutantes productoras de L-valina auxotróficas de L-isoleucina y L-metionina, y resistentes a D-ribosa, ribonucleósidos de purina o ribonucleósidos de pirimidina (FERM P-1841, FERM P-29, JP-B-53-025034), cepas mutantes productoras de L-valina resistentes a policetidas (FERM P-1763, FERM P-1764; JP-B006-065314), cepas mutantes productoras de L-valina resistentes a L-valina y sensibles a los análogos de ácido pirúvico, tales como, ácido β-fluoropirúvico (FERM BP-3006, BP-3007, Patente 3006929).

Los ejemplos de bacterias corineformes que tienen la capacidad de producir L-alanina incluyen bacterias corineformes deficientes en la actividad H⁺-ATPasa (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* nov. de 2001; 57(4): 534-40), y bacterias corineformes amplificadas con un gen estructural que codifica ácido aspártico β-descarboxilasa (documento JP-A-7-163383).

30 La capacidad de producir L-arginina puede conferirse modificando la bacteria corineforme para potenciar la expresión de un gen que codifica la enzima biosintética de L-arginina. Los ejemplos de enzima biosintética de L-arginina incluyen N-acetilglutamilfosfato reductasa (*argC*), ornitina acetiltransferasa (*argJ*), N-acetilglutamato cinasa (*argB*), acetilornitina transaminasa (*argD*), ornitina carbamoiltransferasa (*argF*), ácido argininosuccínico sintetasa (*argG*), ácido argininosuccínico liasa (*argH*) y carbamoilfosfato sintetasa. Estos genes biosintéticos de arginina existen en el operón Arg (*argCJBDFRGH*), y se regulan mediante un represor de arginina codificado por *argR*. (*J. Bacteriol.* dic. de 2002; 184(23): 6602-14.) Por lo tanto, la alteración del represor de arginina da como resultado un aumento en la expresión del operón Arg, potenciando de esta manera las actividades de las enzimas productoras de L-arginina (documento US2002-0045223).

40 Otro procedimiento para conferir la capacidad de producir L-arginina es, por ejemplo, conferir resistencia a los análogos de aminoácidos. Los ejemplos de bacterias corineformes incluyen bacterias corineformes resistentes a 2-tiazolealanina y auxotróficas de L-histidina, L-prolina, L-treonina, L-isoleucina, L-metionina o L-triptófano (documento JP-A-54-044096); bacterias corineformes resistentes a ácido cetomalónico, ácido fluoromalónico o ácido monofluoroacético (documento JP-A-57-18989); una bacteria corineforme resistente a arginina (documento JP-B-62-024075); y una bacteria corineforme resistente a x-guanidina (x es un ácido graso o un derivado de cadena alifática) (documento JP-A-2-186995); y una bacteria corineforme resistente a arginina hidroxamato y 6-azauracilo (documento JP-A-57-150381).

Es un ejemplo de un procedimiento para conferir la capacidad de producir L-glutamina modificar una bacteria corineforme para potenciar la expresión de un gen que codifica una enzima biosintética de L-glutamina. Los ejemplos de L-glutamina biosintética incluyen glutamina sintetasa y glutamato deshidrogenasa (documento US2003-0003550).

50 La capacidad de producir L-glutamina también puede conferirse disminuyendo o eliminando la actividad de una enzima que cataliza una reacción que se ramifica a partir de la ruta biosintética de L-glutamina y que produce otros compuestos. Por ejemplo, la capacidad de producir L-glutamina puede conferirse disminuyendo la actividad de glutaminasa (documento US2004-0152175).

55 La capacidad de producir L-glutamina puede conferirse también confiriendo resistencia a análogos de L-aminoácidos. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen un procedimiento de conferir resistencia a 6-diazo-5-oxonorleucina (documento JP-A-3-232497), un procedimiento para conferir resistencia a análogos de purina y/o sulfóxido de metionina (documento JP-A-61-202694), un procedimiento para conferir resistencia a α-ácido cetomalónico (documento JP-A-56-151495), y un procedimiento para conferir resistencia a un péptido que contiene ácido glutámico (documento JP-2-186994).

Los ejemplos específicos de bacterias corineformes que producen L-glutamina incluyen las siguientes cepas.

60 *Brevibacterium flavum* AJ11573 (FERM P-5492, documento JP56-161495A)

Brevibacterium flavum AJ11576 (FERM BP-10381, documento JP56-161495A)

Brevibacterium flavum AJ12212 (FERM P-8123, documento JP61-202694A)

Brevibacterium flavum AJ12418 (FERM BP-2205, documento JP02-186994A)

Brevibacterium flavum DH18 (FERM P-11116, documento JP03-232497A)

5 *Corynebacterium melassecola* DH344 (FERM P-11117, documento JP3-232497A)

Corynebacterium glutamicum AJ11574 (FERM P-5493, documento JP56-151495A)

10 Un ejemplo de un procedimiento para conferir la capacidad de producir L-prolina incluye un procedimiento de modificación de una bacteria corineforme para potenciar la expresión de un gen que codifica una enzima biosintética de L-prolina. Los ejemplos de enzima biosintética de L-prolina incluyen glutamato cinasa, γ -glutamil fosfato reductasa y pirolina-5-carboxilato reductasa. (*J. Bacteriol.* agosto de 1996; 178(15): 4412-9).

La capacidad de producir L-prolina puede conferirse también disminuyendo o eliminando la actividad de una enzima que cataliza una reacción que se ramifica a partir de la ruta biosintética de L-prolina y que produce otros compuestos. Por ejemplo, la capacidad de producir L-prolina puede conferirse disminuyendo la actividad de ornitina aminotransferasa. (*J. Bacteriol.* agosto de 1996; 178(15): 4412-9).

15 Mientras tanto, L-arginina, L-glutamina y L-prolina contienen L-ácido glutámico como una estructura de carbono, de forma que la capacidad de producir estos aminoácidos puede conferirse amplificando un gen que codifica una enzima que cataliza una reacción que da como resultado la producción de cada L-aminoácido a partir de L-ácido glutámico en la bacteria productora de L-ácido glutámico que se ha mencionado anteriormente.

20 Además, ya que la L-alanina se sintetiza por β -descarboxilación de L-ácido aspártico, la bacteria productora de L-alanina puede obtenerse modificando la bacteria productora de L-ácido aspártico para que disminuya la actividad de acetil-CoA hidrolasa.

La crianza para conferir o potenciar la productividad de L-lisina puede realizarse introduciendo una o más mutaciones como se indica a continuación. Dichas mutaciones artificiales son como se indican a continuación:

25 Mutantes resistentes a S-(2-aminoetil)cisteína (en lo sucesivo en este documento denominado "AEC"); mutantes que requieren aminoácidos tales como L-homoserina para su crecimiento (véanse las publicaciones de patentes japonesas N° 4828078 y 566499); mutantes resistentes a AEC y que requieran aminoácidos tales como, L-leucina, L-homoserina, L-prolina, L-serina, L-arginina, L-alanina, L-valina, etc. (véanse las patentes de Estados Unidos 3.708.395 y 3.825.472); mutantes de producción de L-lisina resistentes a DL-aminocapro lactama, aminolauril-lactama, análogos de ácido aspártico, sulfamidas, quinoides y N-lauoil-leucina, y mutantes productores de L-lisina resistentes a oxaloacetato descarboxilasa o inhibidores de enzimas del sistema respiratorio (véanse las patentes japonesas abiertas a consulta por el público N° 5053588, 5031093, 52102498, 539394, 5386089, 559783, 559759, 5632995, 5639778, publicaciones de patentes japonesas N° 5343591, 531833); mutantes productores de L-lisina que requieren inositol o ácido acético (véanse las patentes japonesas abiertas a consulta por el público N° 559784, 568692); mutantes productores de L-lisina sensibles a ácido fluoropirúvico o a temperaturas de 34 °C o más (véase la patente japonesa abierta a consulta por el público N° 5386090); mutantes productores de L-lisina de *Brevibacterium* o *Corynebacterium* resistentes a etilenglicol (véase la patente de Estados Unidos 4.411.997).

40 Es un ejemplo de un procedimiento para conferir la capacidad de producir L-lisina potenciar la expresión de un gen que codifica una enzima biosintética de L-lisina. Los ejemplos de las enzimas implicadas en la biosíntesis de L-lisina incluyen, pero sin limitación, enzimas de la ruta de diaminopimelato, tales como el gen de dihidrodipicolinato sintasa (dapA), el gen de aspartato cinasa (lysC), el gen de dihidrodipicolinato reductasa (dapB), el gen de diaminopimelato descarboxilasa (lysA), el gen de diaminopimelato deshidrogenasa (ddh) (todos los anteriores; publicación internacional n° 96/40934), el gen de fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc) (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público N° 60-87788), el gen de aspartato aminotransferasa (aspC) (publicación de patente japonesa N° 6-102028), el gen de diaminopimelato epimerasa (dapF) (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público N° 2003-135066), y el gen de aspartato semialdehído deshidrogenasa (asd) (publicación internacional n° 00/61723), y las enzimas de la ruta del aminoacido, tales como el gen de homoaconitato hidratasa (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n° 2000-157276).

50 Además, la bacteria de la presente invención puede tener una actividad disminuida de una enzima que cataliza una reacción para generar un compuesto distinto de L-lisina mediante la ramificación de la ruta biosintética de L-lisina, o puede ser deficiente en una enzima de este tipo. Las enzimas que catalizan una reacción para generar un compuesto distinto de L-lisina mediante la ramificación de la ruta biosintética de L-lisina incluyen homoserina deshidrogenasa y lisina descarboxilasa. Se describen cepas que tienen actividades reducidas de las enzimas en los documentos WO95/23864 y WO 96/178930.

<2> Modificación para disminuir la actividad de acetil-CoA hidrolasa

55 La bacteria corineforme de la presente invención tiene la capacidad para producir un L-aminoácido generado por una ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio como se ha mencionado anteriormente y se modifica para que la actividad de acetil-CoA hidrolasa (EC 3.1.2.1) disminuya.

60 La bacteria corineforme de la presente invención puede obtenerse modificando la bacteria corineforme que se ha mencionado anteriormente que tiene la capacidad de producir L-aminoácidos generados por ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio para que se reduzca la actividad de acetil-CoA hidrolasa. La crianza de la bacteria

corineforme de la presente invención, conferir la capacidad de producir L-aminoácido a la bacteria, o modificar la bacteria para que se reduzca la actividad de acetil-CoA hidrolasa pueden realizarse en cualquier orden.

5 "Actividad de acetil-CoA hidrolasa (ACH) " se refiere a la actividad para catalizar la producción de ácido acético a partir de acetil-CoA y H₂O. "Modificado para que la actividad de acetil-CoA hidrolasa disminuya" significa que la actividad de acetil-CoA hidrolasa es inferior que en las cepas no modificadas, incluyendo una bacteria corineforme de tipo natural. La actividad de ACH se reduce preferiblemente al 50% o menos, más preferiblemente al 30% o menos, todavía más preferiblemente al 10% o menos por peso celular unitario en comparación con una cepa no modificada. En este documento, una bacteria corineforme de tipo natural que sirve como control incluye, por ejemplo, la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 (ATCC 13869) o *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, y una cepa no modificada incluye la cepa *Brevibacterium lactofermentum* Δldh. La actividad de acetil-CoA hidrolasa puede medirse de acuerdo con el procedimiento de Gergely, J., y col., (Gergely, J., Hele, P. & Ramkrishnan, C.V. (1952) *J. Biol. Chem.* 198 pág. 323-334). "Disminuir" incluye cuando la actividad ha desaparecido completamente. Se prefiere que la bacteria corineforme de la presente invención tenga una actividad de acetil-CoA hidrolasa que sea inferior a la de una cepa de tipo natural o no modificada y que cause una acumulación de L-aminoácidos mayor que una cepa de tipo natural o no modificada.

10 Los ejemplos de ACH incluyen una proteína que comprende la secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 24, y una proteína que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 24, en la que uno o más aminoácidos se remplazan, eliminan, insertan o añaden en una o más posiciones, pero se mantiene la actividad de ACH. Aunque el número de "varios" restos aminoácidos al que se hace referencia en este documento puede diferir dependiendo de las posiciones en la estructura tridimensional o de los tipos de restos aminoacídicos de la proteína, puede ser preferible de 2 a 20, más preferiblemente de 2 a 10, con particular preferencia de 2 a 5. El gen de ACH preferiblemente codifica una proteína que tiene una homología de no menos del 80%, más preferiblemente no menos del 90%, incluso más preferiblemente no menos del 95%, con particular preferencia no menos del 97% con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 24, mientras que se mantiene la actividad de ACH. La sustitución de aminoácidos en estos homólogos de ACH es preferiblemente una sustitución conservativa, incluyendo 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 la sustitución de met, ile o leu por val.

15 "Modificado para que la actividad de acetil-CoA hidrolasa disminuya" incluye el caso en el que el número de moléculas de acetil-CoA hidrolasa por célula disminuye, y el caso en el que la actividad de CoA hidrolasa por molécula disminuye. Específicamente, estas modificaciones pueden conseguirse, por ejemplo, alterando un gen que codifica acetil-CoA hidrolasa en un cromosoma, o modificando una secuencia reguladora de la expresión, tal como un promotor y/o una secuencia Shine-Dalgarno (SD). El gen de acetil-CoA hidrolasa en un cromosoma incluye, por ejemplo, un ADN que comprende los nucleótidos 1037 a 2542 de la SEQ ID NO: 23. Además, el gen de acetil-CoA hidrolasa incluye, por ejemplo, un ADN que puede obtenerse usando el cebador de SEQ ID 7 y 8 en el procedimiento de PCR. Además, el gen de acetil-CoA hidrolasa en un cromosoma puede ser un ADN que es capaz de hibridar con los nucleótidos 1037 a 2542 de la SEQ ID No. 23 o una sonda que pueda prepararse a partir de los nucleótidos en condiciones rigurosas siempre que codifique una proteína que tenga actividad de acetil-CoA hidrolasa. "Condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que se forman los denominados híbridos específicos y no se forman híbridos no específicos. Aunque es difícil expresar claramente estas condiciones mediante valores numéricos, los ejemplos de dichas condiciones incluyen cuando se realizan los lavados una sola vez, preferiblemente dos a tres veces a 60°C y a una concentración salina que corresponde a 1 x SSC, 0,1% de SDS, preferiblemente 0,1 x SSC, 0,1% de SDS.

20 El gen de acetil-CoA hidrolasa (en lo sucesivo en este documento denominado como "gen ach") puede clonarse sintetizando oligonucleótidos sintéticos basándose en una secuencia oligonucleotídica de *Corynebacterium glutamicum* (por ejemplo, la SEQ ID No. 23, NCg12480 con nº de acceso a GenBank NC_003450 (una hebra complementaria de 2729376 a 2730884 de NC_003450)), y realizando un análisis por PCR usando un ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* como molde. Además, también está disponible otra secuencia nucleotídica derivada de una bacteria corineforme tal como *Brevibacterium lactofermentum*. El ADN cromosómico puede prepararse a partir de una bacteria corineforme en forma de un donante de ADN mediante, por ejemplo, el procedimiento de Saito y Miura (H. Saito y K. Miura, *Biochem. Biophys. Acta.* 72, 619 (1963), "Biotechnology Experiments Handbook", ed. por The Society for Biotechnology Japan, pág. 97 a 98, Baifukan, 1992).

25 El gen ach preparado de esta manera o una parte del mismo puede usarse para alterar el gen cromosómico ach. Además, el gen ach usado para alterar el gen cromosómico de ach también puede ser un gen que tiene homología suficiente para causar la recombinación homóloga con el gen ach en el cromosoma de una bacteria corineforme diana (por ejemplo, un gen que tiene los nucleótidos 1037 a 2542 de la SEQ ID NO: 23). En este documento, la homología suficiente para causar la recombinación homóloga es preferiblemente del 80% o más, más preferiblemente del 90% o más, todavía más preferiblemente del 95% o más, con particular preferencia del 97% o más. Además, también puede usarse un ADN que puede hibridar en condiciones rigurosas con el gen que se ha mencionado anteriormente para alteración génica.

30 Por ejemplo, el gen ach puede alterarse preparando un "gen ach de tipo delección" en el que se elimina una secuencia parcial del gen ach para que no se produzca acetil-CoA hidrolasa de funcionamiento normal, transformando una bacteria corineforme con un ADN que contiene el gen ach de tipo delección para causar una recombinación entre el gen ach de tipo delección y el gen ach en un cromosoma. Dicha alteración génica mediante sustitución génica utilizando la recombinación homóloga ya está establecida e incluye un procedimiento que emplea un ADN lineal o un procedimiento que emplea un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a la temperatura (patente de Estados Unidos 6.303.383 o JP-A-05-007491). La alteración génica mediante sustitución génica utilizando

recombinación homóloga también puede realizarse usando un plásmido que no puede replicarse en bacterias corineformes. Se usa preferiblemente un plásmido que no puede replicarse en bacterias corineformes pero puede replicarse en la bacteria *Escherichia*. Los ejemplos de un plásmido de este tipo incluyen pHSG299 (Takara Bio) y pHSG399 (Takara Bio).

5 Un gen cromosómico ach puede reemplazarse con un gen ach de tipo delección, por ejemplo, mediante recombinación homóloga usando sacB (Schafer, A. y col., Gene 145 (1994) 69-73). El gen sacB codifica una levano sacarasa y se usa para seleccionar de forma eficaz cepas en las que un gen cromosómico diana se reemplaza por un gen mutante y una porción de vector se extrae a partir de un cromosoma.

10 En primer lugar, se prepara un plásmido recombinante insertando un gen ach (mutante) de tipo delección, un gen sacB, y un marcador de selección, tal como un gen resistente a cloranfenicol en un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a la temperatura. El plásmido obtenido se introduce en una cepa hospedadora de la bacteria corineforme. Cuando se expresa levano sacarasa en células de la bacteria corineforme, el levano generado por la conversión de sacarosa se vuelve letal para la bacteria y, por consiguiente, la bacteria no puede crecer en un medio que contenga sacarosa. Por lo tanto, mediante el cultivo en una placa que contiene sacarosa, pueden seleccionarse cepas en las que tenga lugar la sustitución entre el gen ach mutante en el plásmido y un gen ach cromosómico y a partir de las cuales se extraen otras porciones del plásmido desde la célula.

Los ejemplos del gen sacB incluyen los que se indican a continuación.

Bacillus subtilis: sacB, número de acceso a GenBank X02730 (SEQ ID NO: 19)

Bacillus amyloliquifaciens: sacB, número de acceso a GenBank X52988

20 *Zymomonas mobilis*: sacB, número de acceso a GenBank L33402.

Bacillus stearothermophilus: surB, número de acceso a GenBank U34874

Lactobacillus sanfranciscensis: frfA, número de acceso a GenBank AJ508391

Acetobacter xylinus: IsxA, número de acceso a GenBank AB034152

Gluconacetobacter diazotrophicus: IsdA, número de acceso a GenBank L41732.

25 La transformación puede realizarse mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, puede emplearse un procedimiento de tratamiento de células receptoras con cloruro de calcio para aumentar la permeabilidad del ADN, que se ha reseñado para *Escherichia coli* (Mandel, M. y Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)), y un procedimiento del uso de células competentes preparadas a partir de células en crecimiento para introducir un ADN, que se ha reseñado para *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H., Wilson, G.A. y Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)). Además de estos procedimientos, puede realizarse la introducción de un ADN recombinante en células receptoras similares a protoplastos o esferoplastos, que se ha reseñado que puede aplicarse a *Bacillus subtilis*, actinomicetos y levaduras (Chang, S. y Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. y Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. y Fink, G.R., Proc. Natl. Sci. USA, 75, 1929 (1978)). Además, la transformación de la bacteria *Coryneform* también puede realizarse mediante el procedimiento del impulso eléctrico (Sugimoto y col., documento JP2-207791A).

40 Los ejemplos de plásmidos sensibles a la temperatura para las bacterias corineformes incluyen p48K y pSFKT2 (documento EP1038966), pHSC4 (publicación de patente francesa abierta a consulta por el público nº 2667875, 1992 y JP5-7491A), pBS5T, y así sucesivamente. En las bacterias corineformes, estos plásmidos pueden replicarse de forma autónoma al menos a una temperatura de 25 °C, pero no pueden replicarse de forma autónoma a una temperatura de 37 °C. La cepa AJ12571 que alberga pHSC4 se depositó en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia y Tecnología Industrial, Ministerio de Comercio e Industria Internacional "National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry" (actualmente Depositario del Organismo Internacional de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada "International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology" en Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-5466, Japón) el 26 de agosto de 1991 según las estipulaciones del Tratado de Budapest y se le dio un número de acceso FERM BP-3524.

50 La cepa transformante se cultiva a una temperatura a la que el origen de replicación sensible a la temperatura no funciona (por ejemplo, 25 °C) para obtener una cepa en la que se ha introducido el plásmido. Después, el transformante se cultiva a alta temperatura para extraer el plásmido sensible a la temperatura, y se siembra en un medio de placas que contiene un fármaco antibiótico tal como kanamicina. Aunque las cepas a partir de las cuales se extrae el plásmido no pueden crecer en una placa que contenga un fármaco antibiótico de este tipo, pueden crecer unas pocas cepas en las que el gen ach cromosomal se reemplaza por el gen ach mutante y aparecer como colonias.

55 En una cepa en la que se integra el ADN recombinante que contiene el gen ach mutante en el ADN cromosómico, el ADN recombinante provoca la recombinación con el gen ach que existía originalmente en el cromosoma, y se insertan los genes de fusión del gen ach cromosómico y el gen ach mutante en el cromosoma para que las otras porciones del ADN recombinante (segmento del vector, origen de replicación sensible a la temperatura y marcador de resistencia a fármacos) estén presentes entre los genes de fusión. Después, con el objeto de dejar únicamente el gen ach mutante en el ADN cromosómico, se elimina una copia del gen ach junto con el segmento del vector (incluyendo el origen de replicación sensible a la temperatura y el marcador de resistencia a fármacos) del ADN cromosómico. En este caso, el gen ach normal se deja en el ADN cromosómico y el gen ach mutante se extirpa del ADN cromosómico, o al contrario, el gen ach mutante se deja en el ADN cromosómico y el gen ach normal se extirpa del ADN cromosómico. Después, puede seleccionarse una cepa en la que el únicamente permanece el gen ach mutante en el

cromosoma usando PCR, hibridación Southern, o similares.

5 El descenso en la actividad de acetil-CoA hidrolasa también puede conseguirse modificando una secuencia reguladora de la expresión, tal como un promotor, una secuencia Shine-Dalgarno (SD), operadora, terminadora y atenuadora. Puede identificarse una secuencia reguladora de la expresión en un cromosoma mediante un software de análisis de genes tal como Genetix, mediante vectores para el análisis de expresión, tal como un vector de búsqueda de promotor y mediante información conocida, tal como a partir de la base de datos de Genbank. Por ejemplo, los ejemplos de mutaciones que disminuyen la actividad de acetil-CoA hidrolasa incluyen una mutación que modifica una región promotora del gen de acetil-CoA hidrolasa para que sea menos potente y una mutación que altera una secuencia consenso en una región promotora de acetil-CoA hidrolasa. Dichas mutaciones pueden introducirse usando plásmidos sensibles a la temperatura o vectores suicidas que no pueden replicarse en una célula hospedadora.

10 El descenso de la actividad de acetil-CoA hidrolasa también puede conseguirse introduciendo sustituciones aminoácidas (mutación finalizadora) en una región codificante del gen de acetil-CoA hidrolasa en un cromosoma, introduciendo un codón de terminación (mutación de aminoácido), introduciendo una mutación con desplazamiento de marco mediante el cual se añaden o eliminan uno o dos nucleótidos, o eliminando una parte del gen (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)).

15 Los ejemplos de un procedimiento para disminuir la actividad de acetil-CoA hidrolasa incluyen también un procedimiento de tratamiento de bacterias corineformes con radiación ultravioleta o con un mutágeno usado en un tratamiento de mutación ordinario, tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y ácido nitroso, para seleccionar las cepas que tienen actividad de acetil-CoA hidrolasa disminuida ("Amino Acid Fermentation", Center for Academic Publications Japan Co., Ltd., 1ª ed. publicada el 30 de mayo de 1986, págs. 77 a 100).

Mientras tanto, se usan preferiblemente en la presente invención cepas modificadas adicionalmente para potenciar la actividad de glutamato deshidrogenasa (en lo sucesivo en este documento, denominada como "GDH").

20 Para amplificar la actividad de GDH en una bacteria corineforme que tiene la capacidad de producir L-aminoácidos y que se ha modificado para disminuir la actividad de ACH, se liga un fragmento génico que codifica GDH con un vector que funciona en las bacterias corineformes, preferiblemente con un vector del tipo copia múltiple para preparar un ADN recombinante, y se transforma la bacteria corineforme con el ADN resultante. Como resultado de un aumento en el número de copias de un gen que codifica GDH en las células de los transformantes, se amplifica la actividad de GDH.

25 El gen que codifica GDH puede derivar de bacterias corineformes o puede derivar de otros organismos tales como *Escherichia coli*.

30 La secuencia nucleotídica del gen que codifica GDH de bacterias corineformes (gen *gdh*) ya se ha identificado (por ejemplo, SEQ ID NO: 25: Molecular Microbiology (1992) 6(3), 317-326 1999, una hebra complementaria de 2194739..2196082 de NC_003450), de modo que el gen *gdh* puede obtenerse por PCR usando cebadores diseñados basándose en la secuencia nucleotídica y el ADN cromosómico de bacterias corineformes como molde (PCR: reacción en cadena de la polimerasa; White, T.J. y col.; Trends Genet. 5, 185 (1989)). Los genes que codifican GDH de otros microorganismos también pueden obtenerse de la misma manera.

<3> Producción de L-aminoácidos usando bacterias corineformes de la presente invención

35 Pueden producirse de forma eficaz L-aminoácidos generados usando ácido pirúvico como intermedio cultivando las bacterias corineformes obtenidas como se ha descrito anteriormente en un medio para producir y causar la acumulación de dichos L-aminoácidos, y recogiendo dichos L-aminoácidos del medio.

40 Para producir dichos L-aminoácidos usando las bacterias corineformes de la presente invención, puede realizarse un cultivo mediante un procedimiento convencional con un medio ordinario que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y una cantidad traza de nutrientes orgánicos, tales como aminoácidos y vitaminas, si se requieren. Puede usarse un medio sintético o natural. Las fuentes de carbono y nitrógeno usadas en el medio de cultivo pueden ser de cualquier tipo siempre que puedan utilizarse por la cepa de la presente invención.

45 Los ejemplos de fuentes de carbono incluyen azúcares, tales como glucosa, glicerol, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, galactosa, hidrolizados de almidón y melazas. Además, pueden usarse ácidos orgánicos, tales como ácido cítrico y malato, y alcoholes, tales como etanol, solos o en combinación con otras fuentes de carbono.

50 Los ejemplos de fuentes de nitrógeno incluyen amonio, sales de amonio, tales como sulfato de amonio, carbonato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio y acetato de amonio, y nitratos.

55 Los ejemplos de nutrientes orgánicos que pueden estar presentes en cantidades traza incluyen aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos y ácidos nucleicos, y también pueden utilizarse peptona, casaminoácidos, extractos de levadura, e hidrolizado de proteína de semilla de soja que contienen estos nutrientes. En el caso de que se usen cepas mutantes autotróficas de nutrientes que requieran aminoácidos y similares para el crecimiento, es preferible suplementar los nutrientes requeridos.

Los ejemplos de sales inorgánicas incluyen fosfatos, sales de magnesio, sales de calcio, sales de hierro y sales de manganeso.

60 El cultivo se realizó en condiciones aeróbicas a una temperatura de fermentación de 20 a 45 °C, ajustando el pH a entre 5 y 9. Si el pH disminuye durante el cultivo, pueden añadirse carbonato de calcio o una base tal como gas amoniacal al medio para su neutralización. El cultivo de aproximadamente 10 a 120 horas da como resultado la

acumulación de cantidades considerables de L-aminoácidos.

Los L-aminoácidos se recogen del medio después de que se complete el cultivo mediante un procedimiento de recuperación conocido. Por ejemplo, después de la retirada de las células de la disolución del cultivo, los L-aminoácidos se recogen mediante concentración y cristalización.

5 EJEMPLOS

En lo sucesivo en este documento, la presente invención se explica más específicamente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

<1> Construcción del vector de alteración que porta el gen sacB

10 (A) Construcción de pBS3

15 Se obtuvo un gen sacB (SEQ ID NO: 19) mediante PCR usando un ADN cromosómico de *Bacillus subtilis* como molde y oligonucleótidos de las SEQ ID NO: 1 y 2 como cebadores. La PCR se realizó usando LA taq (fabricada por TaKaRa) como se indica a continuación: un ciclo de retención térmica a 94 °C durante 5 minutos; y 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, asociación a 49 °C durante 30 segundos, y elongación a 72 °C durante 2 minutos. El producto de PCR obtenido se purificó mediante un procedimiento convencional, después se digirió con BglII y BamHI dando extremos romos. El fragmento se insertó en pHSG299, que se había digerido con Avall dando extremos romos. El ADN obtenido se usó para transformar células competentes de *Escherichia coli* JM109 (fabricadas por TAKARA BIO INC.). Después, las células bacterianas transformadas se sembraron en un medio de LB agar que contenía 25 µg/ml de kanamicina (en lo sucesivo en este documento, abreviada como "Km") y se incubó durante una noche. Después de esto, se aislaron colonias individuales como transformantes. Los plásmidos se extrajeron de los transformantes obtenidos y el plásmido que tenía un inserto del producto de PCR objetivo se denominó pBS3. La Fig. 1 muestra el procedimiento de construcción de pBS3.

(B) Construcción de pBS4S

25 El sitio de reconocimiento SmaI en el gen resistente a kanamicina en pBS3 se modificó por sustitución nucleotídica usando PCR de cruzamiento sin provocar la sustitución aminoacídica, para que el pBS3 no se corte por la endonucleasa SmaI. En primer lugar, se realizó el análisis por PCR usando pBS3 como molde y ADN sintético de las SEQ ID NO: 3 y 4 como cebador, para obtener de esta manera un fragmento N-terminal del gen resistente a kanamicina. Por otro lado, para obtener un fragmento C-terminal del gen resistente a kanamicina, se realizó una PCR usando pBS3 como molde y ADN sintético de las SEQ ID NO: 5 y 6 como cebador. Se realizó la PCR usando ADN polimerasa Pyrobest (fabricada por TAKARA BIO Inc.) como se indica a continuación: un ciclo de retención térmica a 98 °C durante 5 minutos; y 25 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, asociación a 57 °C durante 30 segundos, y elongación a 72 °C durante 1 minuto, para obtener el producto de PCR objetivo. Las SEQ ID NO: 4 y 5 son complementarias parcialmente entre sí y no contienen el sitio de reconocimiento SmaI. Después, para obtener un fragmento completo del gen mutante resistente a kanamicina sin el sitio de reconocimiento SmaI, se mezclaron los productos génicos N-terminal y C-terminal que se han mencionado anteriormente en cantidades sustancialmente equimolares. Se realizó la PCR usando los productos génicos como matriz y ADN sintético de las SEQ ID NOS: 3 y 6 como cebador para obtener un fragmento del gen resistente a kanamicina de sitio SmaI modificado. Se realizó la PCR usando ADN polimerasa Pyrobest (fabricada por TAKARA BIO Inc.) como se indica a continuación: un ciclo de retención térmica a 98 °C durante 5 minutos; y 25 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 segundos, asociación a 57 °C durante 30 segundos, y elongación a 72 °C durante 1,5 minutos, para obtener de esta manera el producto de PCR objetivo.

45 El producto de PCR se purificó mediante un procedimiento convencional, después se digirió con BamII y después se insertó en el sitio de reconocimiento BamII que se ha descrito anteriormente de pBS3. El plásmido resultante se usó para transformar células competentes de *Escherichia coli* JM109 (disponibles en Takara Bio). Es decir, las células bacterianas transformadas se sembraron en un medio de LB agar que contenía 25 µg/ml de kanamicina y se incubaron durante una noche. Después de esto, se seleccionaron colonias que aparecieron como transformantes. Los plásmidos se aislaron a partir de los transformantes obtenidos y el plásmido que tenía un inserto del producto de PCR objetivo se nombró pBS4S. La Fig. 2 muestra el procedimiento para construir pBS4S.

(C) Construcción de pBS5T

50 Se eliminó un origen de replicación sensible a la temperatura en la bacteria corineforme de pHSC4 (documento JP-A-5-7491) digiriéndolo con BamHI y SmaI y dando extremos romos, y se insertó en el sitio NdeI de extremo romo de pBS4S. Usando el ADN resultante, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* JM109 (fabricadas por TAKARA, BIO INC.) y se sembraron en un medio de LB agar que contenía 25 µg/ml de Km, seguido de cultivo durante una noche. Después, se aislaron colonias individuales como transformantes. Los plásmidos se extrajeron de los transformantes obtenidos y un plásmido que tenía un inserto del producto de PCR objetivo se nombró pBS5T. La Fig. 3 muestra un procedimiento de construcción de pBS5T.

Ejemplo 2

<Construcción de la cepa con ldh alterado>

(A) Clonación de un fragmento para alterar el gen de lactato deshidrogenasa

60 Se obtuvo un fragmento génico que contenía lactato deshidrogenasa (en lo sucesivo en este documento,

abreviado como "gen *ldh*") obtenido a partir de la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 que tenía el ORF eliminado por PCR de cruzamiento usando ADN sintéticos diseñados basándose en la secuencia nucleotídica del gen *ldh* de la cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (SEQ ID NO: 21; nº de acceso a la base de datos de GenBank NC_003450), como cebador. Específicamente, la PCR se realizó mediante un procedimiento convencional usando un ADN cromosómico de la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 como molde y el ADN sintético de las SEQ ID NOS: 7 y 8 como cebador, obteniéndose el fragmento N-terminal del gen *ldh*. Por otro lado, para obtener un fragmento C-terminal del gen *ldh*, se realizó una PCR mediante un procedimiento convencional usando el ADN cromosómico de la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 como molde y ADN sintético de las SEQ ID NOS: 9 y 10 como cebador. Las SEQ ID NOS: 8 y 9 eran complementarias entre sí y se diseñaron para dar como resultado la delección de toda la secuencia del ORF del gen *ldh*.

Después, para obtener un fragmento del gen *ldh* que tenga una secuencia interna eliminada, se mezclaron los productos génicos N-terminal y C-terminal de *ldh* en cantidades sustancialmente equimolares y se realizó la PCR mediante un procedimiento convencional usando la mezcla como molde y el ADN sintético de las SEQ ID NO: 11 y 12 como cebador. Después de la purificación del producto de PCR de una manera convencional, se digirieron los productos de PCR con *Sall*. Después de esto, se insertó el producto de PCR en el sitio *Sall* del pBS4S que se ha mencionado anteriormente. Con el ADN obtenido, se transformaron las células competentes de *Escherichia coli* (fabricadas por TAKARA BIO INC.) y se sembraron sobre un medio de LB agar que contenía IPTG 100 µM, 40 µg/ml de X-Gal y 25 µg/ml de Km, seguido de cultivo durante una noche. Después de esto, se aislaron colonias individuales como transformantes. Los plásmidos se extrajeron de los transformantes obtenidos, y un plásmido que tenía el inserto del producto de PCR objetivo se nombró *pΔldh56-1*. La Fig. 4 muestra un procedimiento de construcción del plásmido.

(B) Preparación de la cepa con *ldh* alterado

Ya que el *pΔldh56-1* preparado en la sección (A) que se ha descrito anteriormente no contiene una región que permite la replicación autónoma en las bacterias corineformes, cuando las bacterias corineformes se transforman con el plásmido, las cepas transformantes que tienen el plásmido incorporado al cromosoma por recombinación homóloga aparecen con una frecuencia extremadamente baja. Por lo tanto, la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 se transformó usando una disolución que contenía una alta concentración del plásmido *pΔldh56-1* mediante el procedimiento de impulso eléctrico, después se sembró en un medio de CM-Dex agar que contenía 25 µg/ml de kanamicina (5 g/l de glucosa, 10 g/l de polipeptona, 10 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de KH₂PO₄, 0,4 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g/l de FeSO₄·7H₂O, 0,01 g/l de MnSO₄·7H₂O, 3 g/l de urea, 1,2 g/l de hidrolizados de semilla de soja y a pH 7,5 (KOH)), y se cultivó a 31,5 °C durante aproximadamente 30 horas. Las colonias que aparecieron en este medio eran cepas en las que se había producido la recombinación homóloga entre el fragmento del gen *ldh* del plásmido y el gen *ldh* en el cromosoma de la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256, y se insertaron en el cromosoma el gen resistente a kanamicina y el gen *SacB* obtenido a partir del plásmido.

Después, estos primeros recombinantes se cultivaron en un medio líquido CM-Dex que no contenía kanamicina a 31,5 °C durante una noche. Después de la dilución apropiada, los recombinantes se sembraron en un medio de Dex-S10 agar que contenía 10% de sacarosa (10 g/l de sacarosa, 10 g/l de polipeptona, 10 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de KH₂PO₄, 0,4 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g/l de FeSO₄·7H₂O, 0,01 g/l de MnSO₄·4H₂O, 3 g/l de urea, 1,2 g/l de hidrolizados de semilla de soja, 10 µg/l de biotina y a pH 7,5 (KOH)) y se cultivaron a 31,5 °C durante aproximadamente 30 horas. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 50 cepas a partir de las cuales se extrajo el gen *sacB* mediante una segunda recombinación y que tenían insensibilidad a la sacarosa.

Las cepas obtenidas de esta manera incluyen cepas en las que el gen cromosómico *ldh* se reemplaza por un tipo mutante derivado de *pΔldh56-1*, y cepas en las que permaneció el gen cromosómico *ldh* de tipo natural. Se comprobó fácilmente si el gen *ldh* era de tipo mutante o de tipo natural sometiendo las células obtenidas a cultivo en medio Dex-S10 agar para PCR directa. Usando cebadores (SEQ ID NO: 7 y 10) para la amplificación por PCR para analizar el gen *ldh*, se seleccionó como una cepa con *ldh* alterado una cepa cuyo producto de PCR es menor que el del gen *ldh* de tipo natural que se había amplificado usando el ADN cromosómico de la cepa 2256 de tipo natural como molde, y se nombro cepa 2256Δ(*ldh*). Esta cepa se usó como cepa de partida para preparar la siguiente cepa de gen *ach* alterado.

Cuando se realiza la fermentación en condiciones anaeróbicas, se acumula una cantidad considerable de ácido láctico como subproducto, por lo que es preferible que la actividad de lactato deshidrogenasa sea deficiente (documentos JP11-206385; *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2004; 7(4): 182-96). Sin embargo, el L-ácido glutámico se produce normalmente en condiciones aeróbicas en las que la lactato deshidrogenasa no funciona, y no es necesario alterar el gen *ldh* en las cepas de gen de acetil-CoA hidrolasa alterado para la producción de L-ácido glutámico.

Ejemplo 3

<Construcción de una cepa de gen de acetil-CoA hidrolasa alterado>

(A) Clonación de un fragmento para alterar el gen de acetil-CoA hidrolasa

Se obtuvo un fragmento génico que contenía el gen de acetil-CoA hidrolasa (en lo sucesivo en este documento, el gen se denomina "*ach*") derivado de la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 que tenía el ORF eliminado mediante PCR de cruzamiento usando ADN sintético diseñado basándose en la secuencia nucleotídica del gen de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (SEQ ID NO: 23; nº de acceso a la base de datos GenBank NC-003450). Específicamente, la PCR se realizó mediante un procedimiento convencional usando el ADN cromosómico de la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 como molde y el ADN sintético de las SEQ ID NO: 13 y 14 como cebador para obtener el fragmento C-terminal del gen *ach*. Por otro lado, para obtener un fragmento N-terminal, se realizó el análisis por PCR mediante un procedimiento convencional usando el ADN cromosómico de la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 como molde y ADN sintético de las SEQ ID NO: 15 y 16 como cebador. Las SEQ ID NO: 14 y 15 eran parcialmente complementarias entre sí. Se realizó una reacción por PCR usando KOD-plus (fabricado por

TOYOBO Co., LTD.). Después de realizar 1 ciclo de retención a 94 °C durante 2 minutos, se repitió lo siguiente durante 30 ciclos: un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 10 segundos, asociación a 55 °C durante 30 segundos, y elongación a 68 °C durante 50 segundos. Después, para obtener un fragmento del gen ach que tenía una secuencia interna eliminada, se mezclaron el fragmento N-terminal y el fragmento C-terminal del gen ach en cantidades sustancialmente equimolares. El análisis por PCR se realizó mediante un procedimiento convencional usando la mezcla como de molde y el ADN sintético de las SEQ ID NO: 17 y 18 como cebador. Se realizó una reacción por PCR usando KOD-plus (fabricado por TOYOBO Co., LTD.). Después de realizar 1 ciclo de retención a 94 °C durante 2 minutos, el siguiente ciclo se repitió durante 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 10 segundos, asociación a 55 °C durante 30 segundos y elongación a 68 °C durante 90 segundos. Después de la purificación del producto amplificado por PCR de una manera convencional, se digirieron los productos de PCR con XbaI y se insertaron en el sitio XbaI de pBS4S construido en el ejemplo 1 (B) anterior. Con el ADN resultante, las células competentes de *Escherichia coli* JM109 (fabricado por TAKARA BIO INC.) se transformaron y se sembraron en un medio de LB agar que contenía IPTG 100 μM, 40 μg/ml de X-Gal y 25 μg/ml de Km, seguido de cultivo durante una noche. Después de esto, se aislaron colonias blancas individuales como transformantes. Los plásmidos se extrajeron de los transformantes y uno que tenía un inserto del producto de PCR objetivo se nombró pBS4S::Δach. La Fig. 5 muestra un procedimiento para construir pBS4S::Δach.

(B) Preparación de la cepa con ach alterado

Ya que el pBS4S::Δach que se ha preparado en la sección (A) anterior no contiene una región que permita la replicación autónoma en células de bacterias corineformes, cuando las bacterias corineformes se transforman con el plásmido, las cepas con el plásmido incorporado a su cromosoma por recombinación homóloga aparecen como transformantes en una frecuencia extremadamente baja. Por lo tanto, se transformó la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 Δ(*ldh*) usando una disolución que contenía una alta concentración del plásmido pBS4S::Δach mediante el procedimiento de impulso eléctrico, se sembró en un medio CM-Dex agar que contenía 25 μg/ml de kanamicina y se cultivó a 31,5 °C durante aproximadamente 30 horas. Las cepas que aparecieron en este medio eran cepas en las que aparecía recombinación homóloga entre el fragmento del gen ach de tipo delección del plásmido y el gen ach en el cromosoma de la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 Δ(*ldh*), y en las que se insertaron en el cromosoma el gen resistente a kanamicina y el gen SacB derivado del plásmido.

Después, estos primeros recombinantes se cultivaron en un medio líquido CM-Dex que no contenía kanamicina a 31,5 °C durante una noche. Después de la dilución apropiada, los recombinantes se sembraron sobre un medio Dex-S10 agar que contenía sacarosa al 10% y se cultivaron a 31,5 °C durante aproximadamente 30 horas. Como resultado, se obtuvieron aproximadamente 50 cepas a partir de las cuales se extrajo el gen SacB del cromosoma mediante una segunda recombinación y que se habían vuelto insensibles a la sacarosa.

Las cepas obtenidas de esta manera incluyen las cepas en las que el gen ach cromosómico se reemplaza por un tipo de mutante derivado de pBS4S::Δach y aquellas cepas en las que permanece el gen ach cromosómico de tipo natural. Se confirmó fácilmente si el gen ach era de tipo mutante o de tipo natural sometiendo las células obtenidas mediante cultivo en un medio Dex-S10 agar PCR directa. Tras el análisis del gen ach usando cebadores (SEQ ID NO: 13 y 16), se amplificaron un fragmento de ADN de 2,9 kb para un gen ach de tipo natural y un fragmento de ADN de 1,4 kb para un gen ach de tipo mutante. Como resultado del análisis de las cepas insensibles a sacarosa mediante el procedimiento que se ha mencionado anteriormente, se seleccionaron las cepas que contenían únicamente un gen ach de tipo mutante, y la cepa con ach alterado derivada de la cepa 2256 Δ(*ldh*) se denominó cepa 2256 Δ(*ldh*, *ach*).

40 Ejemplo 4

<Producción de L-ácido glutámico mediante la cepa con ach alterado>

(1) Evaluación de la capacidad productora de L-ácido glutámico de la cepa con ach alterado

Se cultivaron la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 Δ(*ldh*) y la cepa 2256 Δ(*ldh*, *ach*) para la producción de L-ácido glutámico en un matraz de tipo S como se indica a continuación. Se inoculó un asa de cada cepa 2256 Δ(*ldh*) y 2256 Δ(*ldh*, *ach*), que se habían cultivado en una placa de CMDex agar, en 300 ml de medio de siembra (60 g de glucosa, 1,54 g de H₃PO₄, 1,45 g de KOH, 0,9 g de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g de FeSO₄·7H₂O, 670 μg de VB1·HCl, 40 μg de biotina, 1,54 g de hidrolizados de semilla de soja, 0,28 g de DL-metionina, 0,1 ml de AZ-20R por 1 litro de agua purificada (ajustada a pH 7,2 con amoníaco-agua)), y se cultivó con aireación a 1/1 vvm hasta que el azúcar residual se había consumido completamente mientras se controlaba el pH a 7,2 (NH₃), la temperatura a 31,5 °C y PL>0.

Se inocularon 30 ml del caldo de cultivo en 270 ml del medio de cultivo principal (80 g de glucosa, 3,46 g de KH₂PO₄, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g de FeSO₄·7H₂O, 0,01 g de MnSO₄·4-5H₂O, 230 μg de VB1·HCl, 0,35 g de hidrolizados de semilla de soja, y 0,2 ml de AZ-20R por 1 litro de agua purificada (ajustada a pH 7,3 con amoníaco)) y se cultivó con aireación a 1/1 vvm mientras se controlaba la temperatura a 31,5 °C, el pH a 7,3 y PL>0. Antes de que el azúcar residual se consumiera por completo, se añadieron de 70 a 80 ml de una solución de alimentación compuesta de 500 g de glucosa y 0,2 ml de AZ-20R por 1 l de agua purificada, y se continuó el cultivo hasta que el azúcar residual se había consumido por completo.

Después de que el cultivo se completara, se analizó la cantidad de L-ácido glutámico (Glu) que se había acumulado en el caldo de cultivo en un Biotech Analyzer AS210 (fabricado por Asahi Kasei Corporation.) después de la dilución apropiada del caldo de cultivo. La Tabla 1 muestra los resultados.

60

Tabla 1. Producción de L-ácido glutámico mediante una cepa deficiente en ach

Cepa	DO620 nm (x 101)	Azúcar consumido (g)	Glu (g/l)	Rendimiento de Glu (%)	α -KG (g/l)
2256 Δ (<i>ldh</i>)	0,720	60,1	87,8	51,8	2,66
2256 Δ (<i>ldh, ach</i>)	0,629	63,6	93,6	53,9	8,45

5 La cepa 2256 Δ (*ldh, ach*) mostró aproximadamente una mejora del 2% en el rendimiento en comparación con la cepa 2256 Δ (*ldh*) (la cepa de partida). Además, la cantidad de α -cetoglutarato (α -KG), que es un precursor de L-ácido glutámico, que se había acumulado mejoró aproximadamente tres veces. Los resultados mostraron que la eliminación o disminución de la actividad de ACH es eficaz en la producción de L-ácido glutámico.

Ejemplo 5

<Producción de L-alanina y L-valina mediante una cepa deficiente en ach >

(1) Evaluación del cultivo de la cepa deficiente en ach

10 Se cultivaron la cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 Δ (*ldh*) y la cepa 2256 Δ (*ldh, ach*) para la producción de L-alanina y L-valina en un matraz de tipo S como se indica a continuación. Se inoculó un asa de cada cepa 2256 Δ (*ldh*) y 2256 Δ (*ldh, ach*), que se habían cultivado en una placa de CMDex agar, en 300 ml de un medio de cultivo (60 g de glucosa, 1,54 g de H₃PO₄, 1,45 g de KOH, 0,9 g de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g de FeSO₄·7H₂O, 670 μ g de VB1-HCl, 40 μ g de biotina, 1,54 g de hidrolizados de semilla de soja, 0,28 g de DL-metionina, 0,1 ml de AZ-20R por 1 litro de agua purificada (ajustada a pH 7,2 con amoníaco-agua)), y se cultivó con aireación a 1/1 vvm hasta que el azúcar residual se había consumido completamente, mientras que se mantuvo el pH a 7,2 con amoníaco, la temperatura a 31,5 °C y PL>0.

15 Se inocularon 30 ml del caldo de cultivo en 270 ml del medio de cultivo principal (80 g de glucosa, 3,46 g de KH₂PO₄, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 0,01 g de FeSO₄·7H₂O, 0,01 g de MnSO₄·4-5H₂O, 230 μ g de VB1-HCl, 0,35 g de hidrolizados de semilla de soja y 0,2 ml de AZ-20R por 1 litro de agua purificada (ajustada a pH 7,3 con amoníaco)) y se cultivó con aireación a 1/1 vvm mientras se controlaba la temperatura a 31,5 °C, el pH a 7,3 y PL>0. Antes de que el azúcar residual se consumiera por completo, se añadieron de 70 a 80 ml de una solución de alimentación compuesta de 500 g de glucosa y 0,2 ml de AZ-20R por 1 l de agua purificada y se continuó el cultivo hasta que el azúcar residual se había consumido por completo.

20 Después de que el cultivo se completara, se analizó la cantidad de L-alanina (Ala) y L-valina (Val) que se había acumulado en el caldo de cultivo con un Amino Acid Analyzer L8500 (fabricado por Hitachi, Ltd.) después de la dilución apropiada del caldo de cultivo. La Tabla 2 muestra los resultados.

Tabla 2. Producción de Ala y Val por una cepa deficiente en ach

Cepa	DO620 nm (x 101)	Ala (g/l)	Val (g/l)
2256 Δ <i>ldh</i>	0,72	1,149	0,052
2256 Δ <i>ldh</i> Δ <i>ach</i>	0,629	2,533	0,214

30 La 2256 Δ (*ldh, ach*) mostró una mejora de aproximadamente 2,2 veces de la cantidad de L-alanina acumulada, y aproximadamente una mejora de cuatro veces de la cantidad de L-valina acumulada. Los resultados mostraron que la eliminación o descenso de la actividad de ACH es eficaz en la producción de L-valina y L-alanina.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

De acuerdo con la presente invención, se mejora el rendimiento de la fermentación de los L-aminoácidos generados por ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> BACTERIA PRODUCTORA DE L-AMINOÁCIDOS Y PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR L-AMINOÁCIDOS

<130> C537-C5225

<150> documento JP2004-340187

40 <151> 25-11-2004

	<160> 26	
	<170> PatentIn versión 3.1	
	<210> 1	
5	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 1	
	cgggatcctt ttaacccat caca	24
	<210> 2	
	<211> 29	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 2	
20	gaagatcttc aaaaggtag gaatcggg	29
	<210> 3	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 3	
30	cctttgaag atcgaccagt tgg	23
	<210> 4	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 4	
	tacctggaat gctgtttcc cagggatcgc agtggtgagt aacc	44

	<210> 5	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 5	
	cctgggaaaa cagcattcca ggtattag	28
10	<210> 6	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 6	
	tgccagtcga ctctagagga tcc	23
20	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
25	<400> 7	
	cactgcacgg ccctgcgaac	20
30	<210> 8	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 8	
35	cgccaactag gcgccaataa ttctgattt ccctaaccgg ac	42
	<210> 9	
	<211> 42	
	<212> ADN	

ES 2 375 650 T3

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebadores	
	<400> 9	
5	gtccggttag ggaatcagg aattttggc gcctagtgg cg	42
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 10	
	tgtgggcctt cggcgaggac	20
15		
	<210> 11	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 11	
	gagtcgaccg cacccattt tcata	26
25	<210> 12	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> cebador	
	<400> 12	
	tggtcgacgt gaatgctcgg cgggatcc	28
	<210> 13	
35	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	

	<400> 13	
	gcttctgctg aaagcaagcc tccg	24
	<210> 14	
5	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 14	
	gtccgattac ctgaggaggt attcccatga aggcataagt ttttcttgg	50
	<210> 15	
	<211> 50	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 15	
20	ccaagaaaaa acttatgcct tcatgggaat acctcctcag gtaatcggac	50
	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 16	
	ggatcatgtgc atggttttct cattgc	26
30		
	<210> 17	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 17	
	ggcctctaga cctgcaccga tcaggatgag tgg	33

<210> 18

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 18

gcgctctaga ctcaacaaga gcacgcgag tcacc

35

10 <210> 19

<211> 2014

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

<220>

15 <221> CDS

<222> (464).. (1882)

<223>

<400> 19

ES 2 375 650 T3

gatccititit aaccatcac atatacctgco cgttcaactat tatttagtga aatgagatat	60
tatgatattt totgaattgt gattaaaaag gcaactttat gcccatgcaa cagaaactat	120
aaaaataaca gagaatgaaa agaaacagat agatititit gttotititagc ccgtagtot	180
gcaaatcctt ttatgatitit ctatcaaaaca aaagaggaaa atagaccagt tgcaatccaa	240
acgagagtct aatagaatga ggtcgaaaag taaatcgcgco gggittgtta ctgataaagc	300
aggcaagacc taaaatgtgt aaaggcmeta gtgtatactt tggcgtoacc ccttacctat	360
tttaggtott tttitattgt gcgtaactaa cttgccatct tcaaacagga gggctggaag	420
aagcagaccg ctaacacagc acataaaaaa ggagacatga acg atg aac atc aaa	475
	Met Asn Ile Lys
	1
aag ttt gca aaa caa gca aca gta tta acc ttt act acc gca ctg ctg	523
Lys Phe Ala Lys Gln Ala Thr Val Leu Thr Phe Thr Thr Ala Leu Leu	
5 10 15 20	
gca gga ggc gca act caa gcg ttt gcg aaa gaa acg aac caa aag cca	571
Ala Gly Gly Ala Thr Gln Ala Phe Ala Lys Glu Thr Asn Gln Lys Pro	
25 30 35	
tat aag gaa aca tac ggc att toc cat att aca cgc cat gat atg ctg	619
Tyr Lys Glu Thr Tyr Gly Ile Ser His Ile Thr Arg His Asp Met Leu	
40 45 50	
caa atc cct gaa cag caa aaa aat gaa aaa tat caa gtt cct gaa tto	667
Gln Ile Pro Glu Gln Gln Lys Asn Glu Lys Tyr Gln Val Pro Glu Phe	
55 60 65	
gat tcg toc aca att aaa aat atc tot tot gca aaa ggc ctg gac gtt	715
Asp Ser Ser Thr Ile Lys Asn Ile Ser Ser Ala Lys Gly Leu Asp Val	
70 75 80	
tgg gac agc tgg cca tta caa aac gct gac ggc act gtc gca aac tat	763
Trp Asp Ser Trp Pro Leu Gln Asn Ala Asp Gly Thr Val Ala Asn Tyr	
85 90 95 100	
cac ggc tac cac atc gtc ttt gca tta gcc gga gat cct aaa aat gcg	811
His Gly Tyr His Ile Val Phe Ala Leu Ala Gly Asp Pro Lys Asn Ala	
105 110 115	
gat gac aca tcg att tac atg ttc tat caa aaa gtc ggc gaa act tct	859
Asp Asp Thr Ser Ile Tyr Met Phe Tyr Gln Lys Val Gly Glu Thr Ser	
120 125 130	
att gac agc tgg aaa aac gct ggc cgc gtc ttt aaa gac agc gac aaa	907
Ile Asp Ser Trp Lys Asn Ala Gly Arg Val Phe Lys Asp Ser Asp Lys	
135 140 145	
tto gat gca aat gat tot atc cta aaa gac caa aca caa gaa tgg tca	955
Phe Asp Ala Asn Asp Ser Ile Leu Lys Asp Gln Thr Gln Glu Trp Ser	
150 155 160	
ggc tca gcc aca ttt aca tot gac gga aaa atc cgt tta tto tac act	1003
Gly Ser Ala Thr Phe Thr Ser Asp Gly Lys Ile Arg Leu Phe Tyr Thr	
165 170 175 180	
gat tto toc ggt aaa cat tac ggc aaa caa aca ctg aca act gca caa	1051

ES 2 375 650 T3

Asp Phe Ser Gly Lys His Tyr Gly Lys Gln Thr Leu Thr Thr Ala Gln	
185	190
195	
ggt aac gta tca gca tca gac ago tot ttg aac atc aac ggt gta gag	1099
Val Asn Val Ser Ala Ser Asp Ser Ser Leu Asn Ile Asn Gly Val Glu	
200	205
210	
gat tat aaa tca atc ttt gac ggt gac gga aaa acg tat caa aat gta	1147
Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Gly Asp Gly Lys Thr Tyr Gln Asn Val	
215	220
225	
cag cag ttc atc gat gaa ggc aac tac agc tca ggc gac aac cat acg	1195
Gln Gln Phe Ile Asp Glu Gly Asn Tyr Ser Ser Gly Asp Asn His Thr	
230	235
240	
ctg aga gat cct cac tac gta gaa gat aaa ggc cac aaa tac tta gta	1243
Leu Arg Asp Pro His Tyr Val Glu Asp Lys Gly His Lys Tyr Leu Val	
245	250
255	260
ttt gaa gca aac act gga act gaa gat ggc tac caa ggc gaa gaa tot	1291
Phe Glu Ala Asn Thr Gly Thr Glu Asp Gly Tyr Gln Gly Glu Glu Ser	
265	270
275	
tta ttt aac aaa gca tac tat ggc aaa agc aca tca ttc ttc cgt caa	1339
Leu Phe Asn Lys Ala Tyr Tyr Gly Lys Ser Thr Ser Phe Phe Arg Gln	
280	285
290	
gaa agt caa aaa ctt ctg caa agc gat aaa aaa cgc aoc got gag tta	1387
Glu Ser Gln Lys Leu Leu Gln Ser Asp Lys Lys Arg Thr Ala Glu Leu	
295	300
305	
gca aac ggc gct ctc ggt atg att gag cta aac gat gat tac aca ctg	1435
Ala Asn Gly Ala Leu Gly Met Ile Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Thr Leu	
310	315
320	
aaa aaa gtg atg aaa cgc ctg att gca tot aac aca gta aca gat gaa	1483
Lys Lys Val Met Lys Pro Leu Ile Ala Ser Asn Thr Val Thr Asp Glu	
325	330
335	340
att gaa cgc ggc aac gtc ttt aaa atg aac ggc aaa tgg tac ctg ttc	1531
Ile Glu Arg Ala Asn Val Phe Lys Met Asn Gly Lys Trp Tyr Leu Phe	
345	350
355	
act gac tcc cgc gga tca aaa atg acg att gac ggc att aoc tct aac	1579
Thr Asp Ser Arg Gly Ser Lys Met Thr Ile Asp Gly Ile Thr Ser Asn	
360	365
370	
gat att tac atg ctt ggt tat gtt tot aat tot tta act ggc oca tac	1627
Asp Ile Tyr Met Leu Gly Tyr Val Ser Asn Ser Leu Thr Gly Pro Tyr	
375	380
385	
aag cgc ctg aac aaa act ggc ctt gtg tta aaa atg gat ctt gat cot	1675
Lys Pro Leu Asn Lys Thr Gly Leu Val Leu Lys Met Asp Leu Asp Pro	
390	395
400	
aac gat gta acc ttt act tac tca cac ttc gct gta cot caa ggc aaa	1723
Asn Asp Val Thr Phe Thr Tyr Ser His Phe Ala Val Pro Gln Ala Lys	
405	410
415	420
gga aac aat gtc gtg att aca ago tat atg aca aac aga gga ttc tac	1771

ES 2 375 650 T3

Gly Asn Asn Val Val Ile Thr Ser Tyr Met Thr Asn Arg Gly Phe Tyr
 425 430 435
 gca gac aaa caa tca acg ttt gcg cca agc ttc ctg ctg aac atc aaa 1819
 Ala Asp Lys Gln Ser Thr Phe Ala Pro Ser Phe Leu Leu Asn Ile Lys
 440 445 450
 ggc aag aaa aca tct gtt gtc aaa gac agc atc ctt gaa caa gga caa 1867
 Gly Lys Lys Thr Ser Val Val Lys Asp Ser Ile Leu Glu Gln Gly Gln
 455 460 465
 tta aca gtt aac aaa taa aaacgcaaaa gaaaatgcog atatoctatt 1915
 Leu Thr Val Asn Lys
 470
 ggcattttct tttattttct atcaacataa aggtgaatcc catatgaact atataaaagc 1975
 aggcaaatgg ctaaccgtat tctaaccctt ttgaagato 2014

<210> 20

<211> 473

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilis

<400> 20

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

ES 2 375 650 T3

	195		200		205														
Asn	Gly	Val	Glu	Asp	Tyr	Lys	Ser	Ile	Phe	Asp	Gly	Asp	Gly	Lys	Thr				
210						215				220									
Tyr	Gln	Asn	Val	Gln	Gln	Phe	Ile	Asp	Glu	Gly	Asn	Tyr	Ser	Ser	Gly				
225					230					235					240				
Asp	Asn	His	Thr	Leu	Arg	Asp	Pro	His	Tyr	Val	Glu	Asp	Lys	Gly	His				
				245					250						255				
Lys	Tyr	Leu	Val	Phe	Glu	Ala	Asn	Thr	Gly	Thr	Glu	Asp	Gly	Tyr	Gln				
			260					265						270					
Gly	Glu	Glu	Ser	Leu	Phe	Asn	Lys	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Ser	Thr	Ser				
			275				280						285						
Phe	Phe	Arg	Gln	Glu	Ser	Gln	Lys	Leu	Leu	Gln	Ser	Asp	Lys	Lys	Arg				
290						295				300									
Thr	Ala	Glu	Leu	Ala	Asn	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Ile	Glu	Leu	Asn	Asp				
305					310					315					320				
Asp	Tyr	Thr	Leu	Lys	Lys	Val	Met	Lys	Pro	Leu	Ile	Ala	Ser	Asn	Thr				
				325					330						335				
Val	Thr	Asp	Glu	Ile	Glu	Arg	Ala	Asn	Val	Phe	Lys	Met	Asn	Gly	Lys				
			340					345					350						
Trp	Tyr	Leu	Phe	Thr	Asp	Ser	Arg	Gly	Ser	Lys	Met	Thr	Ile	Asp	Gly				
		355					360					365							
Ile	Thr	Ser	Asn	Asp	Ile	Tyr	Met	Leu	Gly	Tyr	Val	Ser	Asn	Ser	Leu				
370					375					380									
Thr	Gly	Pro	Tyr	Lys	Pro	Leu	Asn	Lys	Thr	Gly	Leu	Val	Leu	Lys	Met				
385					390					395					400				
Asp	Leu	Asp	Pro	Asn	Asp	Val	Thr	Phe	Thr	Tyr	Ser	His	Phe	Ala	Val				
				405					410						415				
Pro	Gln	Ala	Lys	Gly	Asn	Asn	Val	Val	Ile	Thr	Ser	Tyr	Met	Thr	Asn				
			420					425						430					
Arg	Gly	Phe	Tyr	Ala	Asp	Lys	Gln	Ser	Thr	Phe	Ala	Pro	Ser	Phe	Leu				
		435					440					445							
Leu	Asn	Ile	Lys	Gly	Lys	Lys	Thr	Ser	Val	Val	Lys	Asp	Ser	Ile	Leu				
450						455						460							
Glu	Gln	Gly	Gln	Leu	Thr	Val	Asn	Lys											
465					470														

<210> 21

<211> 2820

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (898).. (1851)

<223>

10 <400> 21

ES 2 375 650 T3

tgcagaatta tgoaagatgc gccgcaacaa aacgcgatcg gccaaaggica aagtgggtcaa	60
tgtaatgacc gaaaccgctg cgatgaaact tatccaoggo ggtaaaaacc totcaattag	120
gagottgacc tcatttaatac tgtgctgggt taattcgccg gtagtcagca gogcgccgta	180
ccccagggtg ccgacactaa tgcccgcgat cgtctccttc ggtccaaaat totttgccc	240
aatcagccgg atttgggtgc gatgcctgat caatcccaca accgtgggtg tcaacgtgat	300
ggcaaccagtt gcgatgtggg tggcgttgta aattttctg gatacccgcc ggttggttct	360
ggggaggatc gagtggatto ccgctogctgc cgcctgcccc accgottgta aaacagccag	420
gtagcagcc gtaaccacc accggttcgg caacaatgac ggogagagag cccaccacat	480
tgcgatttcc gotccgataa agccagcgcc catatttga gggaggatto gcoctgcggtt	540
tggcgaocatt cggatccccg gaactagctc tgcaatgacc tgcgogccga gggaggcgag	600
gtgggtggca gtttttagtg cgggtttaag cgttgcacgg cgagtgggtg gcagagacgc	660
tagtotgggg agcgaaccca tattgagtoa tottggcaga gcctgcacaa ttotgcaggg	720
cataggttgg ttttgotcga tttacaatgt gatttttca acaaaaataa caottggctc	780
gaccacattt tcggacataa tcgggcataa ttaaagggtt acaaaaggaa tccgggcaca	840
agctottgot gattttctga gotgctttgt ggttctccg gttagggaat tcaggaa	897
gtg gga tgg aaa atg aaa gaa acc gtc ggt aac aag att gtc ctc att	945
Val Gly Ser Lys Met Lys Glu Thr Val Gly Asn Lys Ile Val Leu Ile	
1 5 10 15	
ggc gca gga gat gtt gga gtt gca tac gca tac gca ctg atc aac cag	993
Gly Ala Gly Asp Val Gly Val Ala Tyr Ala Tyr Ala Leu Ile Asn Gln	
20 25 30	
ggc atg gca gat cac ctt gcg atc atc gac atc gat gaa aag aaa ctc	1041
Gly Met Ala Asp His Leu Ala Ile Ile Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu	
35 40 45	
gaa ggc aac gtc atg gac tta aac cat ggt gtt gtg tgg gcc gat tcc	1089
Glu Gly Asn Val Met Asp Leu Asn His Gly Val Val Trp Ala Asp Ser	
50 55 60	
ogc acc cgc gtc acc aag ggc acc tac got gac tgc gaa gac gca gcc	1137
Arg Thr Arg Val Thr Lys Gly Thr Tyr Ala Asp Cys Glu Asp Ala Ala	
65 70 75 80	
atg gtt gtc att tgt gcc ggc gca gcc caa aag cca ggc gag acc cgc	1185
Met Val Val Ile Cys Ala Gly Ala Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg	
85 90 95	
ctc cag ctg gtg gac aaa aac gtc aag att atg aaa tcc atc gtc ggc	1233
Leu Gln Leu Val Asp Lys Asn Val Lys Ile Met Lys Ser Ile Val Gly	
100 105 110	
gat gtc atg gac agc gga ttc gac ggc atc ttc ctc gtg gcg tcc aac	1281
Asp Val Met Asp Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ser Asn	
115 120 125	
cca gtg gat atc ctg acc tac gca gtg tgg aaa ttc tcc ggc ttg gaa	1329
Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr Ala Val Trp Lys Phe Ser Gly Leu Glu	
130 135 140	
tgg aac cgc gtg atc ggc tcc gga act gtc ctg gac tcc got oga ttc	1377

ES 2 375 650 T3

Trp Asn Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser Ala Arg Phe	
145	150 155 160
ogc tac atg ctg ggc gaa ctc tac gaa gtg gca cca agc tcc gtc cac	1425
Arg Tyr Met Leu Gly Glu Leu Tyr Glu Val Ala Pro Ser Ser Val His	
165 170 175	
ggc tac atc atc ggc gaa cac ggc gac act gaa ctt cca gtc ctg tcc	1473
Ala Tyr Ile Ile Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Ser	
180 185 190	
tcc ggc acc atc gca ggc gta tgc ctt agc oga atg ctg gac aaa gac	1521
Ser Ala Thr Ile Ala Gly Val Ser Leu Ser Arg Met Leu Asp Lys Asp	
195 200 205	
cca gag ctt gag ggc cgt cta gag aaa att ttc gaa gac acc cgc gac	1569
Pro Glu Leu Glu Gly Arg Leu Glu Lys Ile Phe Glu Asp Thr Arg Asp	
210 215 220	
gct gcc tat cac att atc gac gcc aag ggc tcc act tcc tac ggc atc	1617
Ala Ala Tyr His Ile Ile Asp Ala Lys Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Ile	
225 230 235 240	
ggc atg ggt ctt gct cgc atc acc cgc gca atc ctg cag aac caa gac	1665
Gly Met Gly Leu Ala Arg Ile Thr Arg Ala Ile Leu Gln Asn Gln Asp	
245 250 255	
gtt gca gtc cca gtc tot gca ctg ctc cac ggt gaa tac ggt gag gaa	1713
Val Ala Val Pro Val Ser Ala Leu Leu His Gly Glu Tyr Gly Glu Glu	
260 265 270	
gac atc tac atc ggc acc cca got gtg gtg aac cgc cga ggc atc cgc	1761
Asp Ile Tyr Ile Gly Thr Pro Ala Val Val Asn Arg Arg Gly Ile Arg	
275 280 285	
ogc gtt gtc gaa cta gaa atc acc gac cac gag atg gaa cgc ttc aag	1809
Arg Val Val Glu Leu Glu Ile Thr Asp His Glu Met Glu Arg Phe Lys	
290 295 300	
cat tcc gca aat acc ctg cgc gaa att cag aag cag ttc ttc taa	1854
His Ser Ala Asn Thr Leu Arg Glu Ile Gln Lys Gln Phe Phe	
305 310 315	
atotttggcg cctagtggc gacgcaagtg tttoattgga acacttggc tgccaacttt	1914
ttggitttac ggcacaatga aactgttggg ttgaatttag agtgtttgta gcttaaggag	1974
ctcaaatgaa tgagttgac caggacattc tccaggagat caagactgaa ctgcacgagt	2034
taattotaga acttgatgag gtgacacaaa ctcacagoga ggcoatcggg caggtotccc	2094
caaccoatta cgttgggtgc cgaacctoa tgcattacgc gcattottgc accaaagacc	2154
tccgtggcct gcagcaacgc ctctctctctg tgggagctac ccgcttgact accacogaac	2214
cagcagtgca ggcccgccctc aaggccgccc goaatgittat cggagcttcc gcaggigaag	2274
gocacttta tccacctoa gatgtogtgc atgcocttoga agatgocgat gagattotog	2334
acgagcagc ogaaattctc cttggogaac cctacogga tactcoatcc tgcacatgg	2394
tcacctgoc caccgaagcc gccaccgaca ttgaa cttgt ccgtggcttc gccaaaagcg	2454
gcotgaatct agctcgcact aactgtgcac acgac gatga aaccgtctgg aagcagatga	2514
tgcacaacgt ccacaccgtt gcagaagaag ttggcogggg aatcogcctc agcatggacc	2574

ES 2 375 650 T3

tgcgcggacc aaaagtagcg accggcgaaa tgcgcccgagg cgcagaagta ggtcgcgcgac 2634
 gagtaaccgc cgacgaaacc ggaaaagtag tgacgcccgcg aaaactgtgg atcaccgccc 2694
 acggctccga accagtcoca gccccgaaa gcctgcccgg tgcccccgct ctgcccattg 2754
 aagtcacccc agaatggttc gacaaaactag aaatcggcag cgtcatcaac gtcccagaca 2814
 cccgcg 2820

<210> 22

<211> 318

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 22

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

	260		265		270	
Asp	Ile Tyr	Ile Gly Thr	Pro Ala Val Val	Asn Arg Arg	Gly Ile Arg	
	275		280		285	
Arg	Val Val	Glu Leu Glu	Ile Thr Asp His	Glu Met Glu	Arg Phe Lys	
	290		295		300	
His	Ser Ala	Asn Thr Leu	Arg Glu Ile Gln	Lys Gln Phe	Phe	
305		310		315		

<210> 23

<211> 3600

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (1037) .. (2542)

<223>

10 <400> 23

```

gaagcgetac ggacttcgog cggcgtoga cagcaatgog tccagcatcc aagtgagtat      60
ggtgctcacc atcaatacca acgoggaact tcaccgtcac oggaatgtcc gtgccttcog      120
tagccttcac agccgcggaa acgatgtttt caaacaacag gcgcttgtaa ggaatgcag      180
aaccgccaac cggcgcggtg accttggaa cggggcagcc aaagttcata tcaatatgat      240
ccgccaagtt ttcacaaag atcatcttog ccgcttcgta ggtgtacttc gggtaacog      300
tgtacagctg caagcttcgg gattttcat ccggcgcgaa ggtggtcctg tgcattggtt      360
tctcattgog ctcaacaaga gcaogogcag tcaccatttc acagacgtac agccccgaga      420
ttgttcccggt gogttgcatt tctgttcac ggcacagcgt gcggaaagca acgttggta      480
caccagccat gggggctaga accacagggg aggcaaggtc aaaggggccc atttttaag      540
tcacctaacct attgtcccc gtgaatcagg ttgggcacaaa tatttgaagc aaattgtgag      600
cagggcgcgaa ctaggaaaagt ggtgtgcatt cactttttgg gggctggggg tgggttaagc      660
ttcogggggt ctagggttgg tctgagcttt attcctgggc tttgggaggc ttgcaaacag      720

```

```

ggggcatgca aatttggggg taatgotggg ccttgaatc ccactatcac agatagtatt      780
cgggcatttc ctgtcacgat ggtttatcct tgggacacaa catcaaagtg ggttacatca      840
tatgcttcog gttgaagtga cctatctgaa aagattggtc gaaccttgaa gcaatgggtg      900
gaactgcgtt aacgaatttt gtggacgtt aaaatggctg cattctgctt gotgaagtgg      960
cacacctatg tttctgctt ggttatagca gtgcgggaaa aatttgaaaa agtccgatta     1020
cctgaggagg tattca atg tct gat cgc att gct toa gaa aag ctg cgc tcc     1072

```

Met Ser Asp Arg Ile Ala Ser Glu Lys Leu Arg Ser
1 5 10

```

aag ctg atg tcc gcc gac gag gog gca cag ttt gtt aac cac ggt gac      1120
Lys Leu Met Ser Ala Asp Glu Ala Ala Gln Phe Val Asn His Gly Asp
15 20 25
```

```

aag gtt ggt ttc tcc ggc ttc acc ggc got ggc tac oca aag gca ctg      1168
Lys Val Gly Phe Ser Gly Phe Thr Gly Ala Gly Tyr Pro Lys Ala Leu
```

ES 2 375 650 T3

30	35	40		
cct acg gca atc gct aac	ogg gct aaa gaa	gca cac ggt gca ggc aac	1216	
Pro Thr Ala Ile Ala	Asn Arg Ala Lys Glu	Ala His Gly Ala Gly Asn		
45	50	55	60	
gac tac gca atc gac ctg ttc act ggc gca tog acc gcc cct gac tgc			1264	
Asp Tyr Ala Ile Asp	Leu Phe Thr Gly Ala	Ser Thr Ala Pro Asp Cys		
	65	70	75	
gat ggc gta ctt gca gaa got gac got atc cgc tgg cgc atg cca tac			1312	
Asp Gly Val Leu Ala Glu Ala Asp Ala Ile	Arg Trp Arg Met Pro Tyr			
	80	85	90	
gca tot gat cca atc atg cgt aac aag atc aac tcc ggc tcc atg gga			1360	
Ala Ser Asp Pro Ile Met Arg Asn Lys Ile	Asn Ser Gly Ser Met Gly			
	95	100	105	
tac tcc gat atc cac ctg tcc cac tcc ggc cag cag gtt gaa gag ggc			1408	
Tyr Ser Asp Ile His Leu Ser His Ser Gly Gln Gln Val Glu Glu Gly				
	110	115	120	
ttc ttc ggc cag ctc aac gta gct gtc att gaa atc acc cgc atc act			1456	
Phe Phe Gly Gln Leu Asn Val Ala Val Ile	Glu Ile Thr Arg Ile Thr			
	125	130	135	140
gaa gag ggc tac atc atc cct tot tcc tcc gtg ggt aac aac gtt gag			1504	
Glu Glu Gly Tyr Ile Ile Pro Ser Ser Ser Val Gly Asn Asn Val Glu				
	145	150	155	
tgg ctc aac got gca gag aag gtc atc ctc gag gtt aac tot tgg cag			1552	
Trp Leu Asn Ala Ala Glu Lys Val Ile Leu Glu Val Asn Ser Trp Gln				
	160	165	170	
tct gaa gac ctc gaa ggt atg cac gac atc tgg tot gtt cct gcc ctg			1600	
Ser Glu Asp Leu Glu Gly Met His Asp Ile	Trp Ser Val Pro Ala Leu			
	175	180	185	
cca aac cgc att gcc gtg cca atc aac aag cca ggc gac cgc atc ggt			1648	
Pro Asn Arg Ile Ala Val Pro Ile Asn Lys Pro Gly Asp Arg Ile Gly				
	190	195	200	
aag acc tac atc gag ttc gac acc gac aag gtt gtt got gtt gtt gag			1696	
Lys Thr Tyr Ile Glu Phe Asp Thr Asp Lys Val Val Ala Val Val Glu				
	205	210	215	220
acc aac acc gca gac cgc aac gca cca ttc aag cct gtc gac gac atc			1744	
Thr Asn Thr Ala Asp Arg Asn Ala Pro Phe Lys Pro Val Asp Asp Ile				
	225	230	235	
tot aag aag atc got ggc aac ttc ctc gac ttc ctg gaa ago gaa gtt			1792	
Ser Lys Lys Ile Ala Gly Asn Phe Leu Asp Phe Leu Glu Ser Glu Val				
	240	245	250	
got gca ggt cgc ctg tcc tac gac ggc tac atc atg cag tcc ggc gtg			1840	
Ala Ala Gly Arg Leu Ser Tyr Asp Gly Tyr Ile Met Gln Ser Gly Val				
	255	260	265	
ggc aac gtg cca aac gcg gtg atg goa ggc ctg ctg gaa tcc aag ttt			1888	
Gly Asn Val Pro Asn Ala Val Met Ala Gly Leu Leu Glu Ser Lys Phe				

ES 2 375 650 T3

270	275	280	
gag aac atc cag gcc tac acc gaa gtt atc cag gac ggc atg gtg gac			1936
Glu Asn Ile Gln Ala Tyr Thr Glu Val Ile Gln Asp Gly Met Val Asp			
285	290	295	300
ctc atc gac gcc ggc aag atg acc gtt gca tcc gca act tcc ttc tcc			1984
Leu Ile Asp Ala Gly Lys Met Thr Val Ala Ser Ala Thr Ser Phe Ser			
	305	310	315
ctg tot cct gag tac gca gag aag atg aac aac gag got aag cgt tac			2032
Leu Ser Pro Glu Tyr Ala Glu Lys Met Asn Asn Glu Ala Lys Arg Tyr			
	320	325	330
ggc gag tcc att atc ctg cgc cca cag cag atc tot aac cac cca gag			2080
Arg Glu Ser Ile Ile Leu Arg Pro Gln Gln Ile Ser Asn His Pro Glu			
	335	340	345
gtc atc cgc cgc gtt ggc ctg atc gcc acc aac ggt ctc atc gag got			2128
Val Ile Arg Arg Val Gly Leu Ile Ala Thr Asn Gly Leu Ile Glu Ala			
	350	355	360
gac att tac ggc aac gtc aac tcc acc aac gtt tot ggc tcc cgc gtc			2176
Asp Ile Tyr Gly Asn Val Asn Ser Thr Asn Val Ser Gly Ser Arg Val			
	365	370	380
atg aac ggc atc ggc ggc tcc ggc gac ttc acc cgt aac ggc tac atc			2224
Met Asn Gly Ile Gly Gly Ser Gly Asp Phe Thr Arg Asn Gly Tyr Ile			
	385	390	395
tcc ago ttc atc acc cct tca gag gca aag ggc ggc gca atc tct gog			2272
Ser Ser Phe Ile Thr Pro Ser Glu Ala Lys Gly Gly Ala Ile Ser Ala			
	400	405	410
atc gtt cct ttc gca tcc cac atc gac cac acc gag cac gat gtc atg			2320
Ile Val Pro Phe Ala Ser His Ile Asp His Thr Glu His Asp Val Met			
	415	420	425
gtt gtt atc tot gag tac ggt tac gca gac ott cgt ggt ctg got cca			2368
Val Val Ile Ser Glu Tyr Gly Tyr Ala Asp Leu Arg Gly Leu Ala Pro			
	430	435	440
cgt gag cgc gtt gcc aag atg atc ggc ctg got cac cct gat tac cgc			2416
Arg Glu Arg Val Ala Lys Met Ile Gly Leu Ala His Pro Asp Tyr Arg			
	445	450	460
cca ctg ctc gag gag tac tac got cgc gca acc tcc ggt gac aac aag			2464
Pro Leu Leu Glu Glu Tyr Tyr Ala Arg Ala Thr Ser Gly Asp Asn Lys			
	465	470	475
tac atg cag acc cct cat gat ctt gca acc gog ttt gat ttc cac atc			2512
Tyr Met Gln Thr Pro His Asp Leu Ala Thr Ala Phe Asp Phe His Ile			
	480	485	490
aac ctg got aag aac ggc tcc atg aag gca taa gttttttott gtttagaaa			2565
Asn Leu Ala Lys Asn Gly Ser Met Lys Ala			
	495	500	
ccgcgcctc gacaacattt cgaggcggcg gtttc tttta ttacctgggt tttgagcgtt			2625
aaattagacc agtccaggct agtgtttgggt agcta attga gggcgatttt aataaggcgcg			2685

ES 2 375 650 T3

```

gtgccatgta ctaatatggt ctgagttggg cctatagoto agttggtaga gctacggact 2745
tttaatcgcg aggtcttggg ttogagtccc aatgggccc aatcttaagt acccotgttt 2805
tggagaatgc tccgagccag gggtaacttt cttttcctca cacacagtag ctgctgagaa 2865
aaatgaagac cttttgtag gttgggagta tgaccaaccc atacgaggcc ttcataccgc 2925
toaagcatcg tacggggatt gaaccggagc acacctttg ggaatgggaa aacaaaaggg 2985
ttcacattgc aaggagacgt cgagaagcgc ccgtccgcgt tatcgiggcg catgggctag 3045
gcacccatag tggcgccttc tggccctcgc tcgcccctat tgaggcgccg gacctgcgcg 3105
cgatcgacct gcctaaaact ccgctttaag acgattggct gcgcctttta gaatctttca 3165
totcttcoga agacgaaggc cggccaactc tctgatcgg tgcaggcacc ggaggcttgc 3225
tttgccgaga agctgcacac cgcacaggac tggctgcaca cgtcattgcc acctgcctgc 3285
tcaacccctc cgaccgcgcg acgcgcggcg cactgttcag gttttcaccg ctgactcggc 3345
tgatccaagg ccgcttgcgc aaccgcgaaa ttccctgac cagagtgtg aacttcagca 3405
aaatcagcgc cagcccagcc ctgagcaaat tgtgcgcggc cgatgaattt agcggagcat 3465
ccaaaataac ctgggggttc ctogcgtcat atgtgcaaca caaggccaaa ctgggtgacg 3525
ttcccgtaac tctgatgcac cctgaccagc acctctgac tcccgttgag ctcagctcgc 3585
gtaoccttcc gcgcc
    
```

<210> 24

<211> 502

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 24

```

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

ES 2 375 650 T3

Glu Gly Met His Asp Ile Trp Ser Val Pro Ala Leu Pro Asn Arg Ile
 180 185 190
 Ala Val Pro Ile Asn Lys Pro Gly Asp Arg Ile Gly Lys Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Glu Phe Asp Thr Asp Lys Val Val Ala Val Val Glu Thr Asn Thr Ala
 210 215 220
 Asp Arg Asn Ala Pro Phe Lys Pro Val Asp Asp Ile Ser Lys Lys Ile
 225 230 235 240
 Ala Gly Asn Phe Leu Asp Phe Leu Glu Ser Glu Val Ala Ala Gly Arg
 245 250 255
 Leu Ser Tyr Asp Gly Tyr Ile Met Gln Ser Gly Val Gly Asn Val Pro
 260 265 270
 Asn Ala Val Met Ala Gly Leu Leu Glu Ser Lys Phe Glu Asn Ile Gln
 275 280 285
 Ala Tyr Thr Glu Val Ile Gln Asp Gly Met Val Asp Leu Ile Asp Ala
 290 295 300
 Gly Lys Met Thr Val Ala Ser Ala Thr Ser Phe Ser Leu Ser Pro Glu
 305 310 315 320
 Tyr Ala Glu Lys Met Asn Asn Glu Ala Lys Arg Tyr Arg Glu Ser Ile
 325 330 335
 Ile Leu Arg Pro Gln Gln Ile Ser Asn His Pro Glu Val Ile Arg Arg
 340 345 350
 Val Gly Leu Ile Ala Thr Asn Gly Leu Ile Glu Ala Asp Ile Tyr Gly
 355 360 365
 Asn Val Asn Ser Thr Asn Val Ser Gly Ser Arg Val Met Asn Gly Ile
 370 375 380
 Gly Gly Ser Gly Asp Phe Thr Arg Asn Gly Tyr Ile Ser Ser Phe Ile
 385 390 395 400
 Thr Pro Ser Glu Ala Lys Gly Gly Ala Ile Ser Ala Ile Val Pro Phe
 405 410 415
 Ala Ser His Ile Asp His Thr Glu His Asp Val Met Val Val Ile Ser
 420 425 430
 Glu Tyr Gly Tyr Ala Asp Leu Arg Gly Leu Ala Pro Arg Glu Arg Val
 435 440 445
 Ala Lys Met Ile Gly Leu Ala His Pro Asp Tyr Arg Pro Leu Leu Glu
 450 455 460
 Glu Tyr Tyr Ala Arg Ala Thr Ser Gly Asp Asn Lys Tyr Met Gln Thr
 465 470 475 480
 Pro His Asp Leu Ala Thr Ala Phe Asp Phe His Ile Asn Leu Ala Lys
 485 490 495
 Asn Gly Ser Met Lys Ala
 500

<210> 25

<211> 2037

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (573) .. (1913)

5 <223>

<400> 25

```

gctagcctcg ggagctotag gagattgtga aaaacgggto aaatttctcc gatgcagcgc      60
ctataaaaagt cgtaccaatt ccatttgagg gtgctcaagt gtggccaggt tatataacca      120
gtcagtoaac tggtoatoatt cgotggtcgg atgaatttaa ttaaagaaga gacttcatgc      180
agttacogcg cgttttggcg atacacaatt gataaaccta aagaaatfff caaacaatff      240
taattotttg tggtoatato tgtgogacac tgccataatt gaocgtgagc atttaccagc      300
ctaaatgccc gcagtgagtt aagtotcaaa gcaagaagtt gctotfftagg goatccgtag      360
tttaaaacta ttaaccgffa ggtatgacaa gcoggttgat gtgaaocgag tttffaaeeq      420
tttcaggatc agatffttca caggcattff gctccagcaa acgootagga tgtacatggt      480
gcocfcaatg ggaaccacca acatocactaa atggcccaga tacacactff aaaatocgtgc      540
gogcatgcag ccgagatggg aacgaggaaa to atg aca gtt gat gag cag gtc      593
                               Met Thr Val Asp Glu Gln Val
                               1           5

tot aac tat tac gac atg ott ctg aag ogc aat got ggc gag oot gaa      641
Ser Asn Tyr Tyr Asp Met Leu Leu Lys Arg Asn Ala Gly Glu Pro Glu
          10           15           20

ttt cac cag gca gtg gca gag gtt ttg gaa tot ttg aag atc gtc ctg      689
Phe His Gln Ala Val Ala Glu Val Leu Glu Ser Leu Lys Ile Val Leu
          25           30           35

gaa aag gac oot cat tac got gat tac ggt otc atc cag ogc ctg tgc      737
Glu Lys Asp Pro His Tyr Ala Asp Tyr Gly Leu Ile Gln Arg Leu Cys
          40           45           50           55

gag oot gag ogt cag otc atc tto cgt gtc oot tgg gtt gat gac cag      785
Glu Pro Glu Arg Gln Leu Ile Phe Arg Val Pro Trp Val Asp Asp Gln
          60           65           70

ggc cag gtc cac gtc aac cgt ggt tto ogc gtc cag tto aac tot gca      833
Gly Gln Val His Val Asn Arg Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala
          75           80           85

ott gga cca tac aag ggc ggc ctg ogc tto cac cca tot gta aac ctg      881
Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly Leu Arg Phe His Pro Ser Val Asn Leu
          90           95           100

ggc att gtg aag tto ctg ggc ttt gag cag atc ttt aaa aac tcc cta      929
Gly Ile Val Lys Phe Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ser Leu
          105           110           115

acc ggc ctg cca atc ggt ggt ggc aag ggt gga tcc gac tto gac oot      977
Thr Gly Leu Pro Ile Gly Gly Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro
          120           125           130           135

```

ES 2 375 650 T3

aag ggc aag tcc gat ctg gaa atc atg cgt ttc tgc cag tcc ttc atg	1025
Lys Gly Lys Ser Asp Leu Glu Ile Met Arg Phe Cys Gln Ser Phe Met	
140 145 150	
acc gag ctg cac cgc cac atc ggt gag tac cgc gac gtt cct gca ggt	1073
Thr Glu Leu His Arg His Ile Gly Glu Tyr Arg Asp Val Pro Ala Gly	
155 160 165	
gac atc gga gtt ggt ggc cgc gag atc ggt tac ctg ttt ggc cac tac	1121
Asp Ile Gly Val Gly Gly Arg Glu Ile Gly Tyr Leu Phe Gly His Tyr	
170 175 180	
cgt cgc atg gcc aac cag cac gag tcc ggc gtt ttg acc ggt aag ggc	1169
Arg Arg Met Ala Asn Gln His Glu Ser Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly	
185 190 195	
ctg acc tgg ggt gga tcc ctg gtc cgc acc gag gca act ggc tac ggc	1217
Leu Thr Trp Gly Gly Ser Leu Val Arg Thr Glu Ala Thr Gly Tyr Gly	
200 205 210 215	
tgc gtt tac ttc gtg agt gaa atg atc aag got aag ggc gag agc atc	1265
Cys Val Tyr Phe Val Ser Glu Met Ile Lys Ala Lys Gly Glu Ser Ile	
220 225 230	
ago ggc cag aag atc atc gtt tcc ggt tcc ggc aac gta gca acc tac	1313
Ser Gly Gln Lys Ile Ile Val Ser Gly Ser Gly Asn Val Ala Thr Tyr	
235 240 245	
gog att gaa aag got cag gaa ctc ggc gca acc gtt att ggt ttc tcc	1361
Ala Ile Glu Lys Ala Gln Glu Leu Gly Ala Thr Val Ile Gly Phe Ser	
250 255 260	
gat tcc ago ggt tgg gtt cat acc cct aat ggc gtt gac gtg got aag	1409
Asp Ser Ser Gly Trp Val His Thr Pro Asn Gly Val Asp Val Ala Lys	
265 270 275	
ctc cgc gaa atc aag gaa gtt cgc cgc gca cgc gta tcc gtg tac gcc	1457
Leu Arg Glu Ile Lys Glu Val Arg Arg Ala Arg Val Ser Val Tyr Ala	
280 285 290 295	
gac gaa gtt gaa ggc gca acc tac cac acc gac ggg tcc atc tgg gat	1505
Asp Glu Val Glu Gly Ala Thr Tyr His Thr Asp Gly Ser Ile Trp Asp	
300 305 310	
ctc aag tgc gat atc gct ott cct tgt gca act cag aac gag ctc aac	1553
Leu Lys Cys Asp Ile Ala Leu Pro Cys Ala Thr Gln Asn Glu Leu Asn	
315 320 325	
ggt gag aac got aag act ott goa gac aac ggc tgc cgt ttc gtt got	1601
Gly Glu Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Asn Gly Cys Arg Phe Val Ala	
330 335 340	
gaa ggc gog aac atg oct tcc acc coa gag got gtt gag gtc ttc cgt	1649
Glu Gly Ala Asn Met Pro Ser Thr Pro Glu Ala Val Glu Val Phe Arg	
345 350 355	
gag cgc gac atc cgc ttc gga coa ggc aag gca got aac got ggt ggc	1697
Glu Arg Asp Ile Arg Phe Gly Pro Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly	
360 365 370 375	

ES 2 375 650 T3

ggt goa acc too got otg gag atg cag cag aac got tog cgc gat too 1745
 Val Ala Thr Ser Ala Leu Glu Met Gln Gln Asn Ala Ser Arg Asp Ser
 380 385 390
 tgg agc ttc gag tac acc gac gag cgc ctc cag gtg atc atg aag aac 1793
 Trp Ser Phe Glu Tyr Thr Asp Glu Arg Leu Gln Val Ile Met Lys Asn
 395 400 405
 atc ttc aag acc tgt gca gag acc gca gca gag tat gga cac gag aac 1841
 Ile Phe Lys Thr Cys Ala Glu Thr Ala Ala Glu Tyr Gly His Glu Asn
 410 415 420
 gat tac gtt gtc ggc got aac att got ggc ttc aag aag gta got gac 1889
 Asp Tyr Val Val Gly Ala Asn Ile Ala Gly Phe Lys Lys Val Ala Asp
 425 430 435
 gcg atg ctg gca cag ggc gtc atc taa gacccctgca ctttacttaa 1936
 Ala Met Leu Ala Gln Gly Val Ile
 440 445
 acccctgato cgcgttaagg atcagggatt ttgattttt tccaggtaaa ttatcogato 1996
 cacatgggtt aatgcagctg tgoggtgcgc aatgatgato a 2037

<210> 26

<211> 447

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 26

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

ES 2 375 650 T3

				165					170				175		
Gly	Tyr	Leu	Phe	Gly	His	Tyr	Arg	Arg	Met	Ala	Asn	Gln	His	Glu	Ser
				180					185				190		
Gly	Val	Leu	Thr	Gly	Lys	Gly	Leu	Thr	Trp	Gly	Gly	Ser	Leu	Val	Arg
				195					200				205		
Thr	Glu	Ala	Thr	Gly	Tyr	Gly	Cys	Val	Tyr	Phe	Val	Ser	Glu	Met	Ile
				210					215				220		
Lys	Ala	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Gln	Lys	Ile	Ile	Val	Ser	Gly
225						230						235			240
Ser	Gly	Asn	Val	Ala	Thr	Tyr	Ala	Ile	Glu	Lys	Ala	Gln	Glu	Leu	Gly
						245						250			255
Ala	Thr	Val	Ile	Gly	Phe	Ser	Asp	Ser	Ser	Gly	Trp	Val	His	Thr	Pro
				260									265		270
Asn	Gly	Val	Asp	Val	Ala	Lys	Leu	Arg	Glu	Ile	Lys	Glu	Val	Arg	Arg
				275									280		285
Ala	Arg	Val	Ser	Val	Tyr	Ala	Asp	Glu	Val	Glu	Gly	Ala	Thr	Tyr	His
				290									295		300
Thr	Asp	Gly	Ser	Ile	Trp	Asp	Leu	Lys	Cys	Asp	Ile	Ala	Leu	Pro	Cys
305						310							315		320
Ala	Thr	Gln	Asn	Glu	Leu	Asn	Gly	Glu	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Asp
						325							330		335
Asn	Gly	Cys	Arg	Phe	Val	Ala	Glu	Gly	Ala	Asn	Met	Pro	Ser	Thr	Pro
				340									345		350
Glu	Ala	Val	Glu	Val	Phe	Arg	Glu	Arg	Asp	Ile	Arg	Phe	Gly	Pro	Gly
				355									360		365
Lys	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Thr	Ser	Ala	Leu	Glu	Met	Gln
				370									375		380
Gln	Asn	Ala	Ser	Arg	Asp	Ser	Trp	Ser	Phe	Glu	Tyr	Thr	Asp	Glu	Arg
385						390							395		400
Leu	Gln	Val	Ile	Met	Lys	Asn	Ile	Phe	Lys	Thr	Cys	Ala	Glu	Thr	Ala
				405									410		415
Ala	Glu	Tyr	Gly	His	Glu	Asn	Asp	Tyr	Val	Val	Gly	Ala	Asn	Ile	Ala
				420									425		430
Gly	Phe	Lys	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Met	Leu	Ala	Gln	Gly	Val	Ile	
				435									440		445

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una bacteria corineforme que tiene la capacidad de producir L-aminoácidos, en la que dicha bacteria corineforme está modificada para que la actividad de acetil-CoA hidrolasa disminuya en comparación con una cepa de tipo natural o no modificada como resultado de una mutación en la región codificante o una región reguladora de la expresión de un gen cromosómico de acetil-CoA hidrolasa, o como resultado de la alteración del gen cromosómico de acetil-CoA hidrolasa, y en la que dicho L-aminoácido es uno o más L-aminoácidos generados por ruta biosintética usando ácido pirúvico como intermedio, en la que dicho gen de acetil-CoA se selecciona entre el grupo que consiste en:
- (A) un gen que comprende los nucleótidos 1037 a 2542 de la SEQ ID NO: 23; y
- 10 (B) un ADN que puede hibridar en condiciones rigurosas con un polinucleótido que comprende los nucleótidos 1037 a 2542 de la SEQ ID NO: 23, y que codifica una proteína que tiene actividad de acetil-CoA hidrolasa.
2. La bacteria corineforme de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha acetil-CoA hidrolasa se selecciona entre el grupo que consiste en:
- (A) una proteína que comprende una secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 24; y
- 15 (B) una proteína que comprende una secuencia aminoacídica mostrada en la SEQ ID NO: 24, con lo que uno o varios aminoácidos en dicha proteína están sustituidos, eliminados, insertados o añadidos, y en la que dicha proteína tiene actividad de acetil-CoA hidrolasa.
- 20 3. La bacteria corineforme de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicha bacteria corineforme está modificada adicionalmente para aumentar la actividad de glutamato deshidrogenasa mediante su transformación con un plásmido que contiene un gen que codifica glutamato deshidrogenasa; integrando dicho gen en un cromosoma por recombinación homóloga, conjugación o transposición; o introduciendo una mutación en una región promotora de dicho gen o sustituyendo por un promotor fuerte.
4. La bacteria corineforme de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho L-aminoácido es uno o más L-aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en L-ácido glutámico, L-arginina, L-glutamina, L-prolina, L-alanina, L-valina y L-lisina.
- 25 5. Un procedimiento para producir un L-aminoácido que comprende: cultivar la bacteria corineforme de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 es un medio y recoger el L-aminoácido del medio, y en el que dicho L-aminoácido es uno o más L-aminoácidos generados mediante ácido pirúvico como intermedio.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos L-aminoácidos son uno o más aminoácidos seleccionados entre el grupo que consiste en L-ácido glutámico, L-arginina, L-glutamina, L-prolina, L-alanina, L-valina y L-lisina.

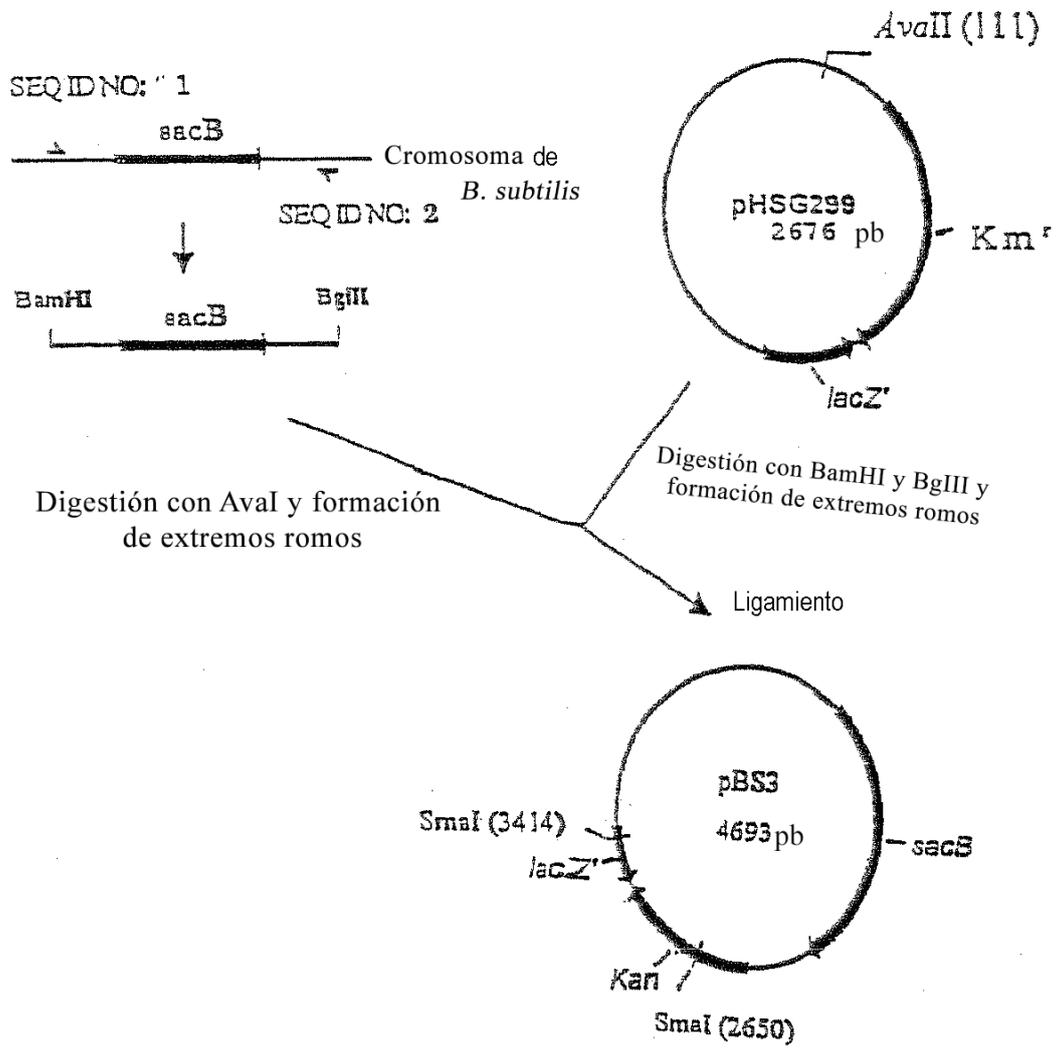


Figura 1

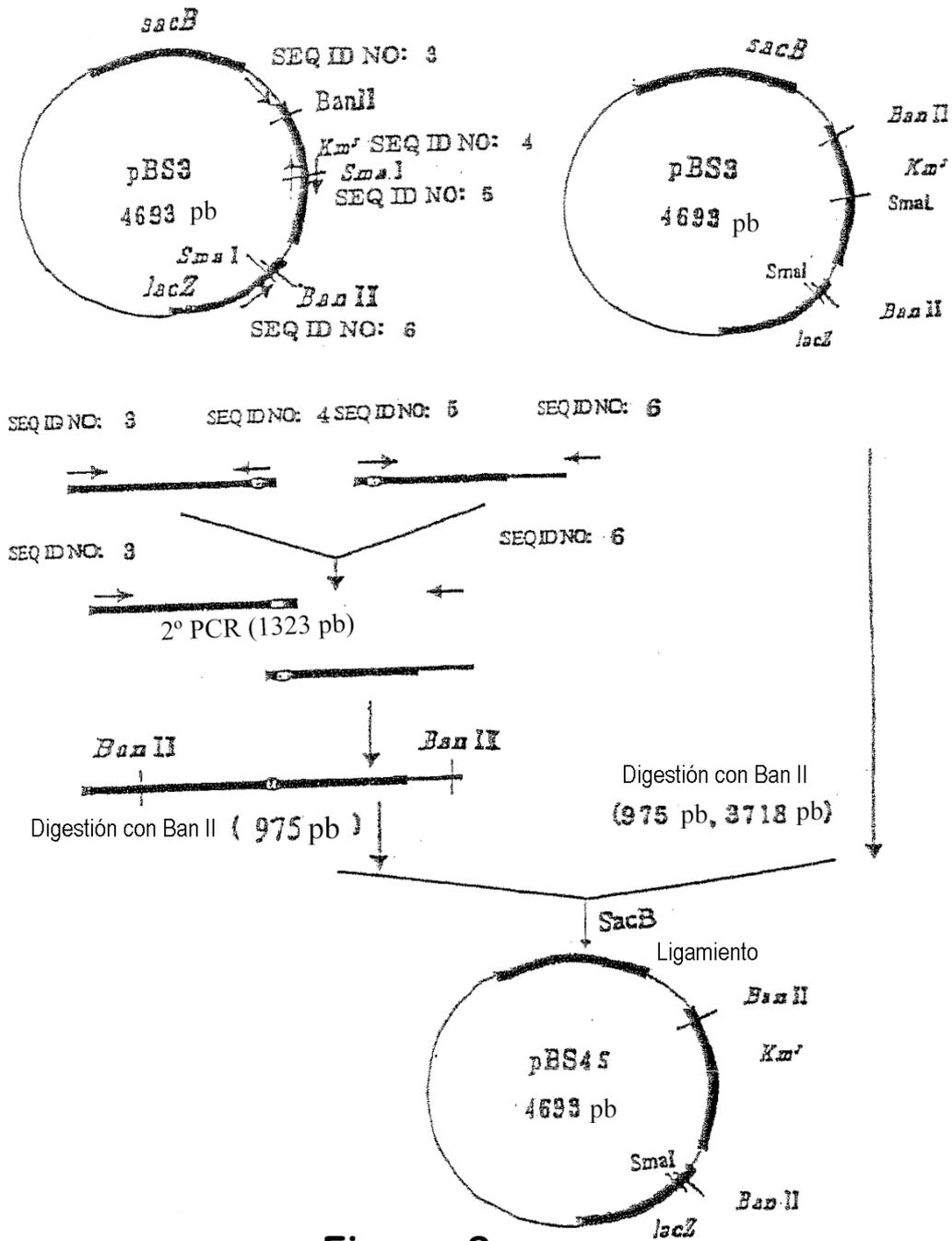


Figura 2

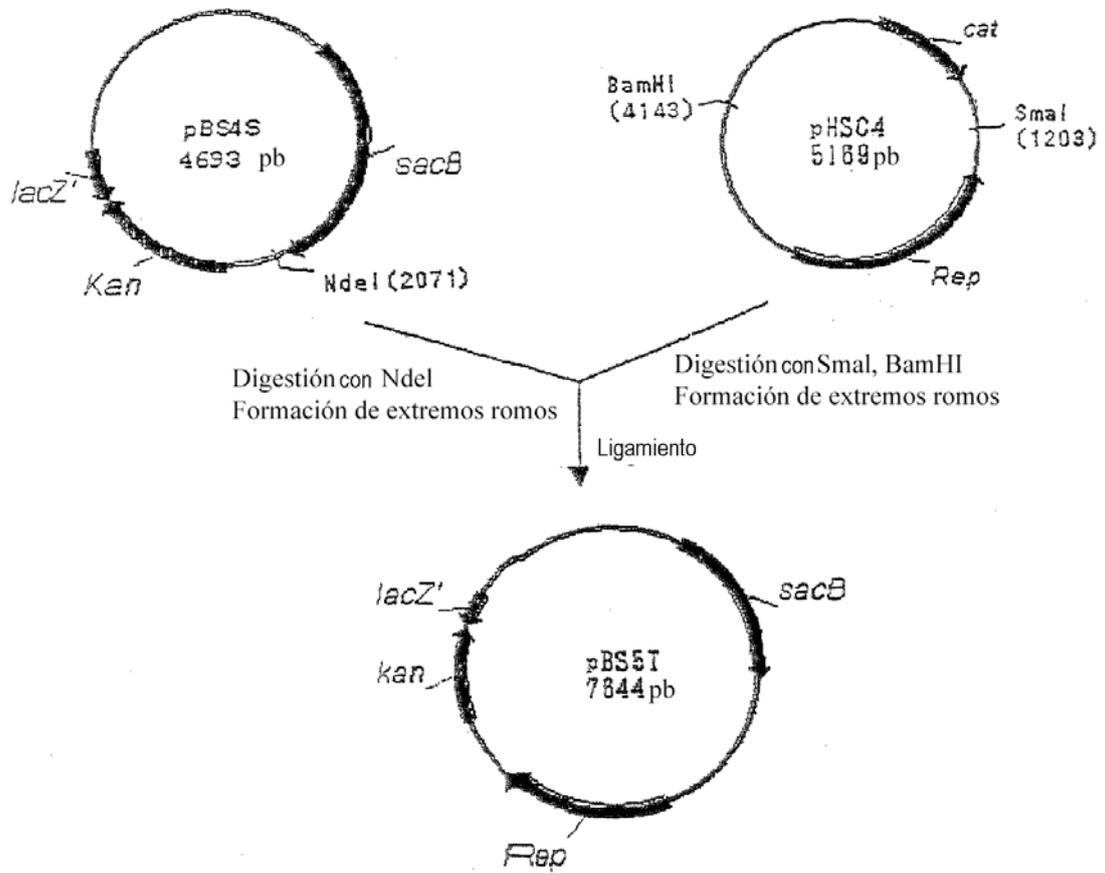


Figura 3

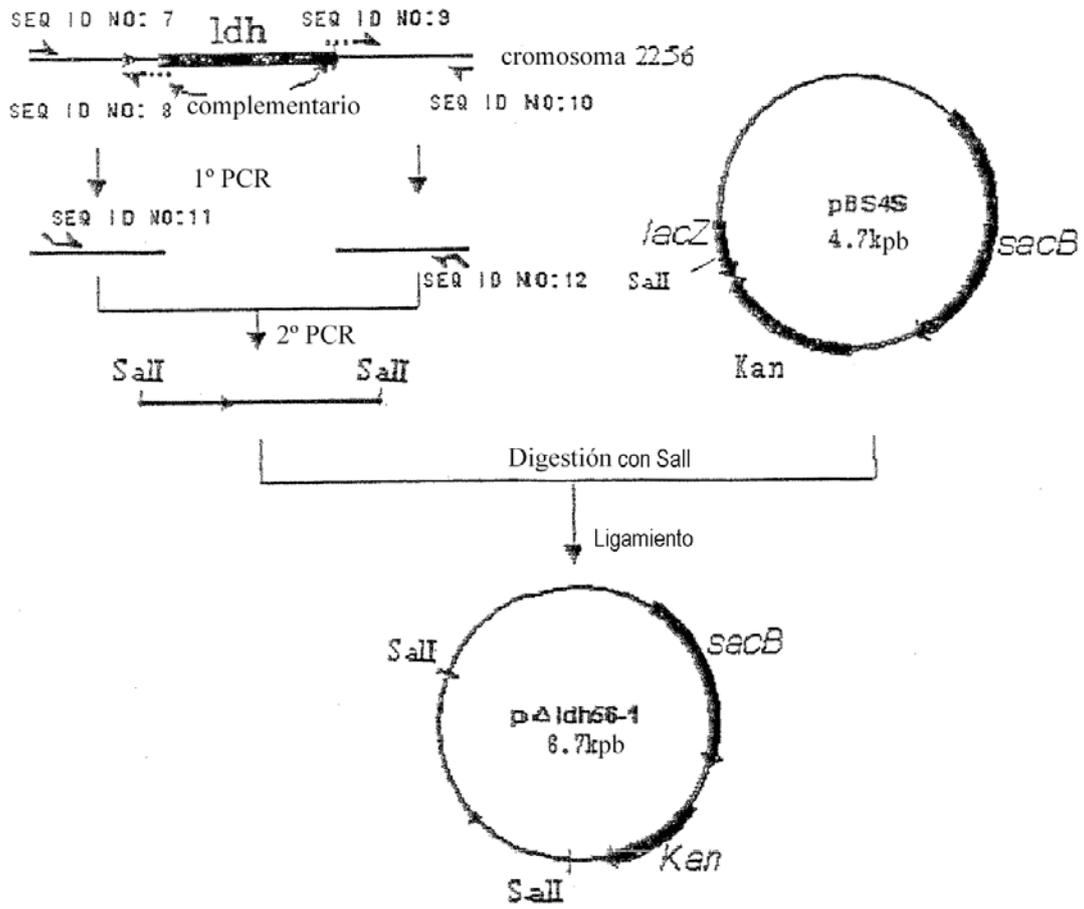


Figura 4

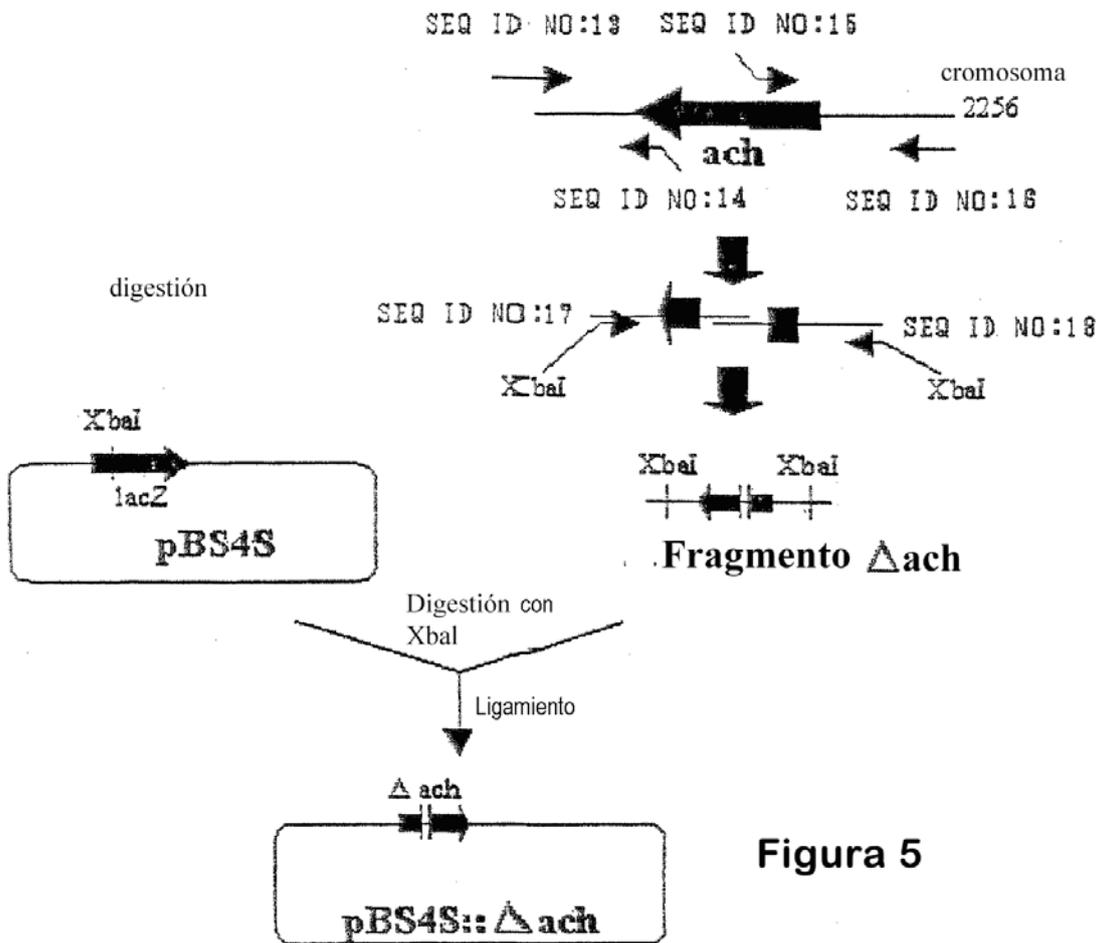


Figura 5