

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 323**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/77** (2006.01)

**C07K 14/34** (2006.01)

**C12P 13/10** (2006.01)

**C12P 13/14** (2006.01)

**C12P 13/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2016 E 16196254 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 3165608**

54 Título: **Método para producir L-aminoácido de la familia de glutamato**

30 Prioridad:

**30.10.2015 JP 2015215052**

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

**28.03.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HIRANO, SEIKO;  
HAYASHI, KAZUYUKI;  
TAKAYASHIKI, HITOSHI y  
FUKUI, KEITA**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**ES 2 706 323 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Método para producir L-aminoácido de la familia de glutamato

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para producir un L-aminoácido de la familia de glutamato tal como ácido L-glutámico usando una bacteria corineforme. Los L-aminoácidos son útiles industrialmente como materias primas de condimentos y otros.

10

**Técnica anterior**

Se producen industrialmente L-aminoácidos, por ejemplo, mediante fermentación usando microorganismos tales como bacterias corineformes que tienen una capacidad de producción de L-aminoácidos (documento no de patente 1). Como tales microorganismos, por ejemplo, se han usado cepas aisladas de la naturaleza y cepas mutantes de las mismas. Además, la capacidad de producción de L-aminoácidos de los microorganismos puede mejorarse usando técnicas de ADN recombinante. Por ejemplo, como medio para mejorar la capacidad de producción de ácido L-glutámico de bacterias corineformes, se conocen técnicas de potenciación de la actividad de fosfocetolasa (documento de patente 1) y uso de un gen *yggB* mutante (documento de patente 2).

15

20

El gen *kgtP* de *Escherichia coli* es un gen que codifica para un portador de captación de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ( $\alpha$ -KG) (documento no de patente 2). Se conoce  $\alpha$ -KG como producto intermedio de ácido L-glutámico en la biosíntesis de ácido L-glutámico. Sin embargo, no se conoce la relación entre un portador de captación de  $\alpha$ -KG y la producción de L-aminoácidos de la familia de glutamato.

25

**Referencias de la técnica anterior**

Documentos de patente

30

Documento de patente 1: WO2006/016705

Documento de patente 2: WO2006/070944

Documentos no de patente

35

Documento no de patente 1: Akashi, K. *et al.*, Amino Acid Fermentation. Japan Scientific Societies Press, págs. 195 a 215, 1986.

40

Documento no de patente 2: Seol W, Shatkin AJ. *Escherichia coli* *kgtP* encodes an alpha-ketoglutarate transporter. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 de mayo de 1991; 88(9):3802-6.

45

Schneider *et al.*, Journal of Biotechnology (2011), vol. 154, págs. 191-198 se refiere a la producción de los aminoácidos L-glutamato, L-lisina, L-ornitina y L-arginina a partir de arabinosa mediante *Corynebacterium glutamicum* recombinante que expresa araBAD de *E. coli*.

50

Seol *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU. (1991), vol. 88, págs. 3802-3806 es una publicación científica que se refiere al gen de *Escherichia coli* *witA/kgtP* y divulga que codifica para un transportador de alfa-cetoglutarato.

55

El documento WO 01/05959 A1 es una solicitud de patente que se refiere a un procedimiento para producir una sustancia objetivo usando un microorganismo, en el que se hace uso de un microorganismo variante o recombinante que muestra una descarga disminuida de un producto intermedio o un sustrato en el sistema de biosíntesis de la sustancia objetivo para mejorar de ese modo la productividad de la sustancia objetivo.

60

**Sumario de la invención**

Objeto que va a lograrse mediante la invención

65

Un objeto de la presente invención es desarrollar una técnica novedosa para mejorar la capacidad para producir un L-aminoácido de la familia de glutamato de una bacteria corineforme, y de ese modo proporcionar un método para producir eficazmente el L-aminoácido de la familia de glutamato.

Medios para lograr el objeto

70

Con el fin de lograr el objeto mencionado anteriormente, los inventores de la presente invención realizaron diversas investigaciones. Como resultado, encontraron que la capacidad para producir un L-aminoácido de la familia de

glutamato de una bacteria corineforme puede mejorarse modificando la bacteria corineforme de modo que se aumente la actividad de un portador de captación de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ( $\alpha$ -KG), y lograron la presente invención.

5 La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Puede realizarse, por ejemplo, tal como sigue.

[1] Un método para producir un L-aminoácido, comprendiendo el método:

10 cultivar una bacteria corineforme que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos en un medio; y  
recoger el L-aminoácido del medio, en el que la bacteria se ha modificado de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ( $\alpha$ -KG) en comparación con una cepa no modificada, y  
15 en el que el L-aminoácido es un L-aminoácido de la familia de glutamato.

[2] El método mencionado anteriormente, en el que el portador de captación de  $\alpha$ -KG es una proteína codificada por el gen *kgtP*.

20 [3] El método mencionado anteriormente, en el que el portador de captación de  $\alpha$ -KG es una proteína definida en (a), (b) o (c) mencionados a continuación:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

25 (b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, pero que incluye sustitución, delección, inserción y/o adición de 1 a 10 residuos de aminoácido, y que tiene actividad de captación de  $\alpha$ -KG;

(c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 90 % o más con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y que tiene actividad de captación de  $\alpha$ -KG.

30 [4] El método mencionado anteriormente, en el que se aumenta la actividad del portador de captación de  $\alpha$ -KG aumentando la expresión de un gen que codifica para el portador de captación de  $\alpha$ -KG.

35 [5] El método mencionado anteriormente, en el que se aumenta la expresión del gen aumentando el número de copias del gen y/o modificando una secuencia de control de la expresión del gen.

[6] El método mencionado anteriormente, en el que la bacteria se ha modificado adicionalmente de modo que la actividad de fosfocetolasa se aumenta en comparación con una cepa no modificada.

40 [7] El método mencionado anteriormente, en el que la fosfocetolasa consiste en D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa y/o fructosa-6-fosfato fosfocetolasa.

[8] El método mencionado anteriormente, en el que se aumenta la actividad de la fosfocetolasa aumentando la expresión de un gen que codifica para la fosfocetolasa.

45 [9] El método mencionado anteriormente, en el que la bacteria se ha modificado adicionalmente de modo que la actividad de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y/o succinato deshidrogenasa se reduce en comparación con una cepa no modificada.

50 [10] El método mencionado anteriormente, en el que la bacteria es una bacteria *Corynebacterium*.

[11] El método mencionado anteriormente, en el que la bacteria es *Corynebacterium glutamicum*.

55 [12] En el método de la invención, el L-aminoácido de la familia de glutamato consiste en uno o más L-aminoácidos seleccionados de ácido L-glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-citrulina, y L-ornitina.

[13] El método mencionado anteriormente, en el que el L-aminoácido de la familia de glutamato es ácido L-glutámico.

60 [14] El método mencionado anteriormente, en el que el ácido L-glutámico es L-glutamato monoamónico o L-glutamato monosódico.

[15] El método mencionado anteriormente, en el que la bacteria se ha modificado adicionalmente de modo que alberga un gen *yggB* mutante.

65 [16] El método mencionado anteriormente, en el que el gen *yggB* mutante es un gen *yggB* que tiene una mutación

que mejora la capacidad de producción de ácido L-glutámico de la bacteria corineforme.

[17] El método mencionado anteriormente, en el que el gen *yggB* mutante es un gen *yggB* que tiene una mutación definida en (1), (2) o (3) mencionados a continuación:

(1) una mutación en la región que codifica para los residuos de aminoácido en las posiciones 419 a 533 de una proteína YggB de tipo natural,

(2) una mutación en la región que codifica para una región transmembrana de una proteína YggB de tipo natural, y

(3) una combinación de las mismas.

[18] El método mencionado anteriormente, en el que la proteína YggB de tipo natural es una proteína definida en (a), (b) o (c) mencionados a continuación:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

(b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, pero que incluye sustitución, delección, inserción y/o adición de 1 a 10 residuos de aminoácido, y que tiene la propiedad de que una expresión aumentada de la misma en la bacteria corineforme proporciona una capacidad de producción de ácido L-glutámico mejorada de la bacteria corineforme;

(c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 90 % o más con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y que tiene la propiedad de que una expresión aumentada de la misma en la bacteria corineforme proporciona una capacidad de producción de ácido L-glutámico mejorada de la bacteria corineforme.

Según la presente invención, la capacidad para producir un L-aminoácido de la familia de glutamato de una bacteria corineforme puede mejorarse, y el L-aminoácido de la familia de glutamato puede producirse eficazmente.

### Modos para llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, se explicará la presente invención en detalle.

El método de la presente invención es un método para producir un L-aminoácido, comprendiendo el método cultivar una bacteria corineforme que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos en un medio, y recoger el L-aminoácido del medio, en el que la bacteria se ha modificado de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico ( $\alpha$ -KG), y en el que el L-aminoácido es un L-aminoácido de la familia de glutamato. La bacteria corineforme usada para el método también se denomina "bacteria de la presente invención".

<1> Bacteria de la presente invención

La bacteria de la presente invención es una bacteria corineforme que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos, que se ha modificado de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG.

<1-1> Bacteria corineforme que tiene capacidad de producción de L-aminoácidos

En la presente invención, el término "bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos" se refiere a una bacteria que tiene la capacidad de producir y acumular un L-aminoácido objetivo en un medio o células de la bacteria en un grado tal que el L-aminoácido puede recogerse, cuando la bacteria se cultiva en el medio. La bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos puede ser una bacteria que es capaz de acumular un L-aminoácido objetivo en un medio en una cantidad mayor que la obtenible con una cepa no modificada. El término "cepa no modificada" se refiere a una cepa de control que no se ha modificado de modo que se aumente la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG. Es decir, los ejemplos de la cepa no modificada incluyen cepas de tipo natural y cepas originales, tales como las cepas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 y ATCC 13032. La bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos puede ser una bacteria que puede acumular un L-aminoácido objetivo en un medio en una cantidad de preferiblemente 0,5 g/l o más, más preferiblemente 1,0 g/l o más.

El L-aminoácido que va a producirse en la presente invención es un L-aminoácido de la familia de glutamato. El término "L-aminoácido de la familia de glutamato" se refiere conjuntamente a ácido L-glutámico y L-aminoácidos que se biosintetizan por medio de ácido L-glutámico como producto intermedio. Los ejemplos de los L-aminoácidos que se biosintetizan por medio de ácido L-glutámico como producto intermedio incluyen L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-citrulina y L-ornitina. La bacteria de la presente invención puede tener la capacidad de producir sólo una clase de L-aminoácido, o puede tener la capacidad de producir dos o más clases de L-aminoácidos.

En la presente invención, el término “aminoácido” se refiere a un L-aminoácido, a menos que se establezca otra cosa. En la presente invención, el término “L-aminoácido” se refiere a un L-aminoácido en una forma libre, a una sal del mismo o una mezcla del mismo, a menos que se establezca otra cosa. Los ejemplos de la sal se describirán posteriormente.

5 Los ejemplos de la bacteria corineforme incluyen bacterias que pertenecen al género *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, o similares.

10 Los ejemplos específicos de las bacterias corineformes incluyen las siguientes especies.

- 10 *Corynebacterium acetoacidophilum*
- Corynebacterium acetoglutamicum*
- 15 *Corynebacterium alkanolyticum*
- Corynebacterium callunae*
- Corynebacterium crenatum*
- 20 *Corynebacterium glutamicum*
- Corynebacterium lilium*
- 25 *Corynebacterium melassecola*
- Corynebacterium thermoaminogenes (Corynebacterium efficiens)*
- Corynebacterium herculis*
- 30 *Brevibacterium divaricatum (Corynebacterium glutamicum)*
- Brevibacterium flavum (Corynebacterium glutamicum)*
- 35 *Brevibacterium immariophilum*
- Brevibacterium lactofermentum (Corynebacterium glutamicum)*
- Brevibacterium roseum*
- 40 *Brevibacterium saccharolyticum*
- Brevibacterium thiogenitalis*
- 45 *Corynebacterium ammoniagenes (Corynebacterium stationis)*
- Brevibacterium album*
- Brevibacterium cerinum*
- 50 *Microbacterium ammoniaphilum*

Los ejemplos específicos de las bacterias corineformes incluyen las siguientes cepas.

- 55 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870
- Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806
- Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511
- 60 *Corynebacterium callunae* ATCC 15991
- Corynebacterium crenatum* AS1.542
- 65 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM BP-734

*Corynebacterium lilium* ATCC 15990

*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965

5 *Corynebacterium efficiens* (*Corynebacterium thermoaminogenes*) AJ12340 (FERM BP-1539)

*Corynebacterium herculis* ATCC 13868

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC 14020

10 *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

*Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068

15 *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869

*Brevibacterium roseum* ATCC 13825

*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066

20 *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240

*Corynebacterium ammoniagenes* (*Corynebacterium stationis*) ATCC 6871, ATCC 6872

25 *Brevibacterium album* ATCC 15111

*Brevibacterium cerinum* ATCC 15112

*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354

30 Las bacterias de *Corynebacterium* incluyen bacterias que se han clasificado previamente en el género *Brevibacterium*, pero en la actualidad están unidas al género *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991)). Además, *Corynebacterium stationis* incluye una bacteria de este tipo que se ha clasificado previamente en *Corynebacterium ammoniagenes*, pero que se reclasifica en la actualidad en *Corynebacterium stationis* basándose en el análisis de secuencia de nucleótidos de ARNr 16S, etc. (Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60, 874-879 (2010)).

35 Estas cepas están disponibles, por ejemplo, de la Colección americana de cultivos tipo (dirección: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos de América). Es decir, se asignan números de registro a las cepas respectivas, y las cepas pueden ordenarse usando estos números de registro (se remite a <http://www.atcc.org/>). Los números de registro de las cepas se enumeran en el catálogo de la Colección americana de cultivos tipo. Estas cepas pueden obtenerse también a partir de, por ejemplo, los depósitos en los que se depositaron las cepas.

40 La bacteria de la presente invención puede ser una bacteria que tiene inherentemente una capacidad de producción de L-aminoácidos, o puede ser una bacteria modificada de modo que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos. La bacteria que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos puede obtenerse confiriendo una capacidad de producción de L-aminoácidos a una bacteria de este tipo tal como se mencionó anteriormente, o potenciando la capacidad de producción de L-aminoácidos de una bacteria de este tipo tal como se mencionó anteriormente.

45 Para conferir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácidos, pueden usarse métodos empleados convencionalmente en el cultivo de cepas productoras de aminoácidos de bacterias corineformes, bacterias de *Escherichia* y otras (véase "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1ª edición, publicado el 30 de mayo de 1986, págs. 77-100). Los ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, adquirir una cepa mutante auxotrófica, adquirir una cepa resistente a análogos de L-aminoácidos, adquirir una cepa mutante de regulación metabólica y construir una cepa recombinante en la que se potencia la actividad de una enzima de biosíntesis de L-aminoácidos. En el cultivo de bacterias que producen L-aminoácidos, una de las propiedades descritas anteriormente tales como auxotrofia, resistencia a análogos y mutación de regulación metabólica puede conferirse sola, o dos o tres o más de tales propiedades pueden conferirse en combinación. La actividad de una de las enzimas de biosíntesis de L-aminoácidos puede potenciarse sola, o las actividades de dos o tres o más de tales enzimas pueden potenciarse en combinación. Además, conferir propiedad(es) tal(s) como auxotrofia, resistencia a análogos y mutación de regulación metabólica pueden combinarse con potenciar la(s) actividad(es) de enzima(s) de biosíntesis.

50 Puede obtenerse una cepa mutante auxotrófica, cepa resistente a análogos o cepa mutante de regulación metabólica que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos sometiendo una cepa original o cepa de tipo natural a un tratamiento de mutagénesis habitual, y luego seleccionando una cepa que presenta autotrofia,

resistencia a análogos o una mutación de regulación metabólica, y que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos a partir de las cepas mutantes obtenidas. Los ejemplos del tratamiento de mutagénesis habitual incluyen irradiación de rayos X o ultravioleta y un tratamiento con un agente de mutación tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), metanosulfonato de etilo (EMS) y metanosulfonato de metilo (MMS).

También puede conferirse o potenciarse una capacidad de producción de L-aminoácidos potenciando la actividad de una enzima implicada en la biosíntesis de un L-aminoácido objetivo. La actividad de una enzima puede potenciarse, por ejemplo, modificando una bacteria de modo que se potencia la expresión de un gen que codifica para la enzima. Se describen métodos para potenciar la expresión génica en los documentos WO00/18935, EP 1010755 y otros. Los procedimientos detallados para potenciar la actividad enzimática se describirán posteriormente.

Además, la capacidad de producción de L-aminoácidos también puede conferirse o potenciarse reduciendo la actividad de una enzima que cataliza una reacción que se desvía de la ruta de biosíntesis de un L-aminoácido objetivo para generar un compuesto distinto del L-aminoácido objetivo. El término "enzima que cataliza una reacción que se desvía de la ruta de biosíntesis de un L-aminoácido objetivo para generar un compuesto distinto del L-aminoácido objetivo" al que se hace referencia en el presente documento también incluye enzimas implicadas en la descomposición del aminoácido objetivo. El método para reducir la actividad de una enzima se describirá posteriormente.

A continuación en el presente documento, se ejemplificarán específicamente bacterias que producen L-aminoácidos y métodos para conferir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácidos. Todas las propiedades de las bacterias que producen L-aminoácidos y modificaciones para conferir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácidos pueden usarse independientemente o en cualquier combinación apropiada.

<Bacterias que producen ácido L-glutámico>

Los ejemplos de métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de ácido L-glutámico incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tenga una actividad o actividades aumentadas de una o más clases de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de ácido L-glutámico.

Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, glutamato deshidrogenasa (*gdhA*), glutamina sintetasa (*glnA*), glutamato sintasa (*gltBD*), isocitrato deshidrogenasa (*icdA*), aconitato hidratasa (*acnA*, *acnB*), citrato sintasa (*gltA*), metilcitrato sintasa (*prpC*), piruvato carboxilasa (*pyc*), piruvato deshidrogenasa (*aceEF*, *lpdA*), piruvato cinasa (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintasa (*ppsA*), enolasa (*eno*), fosfogliceromutasa (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato cinasa (*pgk*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapA*), triosa fosfato isomerasa (*tpiA*), fructosa bisfosfato aldolasa (*fbp*), glucosa fosfato isomerasa (*pgi*), 6-fosfogluconato deshidratasa (*edd*), 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (*eda*) y transhidrogenasa. Se muestran en los paréntesis tras los nombres de las enzimas ejemplos de los nombres de los genes que codifican para las enzimas (estos se aplicarán en las mismas ocasiones de ahora en adelante). Es preferible potenciar la actividad o actividades de una o más clases de enzimas seleccionadas de, por ejemplo, glutamato deshidrogenasa, citrato sintasa, fosfoenol piruvato carboxilasa y metilcitrato sintasa, entre estas enzimas.

Los ejemplos de bacterias corineformes modificadas de modo que se aumenta la expresión del gen de glutamato sintetasa (*gltBD*) incluyen los divulgados en el documento WO99/07853.

Los ejemplos de métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de ácido L-glutámico también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tenga una actividad o actividades reducidas de una o más clases de enzimas seleccionadas de las enzimas que catalizan una reacción que se desvía de la ruta de biosíntesis de L-glutamina para generar un compuesto distinto de ácido L-glutámico. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, isocitrato liasa (*aceA*),  $\alpha$ -cetogluturato deshidrogenasa (*sucA*, *odhA*), acetolactato sintasa (*ilvI*), formiato acetiltransferasa (*pfl*), lactato deshidrogenasa (*ldh*), alcohol deshidrogenasa (*adh*), glutamato decarboxilasa (*gadAB*) y succinato deshidrogenasa (*sdhABCD*). Es preferible reducir o deleccionar, por ejemplo, la actividad de  $\alpha$ -cetogluturato deshidrogenasa, entre estas enzimas.

En el documento WO2008/075483 se divulgan bacterias corineformes en las que la actividad de  $\alpha$ -cetogluturato deshidrogenasa se reduce o se elimina, y métodos para obtenerlas. Los ejemplos específicos de bacterias corineformes en las que la actividad de  $\alpha$ -cetogluturato deshidrogenasa se reduce o se elimina incluyen, por ejemplo, las siguientes cepas.

Cepa de *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) L30-2 (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2006-340603)

Cepa de *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*)  $\Delta$ S (documento WO95/34672)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12821 (FERM BP-4172, patente francesa n.º 9401748)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ12822 (FERM BP-4173, patente francesa n.º 9401748)

*Corynebacterium glutamicum* AJ12823 (FERM BP-4174, patente francesa n.º 9401748)

5 Cepa de *Corynebacterium glutamicum* L30-2 (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2006-340603)

10 Los ejemplos de bacterias que producen ácido L-glutámico y cepas originales para derivarlas incluyen también cepas en la que tanto la actividad de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (*sucA*) como la actividad de succinato deshidrogenasa (*sdh*) se reducen o se eliminan (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2010-041920). Los ejemplos específicos de tales cepas incluyen, por ejemplo, la cepa de *Corynebacterium glutamicum* 8L3G $\Delta$ SDH, que es la cepa con doble deficiencia *odhAsdhA* de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2010-041920).

15 Los ejemplos de métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-glutamina también incluyen, por ejemplo, un método de potenciación de la expresión del gen *yhfK* (documento WO2005/085419) o el gen *ybjL* (documento WO2008/133161), que es un gen de secreción de ácido L-glutámico.

20 Además, los ejemplos de métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de ácido L-glutámico a o en bacterias corineformes también incluyen métodos de conferir resistencia a un análogo de ácido orgánico, inhibidor de la respiración, o similar, y métodos de conferir sensibilidad a un inhibidor de la síntesis de pared celular. Los ejemplos específicos de tales métodos incluyen, por ejemplo, el método de conferir resistencia a ácido monofluoroacético (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 50-113209), el método de conferir resistencia a adenina o resistencia a timina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-065198), el método de atenuar ureasa (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 52-038088), el método de conferir resistencia a ácido malónico (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 52-038088), el método de conferir resistencia a benzopironas o naftoquinonas (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-1889), el método de conferir resistencia a HOQNO (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-140895), el método de conferir resistencia a ácido  $\alpha$ -cetomalónico (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-2689), el método de conferir resistencia a guanidina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-35981), el método de conferir sensibilidad a penicilina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 4-88994) y otros.

35 Los ejemplos específicos de tales bacterias resistentes o sensibles incluyen las siguientes cepas.

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ3949 (FERM BP-2632, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 50-113209)

40 *Corynebacterium glutamicum* AJ11628 (FERM P-5736, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-065198)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11355 (FERM P-5007, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-1889)

45 *Corynebacterium glutamicum* AJ11368 (FERM P-5020, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-1889)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11217 (FERM P-4318, se remita a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-2869)

*Corynebacterium glutamicum* AJ11218 (FERM P-4319, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-2869)

55 *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11564 (FERM BP-5472, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-140895)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11439 (FERM BP-5136, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-35981)

60 *Corynebacterium glutamicum* H7684 (FERM BP-3004, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 04-88994)

65 *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11426 (FERM P-5123, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-048890)

*Corynebacterium glutamicum* AJ11440 (FERM P-5137, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-048890)

5 *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ11796 (FERM P-6402, se remite a la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 58-158192)

Además, los ejemplos de métodos para conferir o potenciar capacidad de producción de ácido L-glutámico a o en bacterias corineformes también incluyen un método de potenciación de la expresión del gen *yggB* y un método de introducción de un gen *yggB* mutante que tiene una mutación en la región codificante (documento WO2006/070944).  
10 Es decir, la bacteria de la presente invención puede haberse modificado de modo que la expresión del gen *yggB* se aumenta, o puede haberse modificado para albergar (tener) un gen *yggB* mutante.

El gen *yggB* es un gen que codifica para un canal mecanosensible. Los ejemplos del gen *yggB* incluyen genes *yggB* de bacterias corineformes. Los ejemplos específicos de los genes *yggB* de bacterias corineformes incluyen, por ejemplo, genes *yggB* de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC14967 y *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 (documento WO2006/070944). El gen *yggB* de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 corresponde a la secuencia complementaria a la secuencia de los números de nucleótido 1.336.091 a 1.337.692 en la secuencia de genoma registrada como n.º de registro de Genbank NC\_003450 en la base de datos del NCBI, y también se denomina *NCgl1221*. La proteína YggB codificada por el gen *yggB* de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 está registrada como n.º de registro de GenBank NP\_600492. Además, la secuencia de nucleótidos del gen *yggB* de *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869) y la secuencia de aminoácidos de la proteína YggB codificada por el gen se muestran en SEQ ID NO: 11 y 12, respectivamente.

25 En la presente invención, un gen *yggB* que tiene la “mutación específica” descrita posteriormente también se denomina “gen *yggB* mutante”, y una proteína codificada por él también se denomina “proteína YggB mutante”. Además, en la presente invención, un gen *yggB* que no tiene la “mutación específica” descrita posteriormente también se denomina “gen *yggB* de tipo natural”, y una proteína codificada por él también se denomina “proteína YggB de tipo natural”. Además, como para la proteína YggB, el cambio de la secuencia de aminoácidos provocado por la “mutación específica” en el gen *yggB* también se denomina “mutación específica”. El término “tipo natural” al que se hace referencia en el presente documento se usa por conveniencia para distinguir el gen *yggB* o la proteína YggB “de tipo natural” del gen *yggB* o la proteína YggB “mutantes”, y el gen *yggB* o la proteína YggB “de tipo natural” no se limitan a los obtenidos como sustancias naturales, siempre que no tengan la “mutación específica”. Los ejemplos de la proteína YggB de tipo natural incluyen las proteínas YggB ejemplificadas anteriormente, tal como proteína YggB que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. Los ejemplos de la proteína YggB de tipo natural también incluyen variantes conservadoras (variantes en las que la función original de las mismas se mantiene) de las proteínas YggB ejemplificadas anteriormente, siempre que las variantes conservadoras no tengan la “mutación específica”. La “función original” con respecto a la proteína YggB puede ser, por ejemplo, una función como canal mecanosensible o la propiedad de que una expresión aumentada de la misma en una bacteria corineforme proporcione una capacidad de producción de ácido L-glutámico mejorada de la bacteria corineforme.

La “mutación específica” no está particularmente limitada, siempre que cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína YggB tal como las descritas anteriormente para mejorar de ese modo la capacidad de producción de ácido L-glutámico de una bacteria corineforme. Los ejemplos de la “mutación específica” incluyen mutación en el extremo C-terminal y mutación en una región transmembrana. La “mutación específica” también puede ser una combinación de estas.

#### (1) Mutación en el extremo C-terminal

50 La mutación en el extremo C-terminal es una mutación introducida en la región del gen *yggB* de tipo natural que codifica para los residuos de aminoácido de las posiciones 419 a 533 de la proteína YggB de tipo natural. La mutación en el extremo C-terminal puede introducirse en uno o más sitios en la región. El tipo de cambio de la secuencia de aminoácidos inducido por la mutación en el extremo C-terminal no está particularmente limitado. La mutación en el extremo C-terminal puede ser una mutación que provoca sustitución de aminoácidos (mutación de cambio de sentido), inserción de residuo de aminoácido, delección de residuo de aminoácido, introducción de codón de terminación (mutación sin sentido), mutación del marco de lectura, o una combinación de estas. La mutación en el extremo C-terminal es preferiblemente, por ejemplo, una mutación para insertar una secuencia de nucleótidos tal como una secuencia de inserción (en lo sucesivo también denominada “IS”) o transposón.

#### 60 (1-1) Inserción de secuencia de nucleótidos

Los ejemplos de la mutación en el extremo C-terminal incluyen, por ejemplo, una mutación que inserta una secuencia de nucleótidos en el sitio que codifica para el residuo de valina en la posición 419 de la proteína YggB de tipo natural (mutación de tipo 2A-1). La mutación de tipo 2A-1 puede ser, por ejemplo, una mutación que provoca delección o sustitución de una parte o todos los residuos de aminoácido de las posiciones 419 a 533 de la proteína YggB de tipo natural. Los ejemplos específicos del gen *yggB* mutante que tiene la mutación de tipo 2A-1 incluyen,

por ejemplo, el gen *yggB* que incluye IS insertada en la siguiente "G" en la posición 1255 en SEQ ID NO: 11, y que codifica de ese modo para una proteína YggB mutante que tiene una longitud completa de 423 residuos de aminoácido, que es más corta que la proteína YggB de tipo natural original (SEQ ID NO: 12). La secuencia de nucleótidos de este gen *yggB* mutante (V419::IS) y la secuencia de aminoácidos de la proteína YggB mutante codificada por el gen se muestran en SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente. En la SEQ ID NO: 13, las posiciones 1 a 1269 corresponden a CDS para esta proteína YggB mutante (V419:: IS).

#### (1-2) Sustitución de residuos de prolina

Los ejemplos de la mutación en el extremo C-terminal también incluyen, por ejemplo, una mutación que reemplaza a un residuo de prolina presente en las posiciones 419 a 533 de la proteína YggB de tipo natural por otro residuo de aminoácido. Los ejemplos de un residuo de prolina de este tipo incluyen los residuos de prolina en las posiciones 424, 437, 453, 457, 462, 469, 484, 489, 497, 515, 529 y 533 de la proteína YggB de tipo natural. Es especialmente preferible reemplazar el/los residuo(s) de prolina de la(s) posición(es) 424 y/o 437 por otro(s) residuo(s) de aminoácido. El "otro aminoácido" no está particularmente limitado siempre que sea un aminoácido que se produce de manera natural distinto de prolina. Los ejemplos del "otro aminoácido" incluyen Lys, Glu, Thr, Val, Leu, Ile, Ser, Asp, Asn, Gln, Arg, Cys, Met, Phe, Trp, Tyr, Gly, Ala e His. Por ejemplo, el residuo de prolina en la posición 424 puede reemplazarse por preferiblemente un residuo de aminoácido hidrófobo (Ala, Gly, Val, Leu o Ile), más preferiblemente un residuo de aminoácido de cadena ramificada (Leu, Val o Ile). Además, por ejemplo, el residuo de prolina en la posición 437 puede reemplazarse preferiblemente por un residuo de un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral (Thr, Ser o Tyr), más preferiblemente por un residuo de Ser.

#### (2) Mutación en la región transmembrana

Se estima que la proteína YggB tiene cinco regiones transmembrana. Las regiones transmembrana corresponden a los residuos de aminoácido de las posiciones 1 a 23 (primera región transmembrana), las posiciones 25 a 47 (segunda región transmembrana), las posiciones 62 a 84 (tercera región transmembrana), las posiciones 86 a 108 (cuarta región transmembrana) y las posiciones 110 a 132 (quinta región transmembrana) de la proteína YggB de tipo natural. La mutación en una región transmembrana es una mutación en las regiones que codifican para estas regiones transmembrana del gen *yggB* de tipo natural. La mutación en la región transmembrana puede introducirse en uno o más sitios en las regiones. La mutación en la región transmembrana es preferiblemente una mutación que induce sustitución, delección, adición, inserción o inversión de uno o varios residuos de aminoácido, pero no incluye ninguna mutación del marco de lectura o mutación sin sentido. El número que se quiere decir mediante el término "uno o varios" es preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10, todavía más preferiblemente de 1 a 5, de manera particularmente preferible de 1 a 3. Los ejemplos de la mutación en una región transmembrana incluyen una mutación que inserta uno o varios residuos de aminoácido, tales como Cys-Ser-Leu, entre el residuo de leucina en la posición 14 y el residuo de triptófano en la posición 15; una mutación que reemplaza el residuo de alanina en la posición 100 por otro residuo de aminoácido, tal como un residuo de un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral (es decir Thr, Ser o Tyr), preferiblemente residuo de Thr; una mutación que reemplaza el residuo de alanina en la posición 111 por otro residuo de aminoácido tal como un residuo de un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo en la cadena lateral (es decir Thr, Ser o Tyr), preferiblemente residuo de Thr; en la proteína YggB de tipo natural.

En la presente invención, un "residuo de aminoácido en la posición X de la proteína YggB de tipo natural" significa el residuo de aminoácido correspondiente al de la posición X en SEQ ID NO: 12, a menos que se establezca otra cosa. La "posición X" en una secuencia de aminoácidos es la posición número X contada desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos, y el residuo de aminoácido del extremo N-terminal es el residuo de aminoácido de la posición 1. Es decir, las posiciones de residuos de aminoácido mencionadas anteriormente indican posiciones relativas, y las posiciones absolutas de los mismos pueden desplazarse debido a delección, inserción, adición, o similar de un residuo o residuos de aminoácido. Por ejemplo, el "residuo de aminoácido correspondiente al de la posición 419 de la proteína YggB de tipo natural" significa el residuo de aminoácido correspondiente al de la posición 419 en SEQ ID NO: 12, y cuando se deleciona un residuo de aminoácido en una posición en el extremo N-terminal de la posición 419, el residuo de aminoácido número 418 a partir del extremo N-terminal es "el residuo de aminoácido en la posición 419 de la proteína YggB de tipo natural". Además, cuando se inserta un residuo de aminoácido en una posición en el extremo N-terminal de la posición 419, el residuo de aminoácido número 420 a partir del extremo N-terminal es "el residuo de aminoácido en la posición 419 de la proteína YggB de tipo natural". Específicamente, por ejemplo, residuos de aminoácido de las posiciones 419 a 529 de la proteína YggB de *Corynebacterium glutamicum* ATCC14967 corresponden a residuos de aminoácido de las posiciones 419 a 533 de la proteína YggB de tipo natural.

Puede determinarse qué residuo de aminoácido es "el residuo de aminoácido correspondiente al de la posición X en SEQ ID NO: 12" en la secuencia de aminoácidos de una proteína YggB arbitraria mediante alineación entre la secuencia de aminoácidos de la proteína YggB arbitraria y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. La alineación puede realizarse, por ejemplo, usando software de análisis genético conocido. Los ejemplos específicos de tal software incluyen DNASIS producido por Hitachi Solutions, GENETYX producido por Genetyx otros (Elizabeth C. Tyler *et al.*, Computers and Biomedical Research, 24 (1) 72-96, 1991; Barton GJ *et al.*, Journal of Molecular Biology,

198 (2), 327-37, 1987).

Puede obtenerse un gen *yggB* mutante modificando un gen *yggB* de tipo natural para que tenga la "mutación específica" mencionada anteriormente. La modificación del ADN puede realizarse mediante un método conocido. Por ejemplo, puede introducirse una mutación objetivo en un sitio objetivo del ADN mediante un método de mutación específica de sitio. Los ejemplos específicos del método de mutación específica de sitio incluyen, por ejemplo, un método de uso de RCP (Higuchi, R., 61, en PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press, 1989; Carter P., Meth. In Enzymol., 154, 382, 1987), y un método de uso de un fago (Kramer, W. y Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350, 1987; Kunkel, T.A. *et al.*, Meth. in Enzymol., 154, 367, 1987). Además, también puede obtenerse un gen de *yggB* mutante mediante síntesis química.

Tal modificación de una bacteria de que la bacteria tenga un gen *yggB* mutante puede lograrse introduciendo el gen *yggB* mutante en la bacteria. Tal modificación de una bacteria de que la bacteria tenga un gen *yggB* mutante también puede lograrse introduciendo una mutación en el gen *yggB* de la bacteria a través de mutación natural o un tratamiento con un mutágeno.

<Bacterias que producen L-glutamina>

Los ejemplos del método para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-glutamina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la actividad o actividades de una o más clases de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-glutamina se potencian. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) y glutamina sintetasa (*glnA*). La actividad glutamina sintetasa también puede potenciarse mediante alteración del gen de glutamina adenililtransferasa (*glnE*) o alteración del gen de la proteína de control PII (*glnB*) (documento EP 1229121).

Los ejemplos del método para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-glutamina también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la actividad o actividades de una o más clases de enzimas que catalizan una reacción que se desvía de la ruta de biosíntesis de L-glutamina para generar un compuesto distinto de L-glutamina se reducen. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, glutaminasa.

Los ejemplos específicos de bacterias que producen L-glutamina y cepas originales para derivarlas incluyen, por ejemplo, bacterias corineformes en las que la actividad o actividades de glutamato deshidrogenasa (*gdhA*) y/o glutamina sintetasa (*glnA*) (documentos EP 1229121, EP 1424398) se potencian, y bacterias corineformes en las que la actividad de glutaminasa (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2004-187684) se reduce.

Los ejemplos de los métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-glutamina a o en bacterias corineformes también incluyen el método de conferir resistencia a 6-diazo-5-oxo-norleucina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 3-232497), el método de conferir resistencia a análogos de purina y resistencia a sulfóxido de metionina (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 61-202694), y el método de conferir resistencia a ácido  $\alpha$ -cetomalónico (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-151495). Los ejemplos específicos de bacterias corineformes que tienen capacidad de producción de L-glutamina incluyen, por ejemplo, las siguientes cepas.

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11573 (FERM P-5492, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-151495)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11576 (FERM BP-10381, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 56-151495)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ12212 (FERM P-8123, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 61-202694)

<Bacterias que producen L-prolina>

Los ejemplos de métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-prolina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de una o más clases de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-prolina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen glutamato-5-cinasa (*proB*),  $\gamma$ -glutamilfosfato reductasa, y pirrolina-5-carboxilato reductasa (*putA*). Para potenciar la actividad de una enzima de este tipo, por ejemplo, puede usarse preferiblemente el gen *proB* que codifica para una glutamato cinasa desensibilizada para la inhibición por retroalimentación mediante L-prolina (patente alemana n.º 3127361).

Los ejemplos de métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-glutamina también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad reducida de una

enzima implicada en la descomposición de L-prolina. Los ejemplos de una enzima de este tipo incluyen prolina deshidrogenasa y ornitina aminotransferasa.

<Bacterias que producen L-arginina>

5 Los ejemplos de métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-arginina incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la bacteria tiene una actividad o actividades aumentadas de una o más clases de enzimas seleccionadas de las enzimas de biosíntesis de L-arginina. Los ejemplos de tales enzimas incluyen, pero no se limitan particularmente a, N-acetilglutamato sintasa (*argA*), N-acetilglutamilo fosfato reductasa (*argC*), ornitina acetilo transferasa (*argJ*), N-acetilglutamato cinasa (*argB*), acetilornitina transaminasa (*argD*), acetilornitina desacetilasa (*argE*), ornitina carbamoilo transferasa (*argF*), argininosuccinato sintetasa (*argG*), argininosuccinato liasa (*argH*) y carbamoilo fosfato sintetasa (*carAB*). Como gen de N-acetilglutamato sintasa (*argA*), por ejemplo, puede usarse preferiblemente un gen que codifica para una N-acetilglutamato sintasa mutante desensibilizada para la inhibición por retroalimentación mediante L-arginina por sustitución de los residuos de aminoácido correspondientes a las posiciones 15 a 19 de la enzima de tipo natural (patente europea abierta a consulta por el público n.º 1170361).

20 Los ejemplos de bacterias que producen L-arginina y cepas originales para derivarlas también incluyen bacterias corineformes tales como una cepa deficiente en ArgR, que es un represor de arginina (solicitud de patente publicada estadounidense n.º 20020045223), y una cepa en la que se aumenta la actividad de glutamina sintetasa (solicitud de patente publicada estadounidense n.º 20050014236).

25 Los ejemplos de bacterias que producen L-arginina y cepas originales para derivarlas también incluyen cepas mutantes de bacterias corineformes, teniendo las cepas mutantes resistencia a un análogo de aminoácido o similar. Los ejemplos de tales cepas incluyen, por ejemplo, cepas que tienen resistencia a 2-tiazolalanina y que presentan además auxotrofia para L-histidina, L-prolina, L-treonina, L-isoleucina, L-metionina o L-triptófano (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 54-44096); cepas resistentes a ácido cetomalónico, ácido fluoromalónico o ácido monofluoroacético (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-18989); cepas resistentes a argininoil (publicación de patente japonesa n.º 62-24075); cepas resistentes a X-guanidina (X representa una cadena alifática o un derivado de la misma, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2-186995); y cepas resistentes a hidroxamato de arginina y 6-azauracilo (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-150381). Los ejemplos específicos de bacterias corineformes que tienen capacidad de producción de L-arginina incluyen las siguientes cepas.

35 *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11169 (FERM BP-6892)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12092 (FERM BP-6906)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11336 (FERM BP-6893)

40 *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium flavum*) AJ11345 (FERM BP-6894)

*Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) AJ12430 (FERM BP-2228)

45 <Bacterias que producen L-citrulina y bacterias que producen L-ornitina>

50 Las rutas de biosíntesis de L-citrulina y L-ornitina son comunes a la de L-arginina. Por tanto, la capacidad para producir L-citrulina y/o L-ornitina puede conferirse o potenciarse aumentando la actividad o actividades de N-acetilglutamato sintasa (*argA*), N-acetilglutamilo fosfato reductasa (*argC*), ornitina acetiltransferasa (*argJ*), N-acetilglutamato cinasa (*argB*), acetilornitina transaminasa (*argD*) y/o acetilornitina desacetilasa (*argE*) (documento WO2006/35831).

55 Los métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de ácido L-glutámico también pueden ser eficaces para conferir o potenciar la capacidad para producir estos L-aminoácidos que se biosintetizan por medio de ácido L-glutámico como producto intermedio, tales como L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-citrulina y L-ornitina. Por tanto, una bacteria que tiene la capacidad de producir cualquiera de estos L-aminoácidos que se biosintetizan por medio de ácido L-glutámico como producto intermedio puede tener una propiedad de este tipo presentada por una bacteria que produce ácido L-glutámico tal como se describió anteriormente, según se requiera. Por ejemplo, una bacteria que tiene la capacidad de producir cualquiera de estos L-aminoácidos que se biosintetizan por medio de ácido L-glutámico como producto intermedio puede haberse modificado de modo que la actividad de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y/o succinato deshidrogenasa se reduce.

65 Los ejemplos de métodos para conferir o potenciar la capacidad de producción de L-aminoácidos tal como la capacidad de producción de ácido L-glutámico también incluyen un método de modificación de una bacteria de modo que la actividad de fosfocetolasa se aumenta (documento WO2006/016705). Por tanto, la bacteria de la presente invención puede haberse modificado de modo que la actividad de fosfocetolasa se aumenta. Los ejemplos

de fosfocetolasa incluyen D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa y fructosa-6-fosfato fosfocetolasa. Una cualquiera de la actividad de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa y la actividad de fructosa-6-fosfato fosfocetolasa puede potenciarse, o pueden potenciarse ambas.

5 El término "actividad de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa" se refiere a una actividad para convertir xilulosa-5-fosfato en gliceraldehído-3-fosfato y fosfato de acetilo con consumo de ácido fosfórico para liberar una molécula de H<sub>2</sub>O. Esta actividad puede medirse mediante el método descrito por Goldberg, M. *et al.* (Methods Enzymol., 9, 515-520, 1996) o el método descrito por L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001). Los ejemplos de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa incluyen las de bacterias que pertenecen a los géneros *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*,  
10 *Thiobacillus*, *Streptococcus*, *Methylococcus*, *Butyrivibrio* y *Fibrobacter*, y levaduras que pertenecen a los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospodium*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* y *Wingea*. Se divulgan ejemplos específicos de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa y genes que las codifican en el documento WO2006/016705.

15 El término "actividad de fructosa-6-fosfato fosfocetolasa" se refiere a una actividad para convertir fructosa-6-fosfato en eritrosa-4-fosfato y fosfato de acetilo con consumo de ácido fosfórico para liberar una molécula de H<sub>2</sub>O. Esta actividad puede medirse mediante el método descrito por Racker, E. (Methods Enzymol., 5, 276-280, 1962) o el método descrito por L. Meile (J. Bacteriol., 183:2929-2936, 2001). Los ejemplos de fructosa-6-fosfato fosfocetolasa incluyen las de bacterias que pertenecen a los géneros *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Chlorobium*, *Brucella*,  
20 *Methylococcus* y *Gardnerella*, y levaduras que pertenecen a los géneros *Rhodotorula*, *Candida* y *Saccharomyces*. Se divulgan ejemplos específicos de fructosa-6-fosfato fosfocetolasa y genes que las codifican en el documento WO2006/016705.

25 Tanto la actividad de D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa como la actividad de fructosa-6-fosfato fosfocetolasa puede retenerlas también una única enzima (es decir, D-xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa/fructosa-6-fosfato fosfocetolasa).

La secuencia de nucleótidos del gen de fosfocetolasa (gen *xfp*) de *Bifidobacterium longum* JCM1217 y la secuencia de aminoácidos de fosfocetolasa (proteína Xfp) codificada por el gen se muestran en SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente.

30 Además, los ejemplos de métodos para conferir o potenciar una capacidad de producción de L-aminoácidos también incluyen, por ejemplo, un método de modificación de una bacteria de modo que la actividad o actividades de una o más de las proteínas implicadas en el glicometabolismo y las proteínas implicadas en el metabolismo energético se aumentan.

35 Los ejemplos de las proteínas implicadas en el glicometabolismo incluyen proteínas implicadas en la captación de sacáridos y las enzimas del sistema de glicólisis. Los ejemplos de genes que codifican para las proteínas implicadas en el glicometabolismo incluyen el gen de glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*, documento WO01/02542), gen de piruvato carboxilasa (*pyc*, documentos WO99/18228, EP 1092776 A), gen de fosfoglucomutasa (*pgm*, documento  
40 WO03/04598), gen de fructosa bisfosfato aldolasa (*pfkB*, *fbp*, documento WO03/04664), gen de transaldolasa (*talB*, documento WO03/008611), gen de fumarasa (*fum*, documento WO01/02545), gen de captación de sacarosa distinto de PTS (*csc*, documento EP 1149911 A) y gen de utilización de sacarosa (operón *scrAB*, patente estadounidense n.º 7.179.623).

45 Los ejemplos de genes que codifican para las proteínas implicadas en el metabolismo energético incluyen el gen de transhidrogenasa (*pntAB*, patente estadounidense n.º 5.830.716) y el gen de oxidasa de tipo citocromo bo (*cyoB*, documento EP 1070376 A).

50 Los genes y las proteínas usados para cultivar bacterias que producen L-aminoácidos pueden tener, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de genes y proteínas conocidos, tales como los anteriormente ejemplificados, respectivamente. Además, los genes y las proteínas usados para cultivar bacterias que producen L-aminoácidos pueden ser variantes conservadoras de genes y proteínas conocidos, tales como los anteriormente ejemplificados, respectivamente. Por ejemplo, específicamente, los genes usados para cultivar bacterias que producen L-aminoácidos pueden ser cada uno un gen que codifica para una proteína que tiene una  
55 secuencia de aminoácidos de una proteína conocida, pero que incluye sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o varios residuos de aminoácido en una o varias posiciones, siempre que la función original de los mismos se mantenga. Para las variantes conservadoras de genes y proteínas, pueden aplicarse las descripciones de variantes conservadoras del gen del portador de captación de  $\alpha$ -KG y del portador de captación de  $\alpha$ -KG mencionados posteriormente, con las modificaciones necesarias.

60 <1-2> Potenciación de la actividad del portador de captación de  $\alpha$ -KG

La bacteria de la presente invención se ha modificado de modo que la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG (actividad de portador de captación de  $\alpha$ -KG) se aumenta. Específicamente, la bacteria de la presente invención  
65 se ha modificado de modo que la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG (actividad de portador de captación

de  $\alpha$ -KG) se aumenta en comparación con una cepa no modificada. La bacteria de la presente invención puede obtenerse modificando una bacteria corineforme que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG. La bacteria de la presente invención también puede obtenerse modificando una bacteria corineforme de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG, y luego confiriendo o potenciando una capacidad de producción de L-aminoácidos. La bacteria de la presente invención también puede ser una bacteria que ha adquirido una capacidad de producción de L-aminoácidos al modificarse de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG. La bacteria de la presente invención puede tener una propiedad de este tipo presentada por una bacteria que produce L-aminoácidos tal como se describió anteriormente, según se requiera. Por ejemplo, la bacteria de la presente invención puede haberse modificado de modo que se aumenta la actividad de fosfocetolasa. Las modificaciones para construir la bacteria de la presente invención pueden realizarse en un orden arbitrario.

Al modificar una bacteria corineforme de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG, puede mejorarse una capacidad de producción de L-aminoácidos de la bacteria corineforme, y por tanto, la producción de un L-aminoácido usando la bacteria corineforme puede aumentarse. En particular, al modificar una bacteria corineforme de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de  $\alpha$ -KG, puede mejorarse una capacidad de producción de L-aminoácidos de la bacteria corineforme en condiciones en las que se produce  $\alpha$ -KG como subproducto.

A continuación en el presente documento, se explicarán portadores de captación de  $\alpha$ -KG y genes que los codifican.

En la presente invención, el término "portador de captación de  $\alpha$ -KG" se refiere a una proteína que tiene una actividad de captación de  $\alpha$ -KG. En la presente invención, el término "actividad de captación de  $\alpha$ -KG" se refiere a una actividad para captar  $\alpha$ -KG en el interior de una célula desde el exterior de la célula. Un gen que codifica para un portador de captación de  $\alpha$ -KG también se denomina "gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG".

Los ejemplos del portador de captación de  $\alpha$ -KG incluyen proteína KgtP, que está codificada por el gen *kgtP*. Los ejemplos del gen *kgtP* incluyen los de *Escherichia coli*, *Pantoea ananatis*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Burkholderia pseudomallei*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Campylobacter jejuni* y *Ralstonia solanacearum*. Las secuencias de nucleótidos de los genes *kgtP* derivados de estos diversos organismos y las secuencias de aminoácidos de las proteínas KgtP codificadas por estos genes pueden obtenerse fácilmente de bases de datos públicas tales como NCBI. El gen *kgtP* de *Escherichia coli* K-12 MG1655 corresponde a la secuencia complementaria a la secuencia en las posiciones 2724448 a 2725746 en la secuencia de genoma registrada en la base de datos del NCBI como registro de GenBank NC\_000913 (VERSIÓN NC\_000913.3 GI:556503834). Además, la proteína KgtP de *Escherichia coli* K-12 MG1655 está registrada como registro de GenBank NP\_417082 (versión NP\_417082.1 GI:16130512). La secuencia de nucleótidos del gen *kgtP* de la cepa MG1655 y la secuencia de aminoácidos de la proteína KgtP codificada por el gen se muestran en SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente. Es decir, el gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser, por ejemplo, un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los genes *kgtP* ejemplificados anteriormente, tal como la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7. Además, el portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser, por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las proteínas KgtP ejemplificadas anteriormente, tal como la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 8. La expresión "un gen o proteína tiene una secuencia de nucleótidos o aminoácidos" abarca casos en los que un gen o proteína comprende la secuencia de nucleótidos o aminoácidos, y casos en los que un gen o proteína consiste en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos.

El gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser una variante de cualquiera de los genes de portador de captación de  $\alpha$ -KG ejemplificados anteriormente (por ejemplo genes *kgtP* ejemplificados anteriormente), siempre que se mantenga la función original del mismo. De manera similar, el portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser una variante de cualquiera de los portadores de captación de  $\alpha$ -KG ejemplificado anteriormente (por ejemplo proteínas KgtP ejemplificadas anteriormente), siempre que se mantenga la función original del mismo. Una variante de este tipo que mantiene la función original del mismo también se denomina "variante conservadora". El término "gen *kgtP*" incluye no sólo los genes *kgtP* ejemplificados anteriormente, sino que también incluye variantes conservadoras de los mismos. De manera similar, el término "proteína KgtP" incluye no sólo las proteínas KgtP ejemplificadas anteriormente, sino que también incluye variantes conservadoras de las mismas. Los ejemplos de las variantes conservadoras incluyen, por ejemplo, homólogos y versiones modificadas artificialmente de los genes de portador de captación de  $\alpha$ -KG y de portadores de captación de  $\alpha$ -KG ejemplificados anteriormente.

La expresión "la función original se mantiene" significa que una variante del gen o la proteína tiene una función (tal como actividad o propiedad) correspondiente a la función (tal como actividad o propiedad) del gen o proteína original. La expresión "la función original se mantiene" usada para un gen significa que una variante del gen codifica para una proteína que mantiene la función original. Es decir, la expresión "la función original se mantiene" usada para el gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG significa que una variante de del gen codifica para una proteína que tiene actividad de captación de  $\alpha$ -KG. La expresión "la función original se mantiene" usada para el portador de captación de  $\alpha$ -KG significa que una variante de la proteína tiene actividad de captación de  $\alpha$ -KG.

La actividad de captación de  $\alpha$ -KG de una proteína puede medirse, por ejemplo, incubando células que expresan la proteína con  $\alpha$ -KG, y midiendo la captación de  $\alpha$ -KG en las células dependiente de la proteína (Seol W, Shatkin AJ. *Escherichia coli* kgtP encodes an alpha-cetoglutarato transporter. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 de mayo de 1991; 88(9):3802-6.).

A continuación en el presente documento, se explicarán ejemplos de las variantes conservadoras.

Pueden obtenerse fácilmente homólogos de los genes de portador de captación de  $\alpha$ -KG u homólogos de los portadores de captación de  $\alpha$ -KG a partir de bases de datos públicas mediante, por ejemplo, búsqueda con BLAST o búsqueda con FASTA usando cualquiera de las secuencias de nucleótidos de los genes de portador de captación de  $\alpha$ -KG ejemplificados anteriormente o cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los portadores de captación de  $\alpha$ -KG ejemplificados anteriormente como secuencia de consulta. Además, pueden obtenerse homólogos de los genes de portador de captación de  $\alpha$ -KG mediante, por ejemplo, RCP usando un cromosoma de diversos organismos tales como bacterias corineformes como molde, y oligonucleótidos preparados basándose en cualquiera de las secuencias de nucleótidos de estos genes de portador de captación de  $\alpha$ -KG conocidos como cebadores.

El gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser un gen que codifica para una proteína que tiene cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente (por ejemplo la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 8), pero que incluye sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o varios residuos de aminoácido en una o varias posiciones, siempre que la función original se mantenga. Por ejemplo, el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal de la proteína codificada pueden alargarse o acortarse. Aunque el número pretendido mediante el término "uno o varios" mencionado anteriormente puede diferir dependiendo de las posiciones de residuos de aminoácido en la estructura tridimensional de la proteína o los tipos de residuos de aminoácido, específicamente, es, por ejemplo, de 1 a 50, de 1 a 40 o de 1 a 30, preferiblemente de 1 a 20, más preferiblemente de 1 a 10, todavía más preferiblemente de 1 a 5, de manera particularmente preferible de 1 a 3.

La sustitución, delección, inserción y/o adición mencionadas anteriormente de uno o varios residuos de aminoácido son, cada una, una mutación conservadora que mantiene la función normal de la proteína. Los ejemplos típicos de la mutación conservadora son sustituciones conservadoras. La sustitución conservadora es una mutación en la que la sustitución tiene lugar mutuamente entre Phe, Trp y Tyr, si el sitio de sustitución es un aminoácido aromático; entre Leu, Ile y Val, si es un aminoácido hidrófobo; entre Gln y Asn, si es un aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, si es un aminoácido básico; entre Asp y Glu, si es un aminoácido ácido; y entre Ser y Thr, si es un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo. Los ejemplos de sustituciones consideradas como sustituciones conservadoras incluyen, específicamente, sustitución de Ala por Ser o Thr, sustitución de Arg por Gln, His o Lys, sustitución de Asn por Glu, Gln, Lys, His o Asp, sustitución de Asp por Asn, Glu o Gln, sustitución de Cys por Ser o Ala, sustitución de Gln por Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg, sustitución de Glu por Gly, Asn, Gln, Lys o Asp, sustitución de Gly por Pro, sustitución de His por Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr, sustitución de Ile por Leu, Met, Val o Phe, sustitución de Leu por Ile, Met, Val o Phe, sustitución de Lys por Asn, Glu, Gln, His o Arg, sustitución de Met por Ile, Leu, Val o Phe, sustitución de Phe por Trp, Tyr, Met, Ile o Leu, sustitución de Ser por Thr o Ala, sustitución de Thr por Ser o Ala, sustitución de Trp por Phe o Tyr, sustitución de Tyr por His, Phe o Trp, y sustitución de Val por Met, Ile o Leu. Además, tal sustitución, delección, inserción, adición, inversión, o similar de residuos de aminoácido tal como se mencionó anteriormente incluyen una mutación que se produce de manera natural debida a una diferencia individual, o una diferencia de especie del organismo del que se deriva el gen (mutante o variante).

El gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser un gen que codifica para una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que muestra una homología de, por ejemplo, el 50 % o más, el 65 % o más, o el 80 % o más, preferiblemente el 90 % o más, más preferiblemente el 95 % o más, todavía más preferiblemente el 97 % o más, de manera particularmente preferible el 99 % o más, con la secuencia de aminoácidos total de cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente, siempre que la función original se mantenga. En esta descripción, "homología" significa "identidad".

El gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser también un gen, tal como un ADN, que puede hibridarse en condiciones rigurosas con una sonda que puede prepararse a partir de cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente (por ejemplo la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 7), tal como una secuencia complementaria a una secuencia parcial o completa de cualquiera de las secuencias de nucleótidos mencionadas anteriormente, siempre que la función original se mantenga. Las "condiciones rigurosas" se refieren a condiciones en las que se forma un denominado híbrido específico, y no se forma un híbrido inespecífico. Los ejemplos de las condiciones rigurosas incluyen aquellas en las que ADN altamente homólogos se hibridan entre sí, por ejemplo, ADN no menos del 50 %, el 65 % o el 80 % homólogos, preferiblemente no menos del 90 % homólogos, más preferiblemente no menos del 95 % homólogos, todavía más preferiblemente no menos del 97 % homólogos, de manera particularmente preferible no menos del 99 % homólogos, se hibridan entre sí, y ADN menos homólogos que los anteriores no se hibridan entre sí, o condiciones de lavado de hibridación de tipo Southern típica, es decir, condiciones de lavado una vez, preferiblemente 2 ó 3 veces, a una concentración de sal y temperatura correspondientes a 1 x SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C, preferiblemente 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C, más

preferiblemente 0,1 x SSC, SDS al 0,1 % a 68 °C.

La sonda usada para la hibridación mencionada anteriormente puede ser una parte de una secuencia que es complementaria al gen tal como se describió anteriormente. Una sonda de este tipo puede prepararse mediante RCP usando oligonucleótidos preparados basándose en una secuencia génica conocida como cebadores y un fragmento de ADN que contiene cualquiera de los genes mencionados anteriormente como molde. Como sonda, por ejemplo, puede usarse un fragmento de ADN que tiene una longitud de aproximadamente 300 pb. Cuando se usa un fragmento de ADN que tiene una longitud de aproximadamente 300 pb como sonda, las condiciones de lavado de la hibridación pueden ser, por ejemplo, 50 °C, 2 x SSC y SDS al 0,1 %.

Además, puesto que la degeneración de codones difiere dependiendo del huésped, pueden reemplazarse codones arbitrarios en el gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG por codones equivalentes respectivos. Es decir, el gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser una variante de cualquiera de los genes de portador de captación de  $\alpha$ -KG ejemplificados anteriormente debido a la degeneración del código genético. Por ejemplo, el gen de portador de captación de  $\alpha$ -KG puede ser un gen modificado de modo que tiene codones óptimos según las frecuencias de codones en un huésped que va a usarse.

El porcentaje de la identidad de secuencia entre dos secuencias puede determinarse, por ejemplo, usando un algoritmo matemático. Los ejemplos no limitativos de un algoritmo matemático de este tipo incluyen el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17, el algoritmo de homología local de Smith *et al* (1981) Adv. Appl. Math. 2:482, el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453, el método de búsqueda de homología de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448 y una versión modificada del algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 87:2264, tal como la descrita en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90:5873-5877.

Usando un programa basado en un algoritmo matemático de este tipo, puede realizarse la comparación de secuencias (es decir, alineación) para determinar la identidad de secuencia. El programa puede ejecutarse apropiadamente mediante un ordenador. Los ejemplos de un programa de este tipo incluyen, pero no se limitan a, CLUSTAL del programa PC/Gene (disponible de Intelligentics, Mountain View, Calif.), el programa ALIGN (versión 2.0), y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA de Wisconsin Genetics Software Package, versión 8 (disponible de Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., EE.UU.). Puede realizarse una alineación usando estos programas usando, por ejemplo, parámetros iniciales. El programa CLUSTAL se describe bien en Higgins *et al.* (1988) Gene 73:237-244 (1988), Higgins *et al.* (1989) CABIOS 5:151-153, Corpet *et al.* (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90, Huang *et al.* (1992) CABIOS 8:155-65 y Pearson *et al.* (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331.

Con el fin de obtener una secuencia de nucleótidos homóloga a una secuencia de nucleótidos diana, en particular, por ejemplo, puede realizarse una búsqueda de nucleótidos con BLAST usando el programa BLASTN con una puntuación de 100 y una longitud de palabra de 12. Con el fin de obtener una secuencia de aminoácidos homóloga a una proteína diana, en particular, por ejemplo, puede realizarse una búsqueda de proteína con BLAST usando el programa BLASTX con una puntuación de 50 y una longitud de palabra de 3. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> para la búsqueda de nucleótidos con BLAST y la búsqueda de proteínas con BLAST. Además, puede usarse Gapped BLAST (BLAST 2.0) con el fin de obtener una alineación que incluye hueco(s) para el propósito de comparación. Además, puede usarse PSI-BLAST con el fin de realizar una búsqueda repetitiva para detectar relaciones distantes entre secuencias. Véase Altschul *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389 para Gapped BLAST y PSI-BLAST. Cuando se usa BLAST, Gapped BLAST o PSI-BLAST, pueden usarse los parámetros iniciales de cada programa (por ejemplo BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTX para secuencias de aminoácidos). La alineación puede realizarse también manualmente.

La identidad de secuencia entre dos secuencias se calcula como la razón de residuos coincidentes en las dos secuencias cuando se alinean las dos secuencias para que correspondan de manera máxima entre sí.

Las descripciones mencionadas anteriormente referentes a variantes conservadoras de los genes y las proteínas pueden aplicarse con las modificaciones necesarias a variantes de proteínas arbitrarias tales como enzimas del sistema de biosíntesis de L-aminoácidos y genes que las codifican.

### <1-3> Métodos para aumentar actividad de proteína

A continuación en el presente documento, se explicarán los métodos para aumentar la actividad de una proteína tal como el portador de captación de  $\alpha$ -KG.

La expresión "la actividad de una proteína se aumenta" significa que la actividad de la proteína se aumenta en comparación con una cepa no modificada. Específicamente, la expresión "la actividad de una proteína se aumenta" puede significar que la actividad de la proteína por célula se aumenta en comparación con la de una cepa no modificada. El término "cepa no modificada" usado en el presente documento se refiere a una cepa de control que no se ha modificado de modo que la actividad de una proteína objetivo se aumente. Los ejemplos de la cepa no modificada incluyen una cepa de tipo natural y una cepa original. Los ejemplos específicos de la cepa no modificada

incluyen las cepas de tipo respectivo de las especies de bacterias. Los ejemplos específicos de la cepa no modificada también incluyen cepas ejemplificadas anteriormente en relación con la descripción de bacterias. Es decir, en una realización, la actividad de una proteína puede aumentarse en comparación con una cepa de tipo, es decir la cepa de tipo de la especie a la que pertenece una bacteria corineforme. En otra realización, la actividad de una proteína también puede aumentarse en comparación con *C. glutamicum* ATCC 13869. En otra realización, la actividad de una proteína también puede aumentarse en comparación con *C. glutamicum* ATCC 13032. El estado de que “la actividad de una proteína se aumenta” también puede expresarse como “la actividad de una proteína se potencia”. Más específicamente, la expresión “la actividad de una proteína se aumenta” puede significar que el número de moléculas de la proteína por célula se aumenta, y/o la función de cada molécula de la proteína se aumenta en comparación con las de una cepa no modificada. Es decir, el término “actividad” en la expresión “la actividad de una proteína se aumenta” no se limita a la actividad catalítica de la proteína, sino que también puede significar la cantidad de transcripción de un gen (es decir, la cantidad de ARNm) que codifica para la proteína, o la cantidad de traducción de la proteína (es decir, la cantidad de la proteína). Además, el estado de que “la actividad de una proteína se aumenta” incluye no sólo un estado de que la actividad de una proteína objetivo se aumenta en una cepa que tiene inherentemente la actividad de la proteína objetivo, sino también un estado de que la actividad de una proteína objetivo se confiere a una cepa que no tiene inherentemente la actividad de la proteína objetivo. Además, siempre que la actividad de la proteína se aumente en última instancia, la actividad de una proteína objetivo contenida inherentemente en un huésped puede atenuarse y/o eliminarse, y entonces puede conferirse un tipo apropiado de la proteína objetivo al huésped.

El grado del aumento en la actividad de una proteína no está particularmente limitado, siempre que la actividad de la proteína se aumente en comparación con una cepa no modificada. La actividad de la proteína puede aumentarse hasta, por ejemplo, 1,5 veces o más, 2 veces o más, o 3 veces o más de la de una cepa no modificada. Además, cuando la cepa no modificada no tiene la actividad de la proteína objetivo, es suficiente que la proteína se produzca como resultado de la introducción del gen que codifica para la proteína, y por ejemplo, la proteína puede producirse en un grado tal que la actividad de la misma puede medirse.

La modificación para aumentar la actividad de una proteína puede lograrse, por ejemplo, aumentando la expresión de un gen que codifica para la proteína. La expresión “la expresión de un gen se aumenta” significa que la expresión del gen se aumenta en comparación con una cepa no modificada tal como una cepa de tipo natural y una cepa original. Específicamente, la expresión “la expresión de un gen se aumenta” puede significar que la cantidad de expresión del gen por célula se aumenta en comparación con la de una cepa no modificada. Más específicamente, la expresión “la expresión de un gen se aumenta” puede significar que la cantidad de transcripción del gen (es decir, la cantidad de ARNm) se aumenta, y/o la cantidad de traducción del gen (es decir, la cantidad de la proteína expresada a partir del gen) se aumenta. El estado de que “la expresión de un gen se aumenta” también se denomina “la expresión de un gen se potencia”. La expresión de un gen puede aumentarse hasta, por ejemplo, 1,5 veces o más, 2 veces o más, o 3 veces o más de la de una cepa no modificada. Además, el estado de que “la expresión de un gen se aumenta” incluye no sólo un estado de que la cantidad de expresión de un gen objetivo se aumenta en una cepa que expresa inherentemente el gen objetivo, sino también un estado de que el gen se introduce en una cepa que no expresa inherentemente el gen objetivo, y se expresa en la misma. Es decir, la frase “la expresión de un gen se aumenta” también puede significar, por ejemplo, que se introduce un gen objetivo en una cepa que no presenta el gen, y se expresa en la misma.

La expresión de un gen puede aumentarse, por ejemplo, aumentando el número de copias del gen.

El número de copias de un gen puede aumentarse introduciendo el gen en el cromosoma de un huésped. Puede introducirse un gen en un cromosoma, por ejemplo, usando recombinación homóloga (Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics*, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory). Los ejemplos del método de transferencia génica que utiliza recombinación homóloga incluyen, por ejemplo, un método de uso de ADN lineal tal como integración dirigida por Red (Datsenko, K.A., y Wanner, B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 97:6640-6645 (2000)), un método de uso de un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a temperatura, un método de uso de un plásmido capaz de transferencia conjugativa, un método de uso de un vector suicida que no tiene un origen de replicación que funcione en un huésped y un método de transducción usando un fago. Puede introducirse sólo una copia, o dos o más copias de un gen. Por ejemplo, realizando recombinación homóloga usando una secuencia que está presente en múltiples copias en un cromosoma como diana, pueden introducirse múltiples copias de un gen en el cromosoma. Los ejemplos de una secuencia de este tipo que está presente en múltiples copias en un cromosoma incluyen ADN repetitivos, y repeticiones invertidas ubicadas en ambos extremos de un transposón. Alternativamente, puede realizarse recombinación homóloga usando una secuencia apropiada en un cromosoma tal como un gen innecesario para la producción de una sustancia objetivo como diana. Además, también puede introducirse aleatoriamente un gen en un cromosoma usando un transposón o Mini-Mu (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2-109985, patente estadounidense n.º 5.882.888, documento EP 805867 B1).

La introducción de un gen diana en un cromosoma puede confirmarse mediante hibridación de tipo Southern usando una sonda que tiene una secuencia complementaria al gen completo o una parte del mismo, RCP usando cebadores preparados basándose en la secuencia del gen, o similares.

Además, el número de copias de un gen también puede aumentarse introduciendo un vector que contiene el gen en un huésped. Por ejemplo, el número de copias de un gen diana puede aumentarse ligando un fragmento de ADN que contiene el gen diana con un vector que funciona en un huésped para construir un vector de expresión del gen, y transformando el huésped con el vector de expresión. El fragmento de ADN que contiene el gen diana puede obtenerse, por ejemplo, mediante RCP usando el ADN genómico de un microorganismo que tiene el gen diana como molde. Como vector, puede usarse un vector que puede replicarse de manera autónoma en la célula del huésped. El vector es preferiblemente un vector de múltiples copias. Además, el vector tiene preferiblemente un marcador tal como un gen de resistencia a antibióticos para la selección del transformante. Además, el vector puede tener un promotor y/o terminador para expresar el gen introducido. El vector puede ser, por ejemplo, un vector derivado de un plásmido bacteriano, un vector derivado de un plásmido de levadura, un vector derivado de un bacteriófago, cósmido, fagémido, o similar. Los ejemplos específicos de un vector que puede replicarse de manera autónoma en bacterias corineformes incluyen pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); plásmidos obtenidos mejorando estos y que tienen un gen de resistencia a fármacos; el plásmido pCRY30 descrito en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 3-210184; los plásmidos pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE y pCRY3KX descritos en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2-72876 y la patente estadounidense n.º 5.185.262; los plásmidos pCRY2 y pCRY3 descritos en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 1-191686; pAJ655, pAJ611 y pAJ1844 descritos en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 58-192900; pCG1 descrito en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-134500; pCG2 descrito en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 58-35197; pCG4 y pCGII descritos en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 57-183799; pVK7 descrito en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 10-215883; pVK9 descrito en el documento WO2007/046389; pVS7 descrito en el documento WO2013/069634; y pVC7 descrito en la patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 9-070291.

Cuando se introduce un gen, es suficiente que el gen se albergue de manera expresable en un huésped. Específicamente, es suficiente que el gen se albergue en un huésped de modo que se exprese bajo el control de un promotor que funciona en el huésped. El término "un promotor que funciona en un huésped" se refiere a un promotor que muestra una actividad de promotor en el huésped. El promotor puede ser un promotor derivado del huésped, o un promotor heterogéneo. El promotor puede ser el promotor nativo del gen que va a introducirse, o un promotor de otro gen. Como promotor, por ejemplo, puede usarse también un promotor más fuerte de este tipo tal como se menciona posteriormente.

Un terminador para la terminación de la transcripción génica puede estar ubicado en el sentido de 3' del gen. El terminador no está particularmente limitado siempre que funcione en un huésped. El terminador puede ser un terminador derivado del huésped, o un terminador heterogéneo. El terminador puede ser el terminador nativo del gen que va a introducirse, o un terminador de otro gen.

Se divulgan vectores, promotores y terminadores disponibles en diversos microorganismos en detalle en "Fundamental Microbiology vol. 8, Genetic Engineering, KYORITSU SHUPPAN CO., LTD, 1987", y pueden usarse esos.

Además, cuando se introducen dos o más genes, es suficiente que los genes se alberguen cada uno de manera expresable en un huésped. Por ejemplo, todos los genes pueden portarse en un único vector de expresión o un cromosoma. Además, los genes pueden portarse por separado en dos o más vectores de expresión, o portarse por separado en un único o dos o más vectores de expresión y un cromosoma. También puede introducirse un operón constituido por dos o más genes. El caso de "introducir dos o más genes" incluye, por ejemplo, casos de introducción de genes respectivos que codifican para dos o más clases de proteínas (tales como enzimas), introducción de genes respectivos que codifican para dos o más subunidades que constituyen un único complejo proteico (tal como complejo enzimático), y una combinación de los casos anteriores.

El gen que va a introducirse no está particularmente limitado siempre que codifique para una proteína que funciona en el huésped. El gen que va a introducirse puede ser un gen derivado del huésped, o puede ser un gen heterogéneo. El gen que va a introducirse puede obtenerse mediante, por ejemplo, RCP usando cebadores diseñados basándose en la secuencia de nucleótidos del gen, y usando el ADN genómico de un organismo que tiene el gen, un plásmido que porta el gen, o similar como molde. El gen que va a introducirse puede también sintetizarse totalmente, por ejemplo, basándose en la secuencia de nucleótidos del gen (Gene, 60(1), 115-127 (1987)). El gen obtenido puede usarse tal como está, o tras modificarse según se requiera. Es decir, puede introducirse una variante de un gen modificando el gen. Un gen puede modificarse mediante una técnica conocida. Por ejemplo, puede introducirse una mutación objetivo en un sitio objetivo de ADN mediante el método de mutación específica de sitio. Es decir, la región codificante de un gen puede modificarse mediante el método de mutación específica de sitio de modo que un sitio específico de la proteína codificada incluye sustitución, delección, inserción o adición de residuos de aminoácido. Los ejemplos del método de mutación específica de sitio incluyen el método de utilización de RCP (Higuchi, R., 61, en PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382 (1987)) y el método que utiliza un fago (Kramer, W. y Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T.A. *et al.*, Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987)). Alternativamente, puede sintetizarse totalmente una variante de un gen.

Además, cuando una proteína funciona como complejo que consiste en una pluralidad de subunidades, una parte o toda la pluralidad de subunidades pueden modificarse, siempre que la actividad de la proteína se aumente en última instancia. Es decir, por ejemplo, cuando la actividad de una proteína se aumenta aumentando la expresión de un gen, la expresión de una parte o toda la pluralidad de genes que codifican para las subunidades puede potenciarse. Habitualmente, es preferible potenciar la expresión de toda la pluralidad de genes que codifican para las subunidades. Además, las subunidades que constituyen el complejo pueden derivarse de una única clase de organismo o dos o más clases de organismos, siempre que el complejo tenga una función de la proteína objetivo. Es decir, por ejemplo, pueden introducirse en un huésped genes del mismo organismo que codifican para una pluralidad de subunidades, o pueden introducirse en un huésped genes de diferentes organismos que codifican para una pluralidad de subunidades.

Además, la expresión de un gen puede aumentarse mejorando la eficacia de transcripción del gen. Además, la expresión de un gen puede aumentarse también mejorando la eficacia de traducción del gen. La eficacia de transcripción del gen y la eficacia de traducción del gen pueden mejorarse, por ejemplo, modificando una secuencia de control de la expresión del gen. El término "secuencia de control de la expresión" se refiere conjuntamente a sitios que afectan a la expresión de un gen. Los ejemplos de la secuencia de control de la expresión incluyen, por ejemplo, un promotor, una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) (también denominada sitio de unión al ribosoma (RBS)) y una región de espaciador entre el RBS y el codón de iniciación. Las secuencias de control de la expresión pueden identificarse usando un software de análisis de genes o vectores de búsqueda de promotores tal como GENETYX. Estas secuencias de control de la expresión pueden modificarse, por ejemplo, mediante un método de uso de un vector sensible a la temperatura, o el método de integración dirigida por Red (documento WO2005/010175).

La eficacia de transcripción de un gen puede mejorarse, por ejemplo, reemplazando el promotor del gen en un cromosoma por un promotor más fuerte. El término "promotor más fuerte" significa un promotor que proporciona una transcripción mejorada de un gen en comparación con un promotor de tipo natural que existe de manera inherente del gen. Los ejemplos de promotores más fuertes utilizables en bacterias corineformes incluyen el promotor P54-6 modificado artificialmente (Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 674-679 (2000)), los promotores *pta*, *aceA*, *aceB*, *adh* y *amyE* inducibles en bacterias corineformes con ácido acético, etanol, ácido pirúvico, o similares, los promotores *cspB*, *SOD* y *tuf* (EF-Tu), que son promotores potentes capaces de proporcionar una gran cantidad de expresión en bacterias corineformes (Journal of Biotechnology, 104 (2003) 311-323; Appl. Environ. Microbiol., diciembre de 2005; 71 (12):8587-96), así como el promotor *lac*, promotor *tac* y promotor *trc*. Además, como promotor más fuerte, también puede obtenerse un tipo altamente activo de un promotor existente usando diversos genes indicadores. Por ejemplo, haciendo que las regiones -35 y -10 en una región de promotor estén más próximas a la secuencia consenso, puede potenciarse la actividad del promotor (documento WO00/18935). Los ejemplos de un promotor de tipo altamente activo incluyen diversos promotores de tipo *tac* (Katashkina JI *et al.*, solicitud de patente de la Federación Rusa n.º 2006134574). Se describen métodos para evaluar la fuerza de los promotores y ejemplos de promotores fuertes en el artículo de Goldstein *et al.* (Prokaryotic Promoters in Biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1, 105-128 (1995)) y otros.

La eficacia de traducción de un gen puede mejorarse, por ejemplo, reemplazando la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) (también denominada sitio de unión al ribosoma (RBS)) para el gen en un cromosoma por una secuencia de SD más fuerte. La "secuencia de SD más fuerte" significa una secuencia de SD que proporciona una traducción mejorada de ARNm en comparación con la secuencia de SD de tipo natural que existe de manera inherente del gen. Los ejemplos de secuencias de SD más fuertes incluyen, por ejemplo, RBS del gen *10* derivado del fago T7 (Olins P.O. *et al.*, Gene, 1988, 73, 227-235). Además, se sabe que la sustitución, inserción o delección de varios nucleótidos en una región de espaciador entre el RBS y el codón de iniciación, especialmente en una secuencia inmediatamente adyacente en el sentido de 5' del codón de iniciación (UTR en 5'), afecta significativamente a la estabilidad y eficacia de la traducción de ARNm, y por tanto, la eficacia de traducción de un gen también puede mejorarse modificándolo.

La eficacia de traducción de un gen también puede mejorarse, por ejemplo, modificando codones. Por ejemplo, la eficacia de traducción del gen puede mejorarse reemplazando un codón poco común presente en el gen por un codón sinónimo más frecuentemente usado. Es decir, el gen que va a introducirse puede modificarse, por ejemplo, para que contenga codones óptimos según las frecuencias de codones observadas en un huésped que va a usarse. Los codones pueden reemplazarse, por ejemplo, mediante el método de mutación específica de sitio para introducir una mutación objetivo en un sitio objetivo del ADN. Alternativamente, un fragmento de gen en el que se reemplazan codones objetivos puede sintetizarse totalmente. Se divulgan las frecuencias de codones en diversos organismos en la "Codon Usage Database" (<http://www.kazusa.o.jp/codon>; Nakamura, Y. *et al.*, Nucl. Acids Res., 28, 292 (2000)).

Además, la expresión de un gen también puede aumentarse amplificando un regulador que aumenta la expresión del gen, o delecionando o atenuando un regulador que reduce la expresión del gen.

Tales métodos para aumentar la expresión del gen tal como se mencionó anteriormente pueden usarse independientemente o en una combinación arbitraria.

Además, la modificación que aumenta la actividad de una proteína también puede lograrse, por ejemplo,

potenciando la actividad específica de la enzima. La potenciación de la actividad específica también incluye la desensibilización a la inhibición por retroalimentación. Es decir, cuando una proteína se somete a inhibición por retroalimentación mediante un metabolito, la actividad de la proteína puede aumentarse haciendo que un huésped albergue un gen que codifica para una proteína mutante que se ha desensibilizado a la inhibición por retroalimentación. En la presente invención, “desensibilización a la inhibición por retroalimentación” incluye la atenuación y eliminación de la inhibición por retroalimentación. Una proteína que muestra una actividad específica potenciada puede obtenerse, por ejemplo, mediante búsqueda en diversos organismos. Además, un tipo altamente activo de una proteína existente también puede obtenerse introduciendo una mutación en la proteína existente. La mutación que va a introducirse puede ser, por ejemplo, la sustitución, delección, inserción o adición de uno o varios residuos de aminoácido en una o varias posiciones de la proteína. La mutación puede introducirse, por ejemplo, mediante un método de mutación específica de sitio de este tipo tal como se mencionó anteriormente. La mutación también puede introducirse, por ejemplo, mediante un tratamiento de mutagénesis. Los ejemplos del tratamiento de mutagénesis incluyen irradiación de rayos X, irradiación ultravioleta y un tratamiento con un agente de mutación tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), metanosulfonato de etilo (EMS) y metanosulfonato de metilo (MMS). Además, puede inducirse una mutación al azar tratando directamente el ADN *in vitro* con hidroxilamina. La potenciación de la actividad específica puede usarse independientemente, o puede usarse en una combinación arbitraria con tales métodos para potenciar la expresión génica tal como se mencionó anteriormente.

El método para la transformación no está particularmente limitado, y pueden usarse métodos convencionalmente conocidos. La transformación de bacterias corineformes puede realizarse, por ejemplo, mediante el método de protoplastos (Gene, 39, 281-286(1985)), el método de electroporación (Bio/Technology, 7, 1067-1070(1989)) o el método de pulsos eléctricos (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 2-207791).

Puede confirmarse un aumento en la actividad de una proteína midiendo la actividad de la proteína.

Puede confirmarse también un aumento en la actividad de una proteína confirmando un aumento en la expresión de un gen que codifica para la proteína. Puede confirmarse un aumento en la expresión de un gen confirmando un aumento en la cantidad de transcripción del gen, o confirmando un aumento en la cantidad de una proteína expresada a partir del gen.

Puede confirmarse un aumento de la cantidad de transcripción de un gen comparando la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen con la de una cepa no modificada tal como una cepa de tipo natural o cepa original. Los ejemplos del método para evaluar la cantidad de ARNm incluyen hibridación de tipo Northern, RCP-TR y otros (Sambrook, J., *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual/tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE.UU.), 2001). La cantidad de ARNm puede aumentarse hasta, por ejemplo, 1,5 veces o más, 2 veces o más o 3 veces o más de la de una cepa no modificada.

Puede confirmarse un aumento en la cantidad de una proteína mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE.UU.), 2001). La cantidad de la proteína puede aumentarse hasta, por ejemplo, 1,5 veces o más, 2 veces o más, o 3 veces o más de la de una cepa no modificada.

Los métodos mencionados anteriormente para aumentar la actividad de una proteína pueden usarse para la potenciación de las actividades de proteínas arbitrarias tales como enzimas de biosíntesis de L-aminoácidos, y la potenciación de la expresión de genes arbitrarios tales como genes que codifican para esas proteínas arbitrarias, además de la potenciación de la actividad del portador de captación de  $\alpha$ -KG.

<1-4> Método para reducir la actividad de proteína

A continuación en el presente documento, se explicarán los métodos para reducir la actividad de una proteína.

La expresión “la actividad de una proteína se reduce” significa que la actividad de la proteína se reduce en comparación con una cepa no modificada. Específicamente, la expresión “la actividad de una proteína se reduce” puede significar que la actividad de la proteína por célula se reduce en comparación con la de una cepa no modificada. El término “cepa no modificada” usado en el presente documento se refiere a una cepa de control que no se ha modificado de modo que la actividad de una proteína objetivo se reduzca. Los ejemplos de la cepa no modificada incluyen una cepa de tipo natural y una cepa original. Los ejemplos específicos de la cepa no modificada incluyen las cepas de tipo respectivo de las especies de bacterias. Los ejemplos específicos de la cepa no modificada también incluyen cepas ejemplificadas anteriormente en relación con la descripción de bacterias. Es decir, en una realización, la actividad de una proteína puede reducirse en comparación con una cepa de tipo, es decir la cepa de tipo de la especie a la que pertenece una bacteria corineforme. En otra realización, la actividad de una proteína puede reducirse también en comparación con *C. glutamicum* ATCC 13869. En otra realización, la actividad de una proteína puede reducirse también en comparación con *C. glutamicum* ATCC 13032. El estado de que “la actividad de una proteína se reduce” también incluye un estado de que la actividad de la proteína ha desaparecido completamente. Más específicamente, la expresión “la actividad de una proteína se reduce” puede significar que el número de moléculas de la proteína por célula se reduce, y/o la función de cada molécula de la

proteína se reduce en comparación con la de una cepa no modificada. Es decir, el término “actividad” en la expresión “la actividad de una proteína se reduce” no se limita a la actividad catalítica de la proteína, sino que también puede significar la cantidad de transcripción de un gen (es decir, la cantidad de ARNm) que codifica para la proteína o la cantidad de traducción de la proteína (es decir, la cantidad de la proteína). El estado de que “el número de moléculas de la proteína por célula se reduce” también incluye un estado de que la proteína no existe en absoluto. El estado de que “la función de cada molécula de la proteína se reduce” también incluye un estado de que la función de cada molécula de proteína ha desaparecido completamente. El grado de la reducción en la actividad de una proteína no está limitado particularmente, siempre que la actividad se reduzca en comparación con la de una cepa no modificada. La actividad de una proteína puede reducirse hasta, por ejemplo, el 50 % o menos, el 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, o el 0 % de la de una cepa no modificada.

La modificación para reducir la actividad de una proteína puede lograrse, por ejemplo, reduciendo la expresión de un gen que codifica para la proteína. La expresión “la expresión de un gen se reduce” significa que la expresión del gen se reduce en comparación con una cepa no modificada tal como una cepa de tipo natural y una cepa original. Específicamente, la expresión “la expresión de un gen se reduce” puede significar que la expresión del gen por célula se reduce en comparación con la de una cepa no modificada tal como una cepa de tipo natural y una cepa original. Más específicamente, la expresión “la expresión de un gen se reduce” puede significar que la cantidad de transcripción del gen (es decir, la cantidad de ARNm) se reduce, y/o la cantidad de traducción del gen (es decir, la cantidad de la proteína expresada a partir del gen) se reduce. El estado de que “la expresión de un gen se reduce” también incluye un estado de que el gen no se expresa en absoluto. El estado de que “la expresión de un gen se reduce” también se denomina “la expresión de un gen se atenúa”. La expresión de un gen puede reducirse hasta, por ejemplo, el 50 % o menos, el 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, o el 0 % de la de una cepa no modificada.

La reducción en la expresión génica puede deberse a, por ejemplo, una reducción en la eficacia de transcripción, una reducción en la eficacia de traducción o una combinación de ellas. La expresión de un gen puede reducirse modificando una secuencia de control de la expresión del gen tal como un promotor, una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) (también denominada sitio de unión al ribosoma (RBS)) y una región de espaciador entre el RBS y el codón de iniciación del gen. Cuando se modifica una secuencia de control de la expresión, se modifican preferiblemente uno o más nucleótidos, más preferiblemente dos o más nucleótidos, de manera particularmente preferible tres o más nucleótidos, de la secuencia de control de la expresión. Por ejemplo, la eficacia de transcripción de un gen puede reducirse, por ejemplo, reemplazando el promotor del gen en un cromosoma por un promotor más débil. El término “promotor más débil” significa un promotor que proporciona una transcripción atenuada de un gen en comparación con un promotor de tipo natural que existe de manera inherente del gen. Los ejemplos de promotores más débiles incluyen, por ejemplo, promotores inducibles. Es decir, un promotor inducible puede funcionar como promotor más débil en una condición no inducida, tal como en ausencia del inductor correspondiente. Además, una parte o la totalidad de una secuencia de control de la expresión puede delecionarse. La expresión de un gen puede reducirse también, por ejemplo, manipulando un factor responsable del control de la expresión. Los ejemplos del factor responsable del control de la expresión incluyen moléculas de bajo peso molecular responsables del control de la transcripción o traducción (inductores, inhibidores, etc.), proteínas responsables del control de la transcripción o traducción (factores de transcripción, etc.), ácidos nucleicos responsables del control de la transcripción o traducción (ARNip, etc.) y otros. Además, la expresión de un gen puede reducirse también, por ejemplo, introduciendo una mutación que reduce la expresión del gen en la región codificante del gen. Por ejemplo, la expresión de un gen puede reducirse reemplazando un codón en la región codificante del gen por un codón sinónimo usado menos frecuentemente en un huésped. Además, por ejemplo, la expresión génica puede reducirse debido a la alteración de un gen tal como se describe posteriormente.

La modificación para reducir la actividad de una proteína puede lograrse también, por ejemplo, alterando un gen que codifica para la proteína. La expresión “un gen se altera” significa que un gen se modifica de modo que no se produce una proteína que puede funcionar normalmente. El estado de que “no se produce una proteína que funciona normalmente” incluye un estado de que la proteína no se produce en absoluto a partir del gen, y un estado de que la proteína cuya función (tal como actividad o propiedad) se reduce o se elimina por molécula se produce a partir del gen.

La alteración de un gen puede lograrse, por ejemplo, delecionando una parte de o toda la región codificante del gen en un cromosoma. Además, puede delecionarse todo el gen incluyendo secuencias en el sentido de 5' y en el sentido de 3' del gen en un cromosoma. La región que va a delecionarse puede ser cualquier región tal como una región de extremo N-terminal, una región interna o una región de extremo C terminal, siempre que la actividad de la proteína pueda reducirse. La delección de una región más larga puede habitualmente inactivar de manera más segura el gen. Además, se prefiere que los marcos de lectura de las secuencias en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de la región que va a delecionarse no sean los mismos.

La alteración de un gen también puede lograrse, por ejemplo, introduciendo una mutación para una sustitución de aminoácido (mutación de cambio de sentido), un codón de terminación (mutación sin sentido), una mutación del marco de lectura que añade o deleciona uno o dos residuos de nucleótido, o similares en la región codificante del gen en un cromosoma (Journal of Biological Chemistry, 272:8611-8617 (1997); Proceedings of the National

Academy of Sciences, EE.UU., 95 5511-5515 (1998); Journal of Biological Chemistry, 26 116, 20833-20839 (1991)).

La alteración de un gen también puede lograrse, por ejemplo, insertando otra secuencia en una región codificante del gen en un cromosoma. El sitio de la inserción puede ser en cualquier región del gen, y la inserción de una región más larga puede habitualmente inactivar de manera más segura el gen. Se prefiere que los marcos de lectura de las secuencias en el sentido de 5' y en el sentido de 3' del sitio de inserción no sean los mismos. La otra secuencia no está particularmente limitada siempre que se elija una secuencia que reduce o elimina la actividad de la proteína codificada, y los ejemplos de la misma incluyen, por ejemplo, un gen marcador tal como genes de resistencia a antibióticos, y un gen útil para la producción de una sustancia objetivo.

Tal modificación de un gen en un cromosoma tal como se describió anteriormente puede lograrse, por ejemplo, preparando un gen de tipo deficiente modificado de modo que es incapaz de producir una proteína que funciona normalmente, y transformando un huésped con un ADN recombinante que contiene el gen de tipo deficiente para provocar la recombinación homóloga entre el gen de tipo deficiente y el gen de tipo natural en un cromosoma y de ese modo sustituir el gen de tipo natural por el gen de tipo deficiente en el cromosoma. En este procedimiento, si se incluye un gen marcador seleccionado según las características del huésped tal como auxotrofia en el ADN recombinante, la operación se vuelve más fácil. Los ejemplos del gen de tipo deficiente incluyen un gen que incluye la delección de todo o una parte del gen, un gen que incluye una mutación de cambio de sentido, un gen que incluye una mutación sin sentido, un gen que incluye una mutación del marco de lectura y un gen que incluye la inserción de un transposón o gen marcador. La proteína codificada por el gen de tipo deficiente, incluso aunque se produzca, tiene una conformación diferente de la de la proteína de tipo natural y por tanto la función de la misma se reduce o se elimina. Tal alteración génica basada en sustitución génica utilizando recombinación homóloga ya se ha establecido, y hay métodos de uso de un ADN lineal tal como un método denominado "integración dirigida por Red" (Datsenko, K.A, y Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97:6640-6645 (2000)), y un método que utiliza la integración dirigida por Red en combinación con un sistema de escisión derivado del fago  $\lambda$  (Cho, E.H., Gumpert, R.I., Gardner, J.F., J. Bacteriol., 184:5200-5203 (2002)) (se remite al documento WO2005/010175), un método de uso de un plásmido que tiene un origen de replicación sensible a la temperatura, un método de uso de un plásmido capaz de transferencia conjugativa, un método de utilización de un vector suicida que no tiene un origen de replicación que funciona en un huésped (patente estadounidense n.º 6.303.383, patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 05-007491) y otros.

La modificación para reducir la actividad de una proteína puede lograrse también, por ejemplo, mediante un tratamiento de mutagénesis. Los ejemplos del tratamiento de mutagénesis incluyen irradiación de rayos X o ultravioleta y tratamiento con un agente de mutación tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), metanosulfonato de etilo (EMS) y metanosulfonato de metilo (MMS).

Cuando una proteína funciona como complejo que consiste en una pluralidad de subunidades, una parte de o toda la pluralidad de subunidades puede modificarse, siempre que la actividad de la proteína se reduzca en última instancia. Es decir, por ejemplo, una parte de o toda una pluralidad de genes que codifican para las respectivas subunidades pueden alterarse, o similar. Además, cuando hay una pluralidad de isozimas de una proteína, una parte de o todas las actividades de la pluralidad de isozimas pueden reducirse, siempre que la actividad de la proteína se reduzca en última instancia. Es decir, por ejemplo, una parte de o toda una pluralidad de genes que codifican para las isozimas respectivas pueden alterarse, o similar.

Puede confirmarse una reducción en la actividad de una proteína midiendo la actividad de la proteína.

También puede confirmarse una reducción en la actividad de una proteína confirmando una reducción en la expresión de un gen que codifica para la proteína. Puede confirmarse una reducción en la expresión de un gen confirmando una reducción en la cantidad de transcripción del gen o una reducción en la cantidad de la proteína expresada a partir del gen.

Puede confirmarse una reducción en la cantidad de transcripción de un gen comparando la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen con la de una cepa no modificada. Los ejemplos del método para evaluar la cantidad de ARNm incluyen hibridación de tipo Northern, RCP-TR y otros (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE.UU.), 2001). La cantidad de ARNm se reduce preferiblemente hasta, por ejemplo, el 50 % o menos, el 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, o el 0 %, de la de una cepa no modificada.

Puede confirmarse una reducción en la cantidad de una proteína mediante inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (EE.UU.) 2001). La cantidad de la proteína se reduce preferiblemente hasta, por ejemplo, el 50 % o menos, el 20 % o menos, el 10 % o menos, el 5 % o menos, o el 0 %, de la de una cepa no modificada.

La alteración de un gen puede confirmarse determinando la secuencia de nucleótidos de una parte de o todo el gen, el mapa de enzimas de restricción, la longitud completa, o similar del gen dependiendo de los medios usados para la alteración.

Los métodos mencionados anteriormente para reducir la actividad de una proteína tal como se mencionó anteriormente pueden aplicarse a la reducción en las actividades de proteínas arbitrarias tales como una enzima que cataliza una reacción que se desvía de la ruta de biosíntesis de un L-aminoácido objetivo para generar un compuesto distinto del L-aminoácido objetivo, y la reducción en la expresión de genes arbitrarios tales como genes que codifican para esas proteínas arbitrarias.

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

El método de la presente invención es un método para producir un L-aminoácido que comprende cultivar la bacteria de la presente invención en un medio, y recoger el L-aminoácido del medio. El L-aminoácido que va a producirse en la presente invención es un L-aminoácido de la familia de glutamato. En la presente invención, puede producirse una clase de L-aminoácido, o pueden producirse dos o más clases de L-aminoácidos.

El medio que va a usarse no está particularmente limitado, siempre que la bacteria de la presente invención pueda proliferar en el mismo, y pueda producirse un L-aminoácido objetivo. Como medio, por ejemplo, puede usarse un medio habitual usado para el cultivo de bacterias tales como bacterias corineformes. Como medio, por ejemplo, puede usarse un medio que contiene una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, fuente de fósforo y fuente de azufre, así como componentes seleccionados de otros diversos componentes orgánicos y componentes inorgánicos según se requiera. Los tipos y las concentraciones de los componentes del medio pueden determinarse apropiadamente según diversas condiciones tales como el tipo de bacteria corineforme que va a usarse.

Los ejemplos específicos de la fuente de carbono incluyen, por ejemplo, sacáridos tales como glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa, xilosa, arabinosa, melazas negras, hidrolizados de almidones e hidrolizados de biomasa, ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido fumárico, ácido cítrico y ácido succínico, alcoholes tales como glicerol, glicerol en bruto y etanol, y ácidos alifáticos. Como fuente de carbono, pueden usarse preferiblemente materiales derivados de plantas. Los ejemplos de la planta incluyen, por ejemplo, maíz, arroz, trigo, soja, caña de azúcar, remolacha y algodón. Los ejemplos de los materiales derivados de plantas incluyen, por ejemplo, órganos tales como raíz, tallo, tronco, rama, hoja, flor y semillas, cuerpos de plantas que los incluyen y productos de descomposición de estos órganos de plantas. Las formas de los materiales derivados de plantas en el momento de su uso no están particularmente limitadas, y pueden usarse en cualquier forma tal como producto no procesado, zumo, producto triturado y producto purificado. Pueden obtenerse pentosas tales como xilosa, hexosas tales como glucosa, o mezclas de ellas a partir de, por ejemplo, biomasa vegetal, y usarse. Específicamente, estos sacáridos pueden obtenerse sometiendo una biomasa vegetal a un tratamiento tal como tratamiento con vapor, hidrólisis con ácido concentrado, hidrólisis con ácido diluido, hidrólisis con una enzima tal como celulasa y tratamiento alcalino. Puesto que la hemicelulosa se hidroliza generalmente más fácilmente en comparación con la celulosa, la hemicelulosa en una biomasa vegetal puede hidrolizarse de antemano para liberar pentosas, y luego puede hidrolizarse la celulosa para generar hexosas. Además, la xilosa puede suministrarse mediante conversión a partir de hexosas, por ejemplo, confiriendo una ruta para convertir una hexosa tal como glucosa en xilosa a la bacteria de la presente invención. Como fuente de carbono, puede usarse una única clase de fuente de carbono, o pueden usarse dos o más clases de fuentes de carbono en combinación.

Los ejemplos específicos de la fuente de nitrógeno incluyen, por ejemplo, sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio y fosfato de amonio, fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne y productos de descomposición de proteínas de soja, amoniaco y urea. También puede usarse gas amoniaco o amoniaco acuoso para ajustar el pH como fuente de nitrógeno. Como fuente de nitrógeno, puede usarse una única clase de fuente de nitrógeno, o pueden usarse dos o más clases de fuentes de nitrógeno en combinación.

Los ejemplos específicos de la fuente de fosfato incluyen, por ejemplo, sales de ácido fosfórico tales como dihidrogenofosfato de potasio e hidrogenofosfato de dipotasio, y polímeros de ácido fosfórico tales como ácido pirofosfórico. Como fuente de fosfato, puede usarse una única clase de fuente de fosfato, o pueden usarse dos o más clases de fuentes de fosfato en combinación.

Los ejemplos específicos de la fuente de azufre incluyen, por ejemplo, compuestos de azufre inorgánico tales como sulfatos, tiosulfatos y sulfitos, y aminoácidos que contienen azufre tales como cisteína, cistina y glutatión. Como fuente de azufre, puede usarse una única clase de fuente de azufre, o pueden usarse dos o más clases de fuentes de azufre en combinación.

Los ejemplos específicos de otros diversos componentes orgánicos y componentes inorgánicos incluyen, por ejemplo, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio y cloruro de potasio; oligoelementos tales como hierro, manganeso, magnesio y calcio; vitaminas tales como vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, ácido nicotínico, nicotinamida y vitamina B12; aminoácidos; ácidos nucleicos; y componentes orgánicos que contienen aquellos tales como peptona, casaminoácido, extracto de levadura y producto de descomposición de proteínas de soja. Como otros diversos componentes orgánicos y componentes inorgánicos, puede usarse una única clase de componente, o pueden usarse dos o más clases de componentes en combinación.

Además, cuando se usa un mutante auxotrófico que requiere un nutriente tal como aminoácidos para el crecimiento del mismo, es preferible suministrar un nutriente requerido al medio.

5 Además, también es preferible, por ejemplo, restringir la cantidad de biotina en el medio, o añadir un tensioactivo o penicilina al medio.

10 Las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas siempre que la bacteria de la presente invención pueda proliferar, y pueda producirse un L-aminoácido objetivo. El cultivo puede realizarse, por ejemplo, en condiciones habituales usadas para cultivar bacterias tales como bacterias corineformes. Las condiciones de cultivo pueden fijarse apropiadamente según diversas condiciones tales como el tipo de bacteria corineforme que va a usarse.

15 El cultivo puede realizarse usando un medio líquido. En el momento del cultivo, por ejemplo, la bacteria de la presente invención cultivada sobre un medio sólido tal como medio de agar puede inocularse directamente en un medio líquido, o la bacteria de la presente invención cultivada en un medio líquido como cultivo de siembra puede inocularse en un medio líquido para el cultivo principal. Es decir, el cultivo puede realizarse como un cultivo de siembra y un cultivo principal separados. En tal caso, las condiciones de cultivo del cultivo de siembra y el cultivo principal pueden ser o no las mismas. La cantidad de la bacteria de la presente invención contenida en el medio en el momento del inicio del cultivo no está particularmente limitada. El cultivo principal puede realizarse, por ejemplo, 20 inoculando un caldo de cultivo de siembra en un medio para el cultivo principal a una cantidad del 1 al 50 % (v/v).

25 El cultivo puede realizarse como cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo continuo o una combinación de estos. El medio usado en el momento del inicio del cultivo también se denomina "medio de inicio". El medio suministrado al sistema de cultivo (tanque de fermentación) en el cultivo discontinuo alimentado o cultivo continuo también se denomina "medio de alimentación". Además, suministrar un medio de alimentación a un sistema de cultivo en cultivo discontinuo alimentado o cultivo continuo también se denomina "alimentar". Además, cuando el cultivo se realiza como un cultivo de siembra y cultivo principal separados, por ejemplo, tanto el cultivo de siembra como el cultivo principal pueden realizarse como un cultivo discontinuo. Alternativamente, por ejemplo, el cultivo de siembra puede realizarse como un cultivo discontinuo, y el cultivo principal puede realizarse como un cultivo discontinuo alimentado o cultivo continuo. 30

35 El cultivo puede realizarse, por ejemplo, en una condición aerobia. El término "condición aerobia" se refiere a una condición en la que la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido no es menor de 0,33 ppm, que es el límite de detección para la detección con un electrodo de membrana de oxígeno, o puede referirse preferiblemente a una condición en la que la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido no es menor de 1,5 ppm. La concentración de oxígeno puede controlarse para que sea, por ejemplo, del 5 al 50 %, preferiblemente de aproximadamente el 10 %, de la concentración de saturación de oxígeno. Específicamente, el cultivo en una condición aerobia puede realizarse mediante cultivo con aireación, cultivo con agitación, cultivo con mezclado, o una combinación de los mismos. El pH del medio puede ser, por ejemplo, de 3 a 10, preferiblemente de 4,0 a 9,5. 40 Durante el cultivo, el pH del medio puede ajustarse según se requiera. El pH del medio puede ajustarse usando diversas sustancias alcalinas y ácidas tales como gas amoníaco, amoníaco acuoso, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, carbonato de magnesio, hidróxido de sodio, hidróxido de calcio e hidróxido de magnesio. La temperatura de cultivo puede ser, por ejemplo, de 20 a 45 °C, preferiblemente de 25 a 37 °C. El periodo de cultivo puede ser, por ejemplo, de 10 a 120 horas. El cultivo puede continuarse, por ejemplo, hasta que la fuente de carbono contenida en el medio se consume, o hasta que la bacteria de la presente invención pierde la actividad. Al cultivar la bacteria de la presente invención en tales condiciones descritas anteriormente, se acumula un L-aminoácido en el medio. 45

50 Además, cuando se produce ácido L-glutámico, el cultivo puede realizarse usando un medio líquido ajustado para satisfacer una condición en la que precipita ácido L-glutámico, al tiempo que precipita ácido L-glutámico en el medio. Los ejemplos de la condición en la que precipita ácido L-glutámico incluyen, por ejemplo, pH de 5,0 a 4,0, preferiblemente pH de 4,5 a 4,0, más preferiblemente pH de 4,3 a 4,0, de manera particularmente preferible alrededor de pH 4,0 (documento EP 1078989 A).

55 La producción de un L-aminoácido puede confirmarse mediante métodos conocidos usados para la detección o identificación de compuestos. Los ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, HPLC, CL/EM, CG/EM y RMN. Estos métodos pueden usarse independientemente, o pueden usarse en una combinación apropiada.

60 El L-aminoácido producido puede recogerse del caldo de fermentación mediante métodos conocidos usados para la separación y purificación de compuestos. Los ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, el método de resina de intercambio iónico (Nagai, H. *et al.*, Separation Science and Technology, 39(16), 3691-3710), precipitación, separación con membrana (patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 9-164323 y patente japonesa abierta a consulta por el público (Kokai) n.º 9-173792) y cristalización (documentos WO2008/078448 y WO2008/078646). Estos métodos pueden usarse independientemente, o pueden usarse en una combinación 65 apropiada. Cuando se acumula L-aminoácido en células bacterianas, las células bacterianas pueden lisarse con, por ejemplo, ondas ultrasónicas o similares, y entonces el L-aminoácido puede recogerse mediante el método de resina

de intercambio iónico o similar del sobrenadante obtenido retirando las células de la suspensión de células lisadas mediante centrifugación. El L-aminoácido que va a recogerse puede ser un compuesto libre, una sal del mismo o una mezcla del mismo. Los ejemplos de la sal incluyen, por ejemplo, sulfato, clorhidrato, carbonato, sal de amonio, sal de sodio y sal de potasio. Cuando se produce ácido L-glutámico, el ácido L-glutámico que va a recogerse puede ser ácido L-glutámico libre, L-glutamato de sodio (L-glutamato monosódico, MSG), L-glutamato de amonio (L-glutamato monoamónico), o una mezcla de estos. Por ejemplo, puede obtenerse L-glutamato monosódico (MSG) añadiendo un ácido al caldo de fermentación para cristalizar el L-glutamato de amonio contenido en el mismo, y luego añadiendo una cantidad equimolar de hidróxido de sodio a los cristales. Además, puede realizarse decoloración usando carbono activado antes y/o después de la cristalización (véase, Tetsuya KAWAKITA, "Industrial Crystallization for Monosodium L-Glutamate.", Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japón, vol.56:5). El cristal de L-glutamato monosódico puede usarse como, por ejemplo, un condimento umami. El cristal de L-glutamato monosódico puede usarse también como condimento en combinación con un ácido nucleico tal como guanilato de sodio (sal de disodio de 5'-GMP) e inosinato de sodio (sal de disodio de 5'-IMP), que tienen también sabor umami.

Cuando el L-aminoácido precipita en el medio, puede recogerse mediante centrifugación, filtración, o similares. El L-aminoácido precipitado en el medio puede aislarse también junto con el L-aminoácido que se disuelve en el medio, tras cristalizarse el L-aminoácido que se disuelve en el medio.

El L-aminoácido recogido puede contener componentes tales como células bacterianas, componentes del medio, humedad y metabolitos subproducto de la bacteria además del L-aminoácido. El L-aminoácido recogido puede purificarse también en un grado deseado. La pureza del L-aminoácido recogido puede ser, por ejemplo, del 50 % (p/p) o superior, preferiblemente del 85 % (p/p) o superior, de manera particularmente preferible del 95 % (p/p) o superior (documentos JP1214636B, USP5.431.933, USP4.956.471, USP4.777.051, USP4.946.654, USP5.840.358, USP6.238.714 y US2005/0025878).

### Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se explicará más específicamente con referencia a ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo: Cultivo de producción de ácido glutámico usando una cepa que tiene una expresión potenciada del gen *kgtP*

En este ejemplo, se realizó la producción de ácido glutámico usando una cepa que produce ácido glutámico de *C. glutamicum* en la que se introdujo el gen *kgtP* derivado de *E. coli*, y se evaluó el efecto de una expresión potenciada del gen *kgtP* sobre la producción de ácido glutámico. El gen *kgtP* es un gen que codifica para un portador de captación de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico ( $\alpha$ -KG).

#### (1) Materiales

Los materiales usados en este ejemplo son los siguientes.

Tabla 1: Cebadores usados

Cebador	SEQ ID NO	Secuencia de nucleótidos (5' → 3')
1	1	ccaagcttgcatgcctgcagaggaggattataatggctgaaagtactgtaac
2	2	cggtaccgggggatccctaagacgcaccccctcc
3	3	gaattcgagctcggtagccg
4	4	actggccgtcgtttacaac
5	5	aaaacgacggccagtagatcacacaacagttcgcttg
6	6	accgagctcgaattcccgtttgaaaagtagttg
7	15	ctattctagaagcacaggaccggttgccattgatattccccta
8	16	ctagtctagacgggtgctacgcgattaaaacatcacacag

<Plásmidos usados>

pVK9

pVK9-*kgtP*

pVK9-BL-*xfp*

pVK9-*kgtP*-BL-*xfp*

<Cepas usadas>

*C. glutamicum* 2256 $\Delta$ *sucA* $\Delta$ *ldhA* *yggB*\*

*C. glutamicum* 2256 $\Delta$ *sucA* $\Delta$ *ldhA* *yggB*\*/pVK9

*C. glutamicum* 2256 $\Delta$ *sucA* $\Delta$ *ldhA* *yggB*\*/pVK9-*kgtP*

*C. glutamicum* 2256 $\Delta$ *sucA* $\Delta$ *ldhA* *yggB*\*/pVK9-BL\_*xfp*

*C. glutamicum* 2256 $\Delta$ *sucA* $\Delta$ *ldhA* *yggB*\*/pVK9-*kgtP*-BL\_*xfp*

(2) Construcción de plásmidos y cepas

<Construcción de pVK9-*kgtP*>

Se realizó RCP usando el ADN genómico de *E. coli* K-12 MG1655 (ATCC 47076) como molde, y los cebadores 1 y 2, para amplificar un fragmento de ADN que contenía el gen *kgtP* derivado de *E. coli* (GenBank: U00096.3 *kgtP*-ORF (1299 pb)). Se ligó el fragmento de ADN obtenido a pVK9 (US2006-0141588) que se había digerido con *Bam*HI y *Pst*I usando el kit In-fusion (TaKaRa Inc.), para construir un plásmido de expresión del gen *kgtP*, pVK9-*kgtP*. La secuencia de nucleótidos del gen *kgtP* de *E. coli* K-12 MG1655 y la secuencia de aminoácidos de la proteína KgtP codificada por el gen se muestran en SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente.

<Construcción de pVK9-BL\_*xfp*>

Se realizó RCP usando el ADN genómico de *Bifidobacterium longum* JCM1217 (ATCC 15707) como molde, y los cebadores 7 y 8, para amplificar un fragmento de ADN que contenía el gen *xfp* derivado de *Bifidobacterium longum* JCM1217 (ORF NO: BL0959). Se digirió el fragmento de ADN obtenido con *Xba*I y se ligó en el sitio *Xba*I de pVK9 usando ADN ligasa de T4, para construir un plásmido de expresión del gen *xfp*, pVK9-BL\_*xfp*. La secuencia de nucleótidos del gen *xfp* de *Bifidobacterium longum* JCM1217 y la secuencia de aminoácidos de la proteína KgtP codificada por el gen se muestran en SEQ ID NO: 9 y 10, respectivamente.

<Construcción de pVK9-*kgtP*-BL\_*xfp*>

Se realizó RCP usando el plásmido pVK9-*kgtP* construido anteriormente como molde, y los cebadores 3 y 4, para amplificar un fragmento de ADN que contenía el vector y el gen *kgtP*. Por separado, se realizó RCP usando el plásmido pVK9-BL\_*xfp* construido anteriormente como molde, y los cebadores 5 y 6, para amplificar un fragmento de ADN que contenía el vector y el gen *xfp*. Se ligaron los dos fragmentos de ADN obtenidos entre sí usando el kit In-fusion (TaKaRa Inc.), para construir un plásmido de coexpresión del gen *kgtP* y el gen *xfp*, pVK9-*kgtP*-BL\_*xfp*.

Se introdujo cada uno de los plásmidos en *C. glutamicum* 2256 $\Delta$ *sucA* $\Delta$ *ldhA* *yggB*\* (documento WO2014/185430), para construir cepas que tenían una expresión potenciada del gen *kgtP* y/o el gen *xfp*. La cepa 2256 $\Delta$ *sucA* $\Delta$ *ldhA* *yggB*\* es una cepa que produce ácido glutámico derivada de *C. glutamicum* 2256 (ATCC 13869). La cepa 2256 $\Delta$ *sucA* $\Delta$ *ldhA* *yggB*\* es deficiente en el gen *ldhA* y el gen *sucA*, y tiene una mutación de IS (V419::IS) en el gen *yggB*. La secuencia de nucleótidos de este gen *yggB* mutante (V419::IS) y la secuencia de aminoácidos de la proteína mutante YggB codificada por el gen se muestran en SEQ ID NO: 13 y 14, respectivamente.

(3) Cultivo de producción de ácido glutámico

Se realizó el cultivo de producción de ácido glutámico usando cada una de las cepas. Las composiciones de los medios usados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Medios usados

	Medio 1	Medio 2
Glucosa	80 g/l	80 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30 g/l	70 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,4 g/l	0,4 g/l
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,01 g/l	0,01 g/l
MnSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0,01 g/l	0,01 g/l
VB <sub>1</sub>	200 µg/l	200 µg/l
Biotina	60 µg/l	0 µg/l
Mameno*	0,48 g/l	0,48 g/l

Se preparó cada uno de los medios que tenían las composiciones mencionadas anteriormente y se ajustaron a pH 8,0 con KOH, y se esterilizaron mediante tratamiento en autoclave a 115 °C durante 15 minutos. Tras la esterilización, se añadió CaCO<sub>3</sub> a los medios en una cantidad de 50 g/l, y se realizó el cultivo. \*Mameno es hidrolizado de proteínas de soja.

(3-1) Cultivo 1: Evaluación del efecto de la potenciación únicamente con *kgtP*

Se realizó el cultivo (es decir, precultivo y cultivo principal) usando el medio mencionado anteriormente que contenía 50 g/l de CaCO<sub>3</sub> contenido en tubos de ensayo grandes con agitación en un agitador de caja a 31,5 °C. En primer lugar, se cultivó cada una de las cepas en el medio 1 durante 24 h como precultivo. Entonces, se inoculó el caldo de precultivo obtenido en el medio 2, para realizar el cultivo principal. Se tomaron muestras del caldo de cultivo 23 h tras la inoculación. Se cuantificaron la glucosa residual y el ácido glutámico usando el instrumento Biotech Analyzer AS-310 (Sakura SI).

Los resultados se muestran en la tabla 3. Se observó producción secundaria de  $\alpha$ -KG para la cepa de control 2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA *yggB*\*/pVK9. En cambio, se confirmó que la cantidad de producción secundaria de  $\alpha$ -KG disminuyó y la acumulación de ácido glutámico por azúcar consumido (es decir, rendimiento de ácido glutámico) mejoró en la cepa potenciada con *kgtP* 2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA *yggB*\*/pVK9-*kgtP*, en comparación con la cepa de control. Por tanto, se consideró que el gen *kgtP* es un factor eficaz para la producción de ácido glutámico.

Tabla 3: Evaluación del efecto de la potenciación únicamente con *kgtP*

Cultivo de producción de aminoácidos					
Huésped	Plásmido	Glutamato (g/l)	Glucosa residual (g/l)	Rendimiento (%)	Subproducto de $\alpha$ -KG (g/l)
2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA <i>yggB</i> *	pVK9	37,07	0,0	46,3	1,52
2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA <i>yggB</i> *	pVK9- <i>kgtP</i>	38,77	0,0	48,5	0,16

(3-2) Cultivo 2: Evaluación del efecto de la potenciación con *kgtP* en la cepa potenciada con *xfp*

Se realizó el cultivo (es decir, precultivo y cultivo principal) usando el medio mencionado anteriormente que contenía 50 g/l de CaCO<sub>3</sub> contenido en tubos de ensayo grandes con agitación en un agitador de caja a 31,5 °C. En primer lugar, se cultivó cada una de las cepas en el medio 1 durante 24 h como precultivo. Entonces, se inoculó el caldo de precultivo obtenido en el medio 1, para realizar el cultivo principal. Se tomaron muestras del caldo de cultivo 16 h tras la inoculación. Se cuantificaron la glucosa residual y el ácido glutámico usando el instrumento Biotech Analyzer AS-310 (Sakura SI).

Los resultados se muestran en la tabla 4. Se confirmó que la cantidad de producción secundaria de  $\alpha$ -KG aumentó en la cepa potenciada con *xfp* 2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA *yggB*\*/pVK9-BL-*xfp*, en comparación con la cepa de control. En cambio, se confirmó que la cantidad de producción secundaria de  $\alpha$ -KG disminuyó y la acumulación de ácido glutámico por azúcar consumido (es decir, rendimiento de ácido glutámico) mejoró en la cepa potenciada con los dos genes *kgtP* y *xfp*, 2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA *yggB*\*/pVK9-*kgtP*-BL-*xfp*, en comparación con la cepa potenciada con *xfp*. Por tanto, se consideró que el gen *kgtP* es un factor eficaz para la producción de ácido glutámico también en condiciones de potenciación con *xfp*.

Tabla 4: Evaluación del efecto de la potenciación con *kgtP* en la cepa potenciada con *xfp*

Cultivo de producción de aminoácidos					
Huésped	Plásmido	Glutamato (g/l)	Glucosa residual (g/l)	Rendimiento (%)	Subproducto de $\alpha$ -KG (g/l)
2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA <i>yggB</i> *	pVK9	35,50	0,4	44,6	1,86
2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA <i>yggB</i> *	pVK9-BL- <i>xfp</i>	38,95	1,4	49,6	2,61
2256 $\Delta$ sucA $\Delta$ ldhA <i>yggB</i> *	pVK9- <i>kgtP</i> -BL- <i>xfp</i>	39,00	2,9	50,6	1,87

Explicación de la lista de secuencias

SEQ ID NO:

1-6: Cebadores

7: Secuencia de nucleótidos del gen *kgtP* de *Escherichia coli* K-12 MG1655

8: Secuencia de aminoácidos de la proteína *KgtP* de *Escherichia coli* K-12 MG1655

9: Secuencia de nucleótidos del gen xfp de *Bifidobacterium longum* JCM1217

10: Secuencia de aminoácidos de la proteína Xfp de *Bifidobacterium longum* JCM1217

11: Secuencia de nucleótidos del gen yggB de *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

12: Secuencia de aminoácidos de la proteína YggB de *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

13: Secuencia de nucleótidos del gen yggB mutante (V419::IS) de *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

14: Secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen yggB mutante (V419::IS) de *Corynebacterium glutamicum* 2256 (ATCC 13869)

15 y 16: Cebadores

**Lista de secuencias**

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> Método para producir L-aminoácido de la familia de glutamato

<130> D784-16284

<150> Documento JP2015-215052

<151> 30-10-2015

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

ccaagctgtc atgcctgcag aggaggatta taatggctga aagtactgta ac

52

<210> 2

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

cggtaccgg ggatccctaa agacgcatcc ccttcc

36

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 3

gaattcgagc tcggtaccgg

20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

ES 2 706 323 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 4	
	actggccgtc gtttacaac	20
10	<210> 5	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 5	
	aaaacgacgg ccagtacatc acaacagttc gctttg	36
20	<210> 6	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 6	
30	accgagctcg aattcccgtt ttgaaaaagt atgttg	36
	<210> 7	
	<211> 1299	
	<212> ADN	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	
35	<400> 7	
	atggctgaaa gtactgtaac ggcagacagc aaactgacaa gtagtgatac tcgtcgccgc 60	
	atltgggcga ttgtgggggc ctcttcaggt aatctggctc agtggttcga tttctatgtc 120	
	tactcgttct gttcactcta ctttgcccac atcttcttcc cttccgggaa cacgacgact 180	
	caactactac aaacagcagg tgtttttgct gcgggattcc tgatgcgccc aatagggcgg 240	
	tggctatattg gccgcatagc cgataaacat ggtcgcacaaa aatcgatgct gttatcgggtg 300	
	tgtatgatgt gtttcggatc gctggtatc gcctgcctcc caggttatga aactataggt 360	
	acgtgggctc cggcattatt gcttctcgtc cgtttatttc agggattatc tgttggcggg 420	
	gaatatggca ccagcgcac ctatatgagt gaagtggccg ttgaaggggcg caaaggtttt 480	
	tacgcatcat ttcagtatgt gacgttgatc ggcggacaac tgctagccct actggttgtc 540	
	gtggttttac aacacacccat ggaagacgct gcactcagag agtggggatg gcgtattcct 600	
	ttcgcgtag gagctgtgtt agctgtttgt gcggttggtt tacgtcgtca gttagatgaa 660	
	acttcgcaac aagaaacgcg cgctttaaaa gaagctggat ctctgaaagg attatggcgc 720	
	aatcgcgctg cattcatcat ggttctcggc tttaccgctg cgggctccct ttgtttctat 780	
	accttcaacta cttatatgca gaagtatctg gtaaatactg cgggaatgca tgccaacgtg 840	
	gcgagtggca ttatgactgc cgcattgttt gtattcatgc ttattcaacc actcattggc 900	
	gcgctgtcgg ataagattgg tcgccgtacc tcaatgttat gtttcggttc gctggcagcc 960	
	atltttaccg ttcctattct ctcagcattg caaaacgttt cctcgcctta tgccgctttt 1020	
	ggtctggtga tgtgtgccct gctgatagtg agtttttata catcaatcag tggaaactg 1080	
	aaggctgaga tgttcccggc acaggttcgc gcattaggcg ttggctctgc atatgcggtc 1140	
	gctaatagcta tatttggtgg ttcggcggag tacgtagcgt tgtcgcctgaa atcaatagga 1200	
	atggaaacag ccttcttctg gtatgtgacc ttgatggccg tgggtggcgtt tctggtttct 1260	
	ttgatgctac atcgcacaaag gaaggggatg cgtctttag 1299	
40	<210> 8	
	<211> 432	
	<212> PRT	
	<213> <i>Escherichia coli</i>	

<400> 8

Met Ala Glu Ser Thr Val Thr Ala Asp Ser Lys Leu Thr Ser Ser Asp  
 1 5 10 15  
 Thr Arg Arg Arg Ile Trp Ala Ile Val Gly Ala Ser Ser Gly Asn Leu  
 20 25 30  
 Val Glu Trp Phe Asp Phe Tyr Val Tyr Ser Phe Cys Ser Leu Tyr Phe  
 35 40 45  
 Ala His Ile Phe Phe Pro Ser Gly Asn Thr Thr Thr Gln Leu Leu Gln  
 50 55 60  
 Thr Ala Gly Val Phe Ala Ala Gly Phe Leu Met Arg Pro Ile Gly Gly  
 65 70 75 80  
 Trp Leu Phe Gly Arg Ile Ala Asp Lys His Gly Arg Lys Lys Ser Met  
 85 90 95  
 Leu Leu Ser Val Cys Met Met Cys Phe Gly Ser Leu Val Ile Ala Cys  
 100 105 110  
 Leu Pro Gly Tyr Glu Thr Ile Gly Thr Trp Ala Pro Ala Leu Leu Leu  
 115 120 125  
 Leu Ala Arg Leu Phe Gln Gly Leu Ser Val Gly Gly Glu Tyr Gly Thr  
 130 135 140  
 Ser Ala Thr Tyr Met Ser Glu Val Ala Val Glu Gly Arg Lys Gly Phe  
 145 150 155 160  
 Tyr Ala Ser Phe Gln Tyr Val Thr Leu Ile Gly Gly Gln Leu Leu Ala  
 165 170 175  
 Leu Leu Val Val Val Leu Gln His Thr Met Glu Asp Ala Ala Leu  
 180 185 190  
 Arg Glu Trp Gly Trp Arg Ile Pro Phe Ala Leu Gly Ala Val Leu Ala  
 195 200 205  
 Val Val Ala Leu Trp Leu Arg Arg Gln Leu Asp Glu Thr Ser Gln Gln  
 210 215 220  
 Glu Thr Arg Ala Leu Lys Glu Ala Gly Ser Leu Lys Gly Leu Trp Arg  
 225 230 235 240  
 Asn Arg Arg Ala Phe Ile Met Val Leu Gly Phe Thr Ala Ala Gly Ser  
 245 250 255  
 Leu Cys Phe Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Met Gln Lys Tyr Leu Val Asn  
 260 265 270  
 Thr Ala Gly Met His Ala Asn Val Ala Ser Gly Ile Met Thr Ala Ala  
 275 280 285  
 Leu Phe Val Phe Met Leu Ile Gln Pro Leu Ile Gly Ala Leu Ser Asp  
 290 295 300  
 Lys Ile Gly Arg Arg Thr Ser Met Leu Cys Phe Gly Ser Leu Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Ile Phe Thr Val Pro Ile Leu Ser Ala Leu Gln Asn Val Ser Ser Pro  
 325 330 335  
 Tyr Ala Ala Phe Gly Leu Val Met Cys Ala Leu Leu Ile Val Ser Phe  
 340 345 350  
 Tyr Thr Ser Ile Ser Gly Ile Leu Lys Ala Glu Met Phe Pro Ala Gln  
 355 360 365  
 Val Arg Ala Leu Gly Val Gly Leu Ser Tyr Ala Val Ala Asn Ala Ile  
 370 375 380  
 Phe Gly Gly Ser Ala Glu Tyr Val Ala Leu Ser Leu Lys Ser Ile Gly  
 385 390 395 400  
 Met Glu Thr Ala Phe Phe Trp Tyr Val Thr Leu Met Ala Val Val Ala  
 405 410 415  
 Phe Leu Val Ser Leu Met Leu His Arg Lys Gly Lys Gly Met Arg Leu  
 420 425 430

- 5 <210> 9
- <211> 2478
- <212> ADN
- <213> *Bifidobacterium longum*

10 <400> 9

ES 2 706 323 T3

atgacgagtc	ctgttattgg	caccccttgg	aagaagctca	acgctccggt	ttccgaggaa	60
gccctcgaag	gcgttgacaa	gtactggcgc	gttgccaact	acctttccat	cggccagatt	120
tatctgcggt	ccaacccgct	gatgaaggag	cccttcaccc	gcgaagatgt	gaagcaccgt	180
ctggtggggc	actggggcac	tacccctggc	ctgaacttcc	tcatcggcca	catcaaccgt	240
ttcattgctg	accacggcca	gaacaccgtg	atcatcatgg	gcccgggcca	cgggtggcccg	300
gccggtacct	cccagtccta	cctggacggc	acctacaccg	agaccttccc	gaagatcacc	360
aaggacgaag	ctggtctgca	gaagtctctc	cgtcagttct	cttaccggg	cggcattccg	420
tcccacttcg	ctccggagac	cccgggctcc	atccacgagg	gtggtgagct	gggttacgct	480
ctgtcccacg	cttacggcgc	catcatggac	aacccgagcc	tgtttgctcc	ggccatcgtc	540
ggcgacggcg	aggctgagac	cggcccgcctg	gctaccggct	ggcagtccaa	caagctcgtg	600
aaccgcgca	ccgacggtat	cgtgctgccg	atcctgcacc	tcaacggcta	caagatcgcc	660
aaccgacca	tctgtcccg	catctccgac	gaagagctcc	acgagttctt	ccacggcatg	720
ggttacgagc	cctacgagtt	cgctcgtggc	ttcgtatgatg	aggaccacat	gtccatccac	780
cgctcgcttcg	ccgagctgtg	ggagaccatc	tgggacgaga	tctgcgacat	caaggccacc	840
gctcagaccg	acaacgtgca	ccgtccgttc	tacccgatgc	tgatcttccg	caccccgaag	900
ggctggacct	gcccgaagta	catcgacggc	aagaagaccg	agggctcctg	gcgttcccac	960
caggtgccgc	tggcttccgc	ccgcgacacc	gaggcccaact	tcgaggttct	caagaactgg	1020
ctcgagtcct	acaagccgga	agagctgttc	gacgccaacg	gtgctgtcaa	ggacgacgtc	1080
cttgccctca	tgccgaagg	cgagctgcgt	atcggtgcca	acccgaacgc	caacggtggt	1140
gtgatccgca	acgacctgaa	gctgccgaac	ctcgaggact	acgaggtcaa	ggaagtggct	1200
gagtacggcc	acggctgggg	ccagctcgag	gccacccgta	ccctgggtgc	ctacactcgc	1260
gacatcatca	agaacaaccc	gcgcgacttc	cgcactctcg	gaccggatga	gaccgcttcc	1320
aaccgtctgc	aggcttccta	cgaagtcacc	aacaagcagt	gggatgccgg	ctacatctcc	1380
gacgaggtcg	acgagcacat	gcacgtctcc	ggccaggtcg	ttgagcagct	gtccgagcac	1440
cagatggaag	gcttcctcga	ggcttacctg	ctgaccggtc	gtcacggcat	ctggagctcc	1500
tacgagtcct	tcgtccacgt	gatcgactcc	atgctgaacc	agcacgcca	gtggcttgag	1560
gctaccgtcc	gcgagattcc	gtggcgcaag	ccgattgcct	ccatgaacct	gctggtctcc	1620
tcccacgttt	ggcgtcagga	ccacaacggc	ttctcccacc	aggatccggg	tgtcacctcc	1680
gtcctgctga	acaagtgctt	ccacaacgac	cacgtcatcg	gcatctactt	cgccaccgat	1740
gcgaacatgc	tgctggccat	cgccgagaag	tgctacaagt	ccaccaaaa	gatcaacgcc	1800
atcatcgctg	gtaagcagcc	tgctgccacc	tggctgacct	tgacgagggc	tcgtgccgag	1860
ctcgagaagg	gtgccgccgc	ttgggatg	gcttccaccg	ccaagaaaa	cgatgaggcc	1920
gaggtcgtgc	ttgccgccgc	cgccgatgct	ccgactcagg	agatcatggc	tgcttccgac	1980
aagctgaagg	aactgggcat	caagttcaag	gttgtgaacg	ttgccgacct	gctctccctg	2040
cagtccgcca	aggagaacga	cgaggctctg	accgacgagg	agttcgccga	catcttcacc	2100
gccgacaagc	cgggtgctgtt	cgctaccac	tctacgctc	acgacgtgcy	tggcctgatc	2160
tacgaccgtc	cgaaccacga	caacttcaac	gtccacggct	acgaggagga	gggctccacc	2220
accaccccg	acgacatggt	tcgtgtcaac	cgcacgacc	gctacgagct	gaccgctgag	2280
gctctgcgca	tgatcgacgc	cgacaagtac	gccgacaaga	tcgacgagct	cgagaagttc	2340
cgtgatgagg	ccttccagtt	cgccgtcgac	aacggctacg	atcaccggga	ctacaccgac	2400
tgggtgtact	ccggcgtgaa	caccgacaag	aagggtgccg	tcaccgctac	cgccgctacc	2460
gctggcgaca	acgagtga					2478

<210> 10

5 <211> 825

<212> PRT

<213> *Bifidobacterium longum*

<400> 10

ES 2 706 323 T3

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

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

ES 2 706 323 T3

Glu Val Val Leu Ala Ala Ala Gly Asp Val Pro Thr Gln Glu Ile Met  
 645 650 655  
 Ala Ala Ser Asp Lys Leu Lys Glu Leu Gly Ile Lys Phe Lys Val Val  
 660 665 670  
 Asn Val Ala Asp Leu Leu Ser Leu Gln Ser Ala Lys Glu Asn Asp Glu  
 675 680 685  
 Ala Leu Thr Asp Glu Glu Phe Ala Asp Ile Phe Thr Ala Asp Lys Pro  
 690 695 700  
 Val Leu Phe Ala Tyr His Ser Tyr Ala His Asp Val Arg Gly Leu Ile  
 705 710 715 720  
 Tyr Asp Arg Pro Asn His Asp Asn Phe Asn Val His Gly Tyr Glu Glu  
 725 730 735  
 Glu Gly Ser Thr Thr Thr Pro Tyr Asp Met Val Arg Val Asn Arg Ile  
 740 745 750  
 Asp Arg Tyr Glu Leu Thr Ala Glu Ala Leu Arg Met Ile Asp Ala Asp  
 755 760 765  
 Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Asp Glu Leu Glu Lys Phe Arg Asp Glu Ala  
 770 775 780  
 Phe Gln Phe Ala Val Asp Asn Gly Tyr Asp His Pro Asp Tyr Thr Asp  
 785 790 795 800  
 Trp Val Tyr Ser Gly Val Asn Thr Asp Lys Lys Gly Ala Val Thr Ala  
 805 810 815  
 Thr Ala Ala Thr Ala Gly Asp Asn Glu  
 820 825

<210> 11

<211> 1602

5 <212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 11

atgatttttag gcgtacccat tcaatatttg ctctattcat tgtggaattg gattgtcgat 60  
 accggttttg atgtagcaat taccctggtc ttggcgtttt tgattccacg tatcggccga 120  
 ctggccatgc gtattatcaa gcagcgagtg gagtctgcag ccgatgcgga caccactaag 180  
 aaccagctcg cgttcgctgg cgttggcgtt tatatcgcgc aaattgtggc gtttttcatg 240  
 cttgccgtct ccgcgatgca ggcttttggg ttctctctcg cgggcgctgc gattccggca 300  
 accattgcgt cagctgccat tggctttggg gcgcagtcga ttgttgcgga cttcttggcc 360  
 ggatttttca tcctgacgga aaagcaattc ggcggtgggtg actgggtgcg ctttgagggc 420  
 aacggcatcg ttgttgaagg caccgtcatt gagatcacca tgcgcgcgac caaaattcgc 480  
 acgattgcac aagagaccgt gatcatcccg aactccacgg cgaaagtgtg catcaacaat 540  
 tctaataact ggtcgcgtgc ggttgtcgtt attccgatcc ccatggtggg ttctgaaaac 600  
 atcacagatg tcatcgcgcg ctctgaagct gcgactcgtc gcgcacttgg ccaggagaaa 660  
 atcgcaccgg aaatcctcgg tgaactcgat gtgcaccag ccacggaagt cacaccgcca 720  
 acggtgggtc gcatgccgtg gatggtcacc atgcgtttcc tcgtgcaagt caccgcccgc 780  
 aatcaatggc tggtcgaacg cgccatccgc acagaaatca tcaacgaatt ctgggaagaa 840  
 tacggcagcg caaccactac atcgggaacc ctcatgtatt ccttacacgt tgagcatgaa 900  
 gagccaaaga cctcgcttat cgacgcctcc ccccaggctc ttaaggaacc gaagccggag 960  
 gctgcggcga cggttgcatc gctagctgca tcgtctaacg acgatgcaga caatgcagac 1020  
 gcctcggcga tcaatgcagg caatccagag aaggaacttg attccgatgt gctggaacaa 1080  
 gaactctcca gcgaagaacc ggaagaacaa gcaaaaccag atcactctct ccgaggcttc 1140  
 ttccgcactg attactaccc aaatcgggtg cagaagatcc tgtcgttttg cggacgtgtc 1200  
 cgcatgagca cttccctggt gttgggtgcg ctgctcttgc tgtcactatt taaggtcatg 1260  
 actgtggaac caagtgagaa ttggcaaaac tccagtgat ggctgtcacc aagcactgcc 1320  
 acctcaactg cggtgaccac ctcccgaact tccgcgcgag caagcacgcc ttcgatgaca 1380  
 gtgcccacta cggtgaggga gaccccaacg atggaaatcta gcgtcgaaac gcagcaggaa 1440  
 acctcaaccc ctgcaaccgc aacgccccag cgagccgaca ccatcgaacc gaccgaggaa 1500  
 gccacgtcgc aggaggaaac gactgcatcg cagacgcagt ctccagcagt ggaagcacca 1560  
 accgcggtcc aagaaacagt tgcgcccagc tccaccctt ag 1602

10

<210> 12

<211> 533

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

ES 2 706 323 T3

<400> 12

Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn  
1 5 10 15  
Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala  
20 25 30  
Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Gln  
35 40 45  
Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala  
50 55 60  
Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met  
65 70 75 80  
Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala  
85 90 95  
Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln  
100 105 110  
Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys  
115 120 125  
Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val  
130 135 140  
Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg  
145 150 155 160  
Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val  
165 170 175  
Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro  
180 185 190  
Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser  
195 200 205  
Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu  
210 215 220  
Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro  
225 230 235 240  
Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln  
245 250 255  
Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu  
260 265 270  
Ile Ile Asn Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser  
275 280 285  
Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr  
290 295 300  
Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu  
305 310 315 320  
Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala  
325 330 335  
Asp Asn Ala Asp Ala Ser Ala Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu  
340 345 350  
Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu  
355 360 365  
Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp  
370 375 380  
Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val  
385 390 395 400  
Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu  
405 410 415  
Phe Lys Val Met Thr Val Glu Pro Ser Glu Asn Trp Gln Asn Ser Ser  
420 425 430  
Gly Trp Leu Ser Pro Ser Thr Ala Thr Ser Thr Ala Val Thr Thr Ser  
435 440 445  
Glu Thr Ser Ala Pro Ala Ser Thr Pro Ser Met Thr Val Pro Thr Thr  
450 455 460  
Val Glu Glu Thr Pro Thr Met Glu Ser Ser Val Glu Thr Gln Gln Glu

ES 2 706 323 T3

```

465                               470                               475                               480
Thr Ser Thr Pro Ala Thr Ala Thr Pro Gln Arg Ala Asp Thr Ile Glu
                               485                               490                               495
Pro Thr Glu Glu Ala Thr Ser Gln Glu Glu Thr Thr Ala Ser Gln Thr
                               500                               505                               510
Gln Ser Pro Ala Val Glu Ala Pro Thr Ala Val Gln Glu Thr Val Ala
                               515                               520                               525
Pro Thr Ser Thr Pro
                               530

```

```

<210> 13
<211> 3063
5 <212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

```

```

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1269)

```

```

<400> 13
atg att tta ggc gta ccc att caa tat ttg ctc tat tca ttg tgg aat      48
Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn
1                               5                               10                               15
tgg att gtc gat acc ggt ttt gat gta gca att atc ctg gtc ttg gcg      96
Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala
                               20                               25                               30
ttt ttg att cca cgt atc ggc cga ctg gcc atg cgt att atc aag cag      144
Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Gln
                               35                               40                               45
cga gtg gag tct gca gcc gat gcg gac acc act aag aac cag ctc gcg      192
Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala
                               50                               55                               60
ttc gct ggc gtt ggc gtt tat atc gcg caa att gtg gcg ttt ttc atg      240
Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met
65                               70                               75                               80
ctt gcc gtc tcc gcg atg cag gct ttt ggt ttc tct ctc gcg ggc gct      288
Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala
                               85                               90                               95
gcg att ccg gca acc att gcg tca gct gcc att ggt ctt ggt gcg cag      336
Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln
                               100                              105                              110
tcg att gtt gcg gac ttc ttg gcc gga ttt ttc atc ctg acg gaa aag      384
Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys
                               115                              120                              125
caa ttc ggc gtg ggt gac tgg gtg cgc ttt gag ggc aac ggc atc gtt      432
Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val
                               130                              135                              140
gtt gaa ggc acc gtc att gag atc acc atg cgc gcg acc aaa att cgc      480
Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg
145                              150                              155                              160
acg att gca caa gag acc gtg atc atc ccg aac tcc acg gcg aaa gtg      528
Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val
                               165                              170                              175
tgc atc aac aat tct aat aac tgg tcg cgt gcg gtt gtc gtt att ccg      576
Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro
                               180                              185                              190
atc ccc atg ttg ggt tct gaa aac atc aca gat gtc atc gcg cgc tct      624
Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser
                               195                              200                              205
gaa gct gcg act cgt cgc gca ctt ggc cag gag aaa atc gca ccg gaa      672
Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu

```

ES 2 706 323 T3

210	215	220	
atc ctc ggt gaa ctc gat gtg cac cca gcc acg gaa gtc aca ccg cca			720
Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro			
225	230	235	240
acg gtg gtc ggc atg ccg tgg atg gtc acc atg cgt ttc ctc gtg caa			768
Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln			
	245	250	255
gtc acc gcc ggc aat caa tgg ctg gtc gaa cgc gcc atc cgc aca gaa			816
Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu			
	260	265	270
atc atc aac gaa ttc tgg gaa gaa tac ggc agc gca acc act aca tcg			864
Ile Ile Asn Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser			
	275	280	285
gga acc ctc att gat tcc tta cac gtt gag cat gaa gag cca aag acc			912
Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr			
	290	295	300
tcg ctt atc gac gcc tcc ccc cag gct ctt aag gaa ccg aag ccg gag			960
Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu			
	305	310	315
gct gcg gcg acg gtt gca tcg cta gct gca tcg tct aac gac gat gca			1008
Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala			
	325	330	335
gac aat gca gac gcc tcg gcg atc aat gca ggc aat cca gag aag gaa			1056
Asp Asn Ala Asp Ala Ser Ala Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu			
	340	345	350
ctt gat tcc gat gtg ctg gaa caa gaa ctc tcc agc gaa gaa ccg gaa			1104
Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu			
	355	360	365
gaa aca gca aaa cca gat cac tct ctc cga ggc ttc ttc cgc act gat			1152
Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp			
	370	375	380
tac tac cca aat cgg tgg cag aag atc ctg tcg ttt ggc gga cgt gtc			1200
Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val			
	385	390	395
cgc atg agc act tcc ctg ttg ttg ggt gcg ctg ctc ttg ctg tca cta			1248
Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu			
	405	410	415
ttt aag ggg ctc ttc ctg ttt tagagtgcac tgatcttatg gaccaactgc			1299
Phe Lys Gly Leu Phe Leu Phe			
420			
cctgaatgga taaggcaccg cagaatgtag tggttcaaat tacggaaacc tagagcaatc			1359
ccacgcaaat gctccaaccg tccggtgatc gcttcgaccg gaccggttga gacaccaaca			1419
tcgaaatcag ccaacacatc accaagtctt ttaaacaac tacgaccaa ctgcgcgagt			1479
tccttattcg gcccttcaa caccggaagc tgatcaataa tgggtccgcat tttcttcttc			1539
gcttcacgct tattaccat ctgataaaca tcaataatcg cctgatacgc aagccacgca			1599
agctttaaca ccccgtagtc tttgtcatac gcccaaac gctccaagct ttcttgctga			1659
cgaggactca accactgtg cgtggtcaac aaggtcttcc ggtttttata caacggatcc			1719
tggcttaaac cagcagctg gtatttctcc cgctggaggc gttgccggca ggcggtgagc			1779
ttgtcaccag caagccgcac aacatggaat ggatccatca cgcgacgagc agaaggaatg			1839
agttctttac ttgctgtggc gtagccttgg aaccatcca tggacacgat ccgtatctga			1899
ttgcggaact gttcaccgcg ggaaccaagc caggaccgta aagcatcagc actacgacct			1959
gggacgacat ctaataaccg ggcaggacac cgtgagtcac accgatgccc ggtcatatcg			2019
acaatcacgg tgacaaacc atcaccatgc ttagccctat tatgtgacca cttatgctca			2079
tcaccccaa ggacatac tccatcaaga tggtaggat cgttatagac cagctcacgg			2139
cacatctga ggcgtagtg gcaggttaaa tcccacccta gcccaagtgc tttcgcggtt			2199
gcgtgaacac tcatccggtc aatagcaagg cgttgcaaaa tccagcgggt gaccggtgg			2259
gtgacctttt taccgtggtc agcgcagctt agttctgctt ggaaatactt ttgcttacct			2319
gtcgggttgg tgcagcggta gcgaggtaga cggataaaca gtttggtggg aaaccgacg			2379
atgggtaaat caatgagcat ccggtgggtg tgatgacgaa acaccacagg ttgggagcat			2439
tctgggcagg tggaggtata gtcgagtgcg tctgcttcca tcaggtgta atcacctgca			2499
tcggaagcgc cggatgatgt gagtcctagt tccgcagtgcc ggcagatggt gtcagcgatg			2559
atggtgccc tagacttcat gggtagagcc ttttggttgg gtttggttag cttagatacc			2619
taaacttaa ccctgacaaa aggctcgttt attttcgggt ctacaccgct agcccaggtt			2679

ctgtgatgta ccccaaaacc ggaagggcca ttaaggtca tgactgtgga accaagtgag 2739  
aattggcaaa actccagtg atggctgtca ccaagcactg ccacctcaac tgcggtgacc 2799  
acctccgaaa cttccgcgcc agcaagcacg ccttcgatga cagtgccac tacggtggag 2859  
gagaccccaa cgatggaatc tagcgtcgaa acgcagcagg aaacctcaac ccctgcaacc 2919  
gcaacgcccc agcgagccga caccatcgaa ccgaccgagg aagccacgtc gcaggaggaa 2979  
acgactgcat cgcagacgca gtctccagca gtggaagcac caaccgcggt ccaagaaaca 3039  
gttgcgccga cgtccacccc ttag 3063

<210> 14

<211> 423

5 <212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 14

Met Ile Leu Gly Val Pro Ile Gln Tyr Leu Leu Tyr Ser Leu Trp Asn  
1 5 10 15  
Trp Ile Val Asp Thr Gly Phe Asp Val Ala Ile Ile Leu Val Leu Ala  
20 25 30  
Phe Leu Ile Pro Arg Ile Gly Arg Leu Ala Met Arg Ile Ile Lys Gln  
35 40 45  
Arg Val Glu Ser Ala Ala Asp Ala Asp Thr Thr Lys Asn Gln Leu Ala  
50 55 60  
Phe Ala Gly Val Gly Val Tyr Ile Ala Gln Ile Val Ala Phe Phe Met  
65 70 75 80  
Leu Ala Val Ser Ala Met Gln Ala Phe Gly Phe Ser Leu Ala Gly Ala  
85 90 95  
Ala Ile Pro Ala Thr Ile Ala Ser Ala Ala Ile Gly Leu Gly Ala Gln  
100 105 110  
Ser Ile Val Ala Asp Phe Leu Ala Gly Phe Phe Ile Leu Thr Glu Lys  
115 120 125  
Gln Phe Gly Val Gly Asp Trp Val Arg Phe Glu Gly Asn Gly Ile Val  
130 135 140  
Val Glu Gly Thr Val Ile Glu Ile Thr Met Arg Ala Thr Lys Ile Arg  
145 150 155 160  
Thr Ile Ala Gln Glu Thr Val Ile Ile Pro Asn Ser Thr Ala Lys Val  
165 170 175  
Cys Ile Asn Asn Ser Asn Asn Trp Ser Arg Ala Val Val Val Ile Pro  
180 185 190  
Ile Pro Met Leu Gly Ser Glu Asn Ile Thr Asp Val Ile Ala Arg Ser  
195 200 205  
Glu Ala Ala Thr Arg Arg Ala Leu Gly Gln Glu Lys Ile Ala Pro Glu  
210 215 220  
Ile Leu Gly Glu Leu Asp Val His Pro Ala Thr Glu Val Thr Pro Pro  
225 230 235 240  
Thr Val Val Gly Met Pro Trp Met Val Thr Met Arg Phe Leu Val Gln  
245 250 255  
Val Thr Ala Gly Asn Gln Trp Leu Val Glu Arg Ala Ile Arg Thr Glu  
260 265 270  
Ile Ile Asn Glu Phe Trp Glu Glu Tyr Gly Ser Ala Thr Thr Thr Ser  
275 280 285  
Gly Thr Leu Ile Asp Ser Leu His Val Glu His Glu Glu Pro Lys Thr  
290 295 300  
Ser Leu Ile Asp Ala Ser Pro Gln Ala Leu Lys Glu Pro Lys Pro Glu  
305 310 315 320  
Ala Ala Ala Thr Val Ala Ser Leu Ala Ala Ser Ser Asn Asp Asp Ala  
325 330 335  
Asp Asn Ala Asp Ala Ser Ala Ile Asn Ala Gly Asn Pro Glu Lys Glu  
340 345 350  
Leu Asp Ser Asp Val Leu Glu Gln Glu Leu Ser Ser Glu Glu Pro Glu  
355 360 365  
Glu Thr Ala Lys Pro Asp His Ser Leu Arg Gly Phe Phe Arg Thr Asp  
370 375 380

ES 2 706 323 T3

Tyr Tyr Pro Asn Arg Trp Gln Lys Ile Leu Ser Phe Gly Gly Arg Val  
 385 390 395 400  
 Arg Met Ser Thr Ser Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Ser Leu  
 405 410 415  
 Phe Lys Gly Leu Phe Leu Phe  
 420

5 <210> 15  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador

<400> 15  
 ctattctaga agcacaggac cgttgcat tgatattccc cta 43

15 <210> 16  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador

<400> 16  
 ctagtctaga cggggtgcta cgcgattaaa acatcacaac ag 42

## REIVINDICACIONES

1. Método para producir un L-aminoácido, comprendiendo el método:
  - 5 cultivar una bacteria corineforme que tiene una capacidad de producción de L-aminoácidos en un medio; y
  - recoger el L-aminoácido del medio, en el que la bacteria se ha modificado de modo que se aumenta la actividad de un portador de captación de ácido  $\alpha$ -cetoglutarico ( $\alpha$ -KG) en comparación con una cepa no modificada, y
  - 10 en el que el L-aminoácido es un L-aminoácido de la familia de glutamato,
  - en el que dicho L-aminoácido de la familia de glutamato consiste en uno o más L-aminoácidos seleccionados de ácido L-glutámico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-citrulina y L-ornitina.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el portador de captación de  $\alpha$ -KG es una proteína codificada por el gen *kgtP*.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el portador de captación de  $\alpha$ -KG es una proteína definida en (a), (b) o (c) mencionados a continuación:
  - (a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
  - 25 (b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, pero que incluye sustitución, delección, inserción y/o adición de 1 a 10 residuos de aminoácido, y que tiene una actividad de captación de  $\alpha$ -KG;
  - (c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 90 % o más con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y que tiene actividad de captación de  $\alpha$ -KG.
- 30 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se aumenta la actividad del portador de captación de  $\alpha$ -KG aumentando la expresión de un gen que codifica para el portador de captación de  $\alpha$ -KG.
- 35 5. Método según la reivindicación 4, en el que se aumenta la expresión del gen aumentando el número de copias del gen y/o modificando una secuencia de control de la expresión del gen.
- 40 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la bacteria se ha modificado adicionalmente de modo que la actividad de fosfoacetolasa se aumenta en comparación con una cepa no modificada, en el que la fosfoacetolasa consiste en D-xilulosa-5-fosfato fosfoacetolasa y/o fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa.
- 45 7. Método según la reivindicación 6, en el que se aumenta la actividad de la fosfoacetolasa aumentando la expresión de un gen que codifica para la fosfoacetolasa.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la bacteria se ha modificado adicionalmente de modo que la actividad de  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa y/o succinato deshidrogenasa se reduce en comparación con una cepa no modificada.
- 50 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la bacteria es una bacteria *Corynebacterium*.
10. Método según la reivindicación 9, en el que la bacteria es *Corynebacterium glutamicum*.
- 55 11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el L-aminoácido de la familia de glutamato es ácido L-glutámico.
- 60 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ácido L-glutámico es L-glutamato monoamónico o L-glutamato monosódico.
13. Método según la reivindicación 11 ó 12, en el que la bacteria se ha modificado adicionalmente para albergar un gen *yggB* mutante, en el que el gen *yggB* mutante es un gen *yggB* que tiene una mutación que mejora la capacidad de producción de ácido L-glutámico de la bacteria corineforme.
- 65 14. Método según la reivindicación 13, en el que el gen *yggB* mutante es un gen *yggB* que tiene una mutación

definida en (1), (2) o (3) mencionados a continuación:

(1) una mutación en la región que codifica para los residuos de aminoácido en las posiciones 419 a 533 de una proteína YggB de tipo natural, en el que la proteína YggB de tipo natural es una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12,

(2) una mutación en la región que codifica para una región transmembrana de una proteína YggB de tipo natural, y

(3) una combinación de las mismas.

15. Método según la reivindicación 14, en el que en el punto (2) la proteína YggB de tipo natural es una proteína definida en (a), (b) o (c) mencionados a continuación:

(a) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;

(b) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, pero que incluye sustitución, delección, inserción y/o adición de 1 a 10 residuos de aminoácido, y que tiene la propiedad de que una expresión aumentada de la misma en la bacteria corineforme proporciona una capacidad de producción mejorada de ácido L-glutámico de la bacteria corineforme;

(c) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra una identidad del 90 % o más con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y que tiene la propiedad de que una expresión aumentada de la misma en la bacteria corineforme proporciona una capacidad de producción mejorada de ácido L-glutámico de la bacteria corineforme.