



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 881**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08704743 .7**

96 Fecha de presentación : **11.01.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2102347**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54 Título: **Variedad de *Corynebacterium glutamicum* que produce L-arginina y método para fabricar la misma.**

30 Prioridad: **18.01.2007 KR 20070005831**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.09.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.09.2011**

73 Titular/es: **CJ CHEILJEDANG CORPORATION**  
**292, Ssangnim-dong**  
**Jung-gu, Seoul, 100-400, KR**

72 Inventor/es: **Kim, Hye Won;**  
**Choi, Hyejin;**  
**Lee, Ji-Hye y**  
**Hwang, Soo Youn**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 881 T3

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

## DESCRIPCION

Variedad de *Corynebacterium glutamicum* que produce L-arginina y método para fabricar la misma.

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a una cepa mutante productora de L-arginina, que produce L-arginina con un alto rendimiento para ser usada en las industrias medicinales y farmacéuticas, y a un método para fabricar la misma. En particular, la presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende un gen *argD2* (*Ncgl2355*) que es un supuesto gen de la acetilornitina-aminotransferasa implicada en la biosíntesis de arginina por *Corynebacterium glutamicum*, un polipéptido codificado por el polinucleótido, un vector recombinante que comprende el polinucleótido, un transformante capaz de producir L-arginina con alto rendimiento, que se prepara introduciendo el vector  
10 recombinante en un microorganismo hospedante productor de L-arginina para sobre-expresar el gen *argD2* y a un método para producir L-arginina cultivando el transformante.

### Fundamento técnico

15 La L-arginina es un aminoácido que en su forma libre se encuentra en semillas de plantas o en el ajo. La L-arginina ha sido ampliamente usada como un aditivo eficiente en medicamentos, alimentos o similares. La L-arginina es útil como fármaco para mejorar la función hepática y la función cerebral y para tratar la esterilidad masculina, y como un ingrediente de de suplementos de múltiples aminoácidos. Además, la L-arginina se ha usado como aditivo alimenticio en croquetas de pescado y bebidas dietéticas, y recientemente ha ganado interés como sustituto de la sal común para pacientes hipertensos.

20 Los métodos convencionales para la producción de L-arginina por fermentación biológica se basan en la producción de L-arginina directamente a partir de fuentes carbonadas y nitrogenadas. Por ejemplo, la L-arginina puede ser producida usando una cepa mutante derivada de un microorganismo productor de ácido glutámico que pertenece al género *Brevibacterium* o *Corynebacterium* (Publicaciones de patentes japonesas no examinadas N° Sho57-163487, Sho60-83593 y Sho62-265988) o usando un microorganismo productor del aminoácido, cuyas propiedades de crecimiento son mejoradas mediante la fusión celular (Publicación de patente japonesa no publicada N° Sho59-158185). Recientemente se ha descrito que la L-arginina se puede producir usando una cepa recombinante, en la cual está inactivado su gen *argR* que participa en la regulación de la biosíntesis de arginina (Solicitud de patente de EE.UU. N° 2002/0045223A1) y usando un método para sobre-expresar un gen *argF* del operón de arginina (Solicitud de patente coreana N° 10-2004-107215).

30 En los microorganismos, la biosíntesis de L-arginina transcurre en ocho etapas enzimáticas que parten del precursor L-glutamato y sigue dos vías diferentes, la vía lineal y la vía cíclica.

35 En microorganismos que pertenecen al género *Corynebacterium*, la L-arginina se sintetiza a través de la vía cíclica a partir de L-glutamato vía N-acetilglutamato, fosfato de N-acetilglutamilo, N-acetilglutamato-semialdehído, N-acetilornitina, ornitina, citrulina y argininosuccinato. Estos productos intermedios se sintetizan a través de reacciones consecutivas catalizadas por enzimas tales como glutamato N-acetiltransferasa, N-acetilglutamato-quinasa, acetilglutamato-semialdehído-deshidrogenasa, acetilornitina-aminotransferasa, ornitina-carbamoiltransferasa, argininosuccinato-sintasa y argininosuccinato-liasa. Estas enzimas están codificadas por los genes *argJ*, *argB*, *argC*, *argD*, *argF*, *argG* y *argH*, respectivamente.

40 Para producir L-arginina con alto rendimiento, los autores de la presente invención han realizado estudios sobre las enzimas implicadas en la biosíntesis de L-arginina durante un largo periodo de tiempo. Encontraron que en la etapa intermedia de la biosíntesis de arginina, se amplifica la reacción enzimática implicaba la conversión de N-acetilglutamato-semialdehído en N-acetilornitina para aumentar el flujo de L-arginina, mejorando de este modo la productividad de L-arginina.

45 En las células está presente una variedad de aminotransferasas, y se dividen en cuatro subgrupos sobre la base de su relación estructural mutua. El subgrupo I comprende aspartilornitina, alanina, tirosina, histidilfosfato y fenilalanina -aminotransferasas, el subgrupo II comprende acetilornitina, ornitina,  $\omega$ -aminoácido, aminobutirato y fenilalanina-aminotransferasas, el subgrupo III comprende D-alanina y aminoácido de cadena ramificada-aminotransferasas, y el subgrupo IV comprende serina y fosfoserina-aminotransferasas (Perdeep K. MEHTA, et al., *Eur. J. Biochem.*, 214, 549-561, 1993).

50 Se sabe que en *Corynebacterium glutamicum*, existe un gen *argCJBDF* implicado en la biosíntesis de arginina en forma de un operón, y está regulado por inhibición por retroalimentación debida a arginina (Vehary Sakanyan, et al., *Microbiology*, 142:9-108, 1996). Por tanto, hay un límite en producir L-arginina con alto rendimiento.

### Descripción de la invención

#### Problema técnico

Por consiguiente, los autores de la presente invención se han esforzado en desarrollar estas cepas capaces de

producir L-arginina con alto rendimiento. Encontraron que un microorganismo transformado con un gen *argD2*, que es un supuesto gen que tiene la misma función que un gen *argD* que codifica acetilornitina-aminotransferasas, sobre-expresa el gen *argD2* y produce L-arginina con mayor rendimiento que una cepa parental, completando de este modo la presente invención.

## 5 Solución técnica

Es un objeto de la presente invención proporcionar un polipéptido codificado por un gen *argD2* (*Ncgl2355*) que es un supuesto gen de acetilornitina-aminotransferasa implicado en la biosíntesis de arginina por *Corynebacterium glutamicum*.

10 Es otro objeto de la presente invención proporcionar a vector recombinante que comprende a secuencia de bases que codifica el polipéptido.

Es otro objeto más de la presente invención proporcionar un transformante capaz de producir L-arginina con alto rendimiento, que se prepara introduciendo el vector recombinante.

15 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar un método para producir L-arginina cultivando el transformante. Sin embargo, en particular, la presente invención se refiere a un método de producir L-arginina según se reivindica más adelante. Las realizaciones preferidas de la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes.

## Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la construcción de un plásmido recombinante pHC131T-*argD2*, que comprende un gen *argD2*, el promotor *CJ1* y el terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>*.

## 20 Mejor modo de llevar a cabo la invención

En una realización la presente invención proporciona un polipéptido codificado por un gen *argD2* (*Ncgl2355*) que es un supuesto gen de acetilornitina-aminotransferasa implicado en la biosíntesis de arginina por *Corynebacterium glutamicum*. Preferiblemente la secuencia de aminoácidos del polipéptido puede estar representada por la SEQ ID NO. 1.

25 El gen *argD2* (*Ncgl2355*) que es un supuesto gen de la acetilornitina-aminotransferasa implicado en la biosíntesis de arginina por *Corynebacterium glutamicum* es una aminotransferasa clasificada en el subgrupo II de acuerdo con el análisis basado en el genoma (Alice C. McHardy, et al., *J. Biotechnology*, 104, 229-240, 2003). Sin embargo, la función de la proteína codificada por el gen *argD2* no ha sido claramente identificada. Hay poca homología de secuencia entre los genes *argD* y *argD2*, sin embargo, ambos genes tienen el mismo resto, subgrupo II de aminotransferasa. Por tanto se deduce, que proteína codificada por el gen *argD2* tiene una función similar a la acetilornitina-aminotransferasa que es codificada por el gen *argD* y requerida para la biosíntesis de arginina ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)).

Puede verse que la cepa que produce L-arginina transformada con un vector recombinante que comprende el gen *argD2* produce L-arginina con un rendimiento superior al de la cepa parental.

35 También se proporciona polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 1. Preferiblemente, la secuencia de bases del polinucleótido puede estar representada por la SEQ ID NO. 2. Además, se describe también un polinucleótido que tiene 70% o más de homología con la secuencia de bases de SEQ ID NO. 2, preferiblemente 90% o más de homología con la secuencia de bases de SEQ ID NO. 2.

40 También se describe un vector recombinante que comprende el polinucleótido. Preferiblemente, el vector recombinante puede comprender el polinucleótido representado por la SEQ ID NO. 2 puede ser un vector recombinante pHC131T-*argD2* preparado como se describe en la presente memoria.

El vector recombinante puede ser preparado fácilmente por los expertos en la técnica de acuerdo con cualquier método conocido usando la técnica del DNA recombinante. Por ejemplo, el DNA genómico se aísla de la cepa productora de L-arginina y se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (abreviadamente en lo sucesivo PCR, por sus iniciales en inglés) usando el DNA genómico como molde para amplificar la región del marco de lectura abierto (abreviadamente en lo sucesivo ORF por sus iniciales en inglés) del gen *argD2*. Para preparar un vector recombinante para la sobre-expresión, se amplifican el promotor *CJ1* (Patente coreana N° 10-0620092) y las regiones del terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>* usando pECCG117-CJ1 y *E. coli* K-12 como molde, respectivamente. El promotor *CJ1* que es conocido como la región situada en dirección 5' de *Corynebacterium ammoniagenes* Hsp60 y fuertemente expresada en *Corynebacterium glutamicum* y el terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>* comercialmente disponible se usan como promotor y terminador, respectivamente. A este respecto, la secuencia de bases del gen *argD2* se analiza por un método de secuenciación convencional. La región del promotor, la región del terminador y el gen *argD2* se clonan en un plásmido adecuado u otros vectores de clonación, y se transforman en células competentes adecuadas para preparar un vector recombinante (Fig. 1).

55 En la preparación del vector recombinante, cualquier vector expresado en células procariotas o eucariotas puede ser

usado como vector de clonación, y en una realización específica de la presente invención se usa un plásmido pECCG117 (Han J.K., et al., *Biotechnology Letters*, 13(10):721-726, 1991 o la Publicación de patente coreana N° 92-7401). Además, la cepa productora de L-arginina abarca todos los microorganismos capaces de producir L-arginina, incluyendo células procariotas o eucariotas, preferiblemente *Escherichia coli*, bacterias corineformes y especies de *Bacillus* capaces de producir L-arginina, y más preferiblemente *Corynebacterium glutamicum* capaz de producir L-arginina.

La presente invención proporciona un transformante capaz de producir L-arginina con alto rendimiento, que se prepara introduciendo el vector recombinante en un microorganismo hospedante productor de L-arginina para sobre-expresar el gen *argD2*.

Específicamente, el microorganismo hospedante tiene elevadas eficiencia de introducción del DNA y eficiencia de expresión, y puede ser cualquier microorganismo capaz de producir L-arginina, incluyendo células procariotas o eucariotas. Los Ejemplos preferidos de los mismos incluyen uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en las especies *Escherichia*, *Aerobacter*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Mucor*, *Torulopsis*, *Methylobacter*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Magnetospirillum* y *Corynebacterium*, más preferiblemente microorganismos que pertenecen al género *Corynebacterium*, que tienen resistencia a análogos de L-arginina y producen L-arginina, y más preferiblemente *Corynebacterium glutamicum* ATCC21493 o ATCC21831. Ejemplos de análogos de L-arginina incluyen el alfa-aminoácido canavanina, encontrado en *Canavalia ensiformis*, e hidroxamato de arginina.

En una realización específica de la presente invención, el vector recombinante pH131T-*argD2* se introduce en *Corynebacterium glutamicum* ATCC21493 y *Corynebacterium glutamicum* ATCC21831, que tienen resistencia a L-análogos de arginina y producen L-arginina, de modo que se preparan los microorganismos transformados CA06-0012 y CA06-0013. Los microorganismos transformados CA06-0012 y CA06-0013 se depositaron en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (Korean Culture Center de Microorganisms, abreviadamente en lo sucesivo "KCCM") el 13 de diciembre de 2006 con los números de acceso KCMM 10820P y KCMM 10821 P, respectivamente.

Los microorganismos transformados pueden ser preparados fácilmente por los expertos en la técnica de acuerdo con cualquier método conocido. El término "transformación" como se usa en la presente memoria significa introducir DNA en una célula hospedante de modo que el DNA sea replicable, bien sea como un elemento extracromosómico o por integración cromosómica, es decir, una alteración genética artificial introduciendo un DNA extraño en una célula hospedante. Ejemplos de dichos métodos incluyen una precipitación con  $\text{CaCl}_2$ , un método de Hanahan que es un método con  $\text{CaCl}_2$  mejorado usando DMSO (dimetilsulfóxido) como material reductor, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, fusión de protoplastos, agitación usando fibra de carburo de silicón, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por PEG, sulfato de dextrano y lipofectamina. En una realización de la presente invención, el vector recombinante pH131T-*argD2* se introdujo en células hospedantes por electroporación para preparar transformantes y se seleccionó una cepa que aloja el vector recombinante usando su resistencia a antibióticos.

Para aumentar la productividad de L-arginina del transformante preparado de acuerdo con la presente invención, el gen *argD2* presente en el cromosoma del transformante puede ser sometido adicionalmente a expresión o delección mediante una técnica recombinante usual. Se sabe en la técnica relacionada que su secuencia de bases puede ser analizada mediante un método de secuenciación usando fluorescencia.

En la vía biosintética de la L-arginina, la ornitina es un producto intermedio de la vía metabólica de la arginina y es un material importante en el metabolismo del nitrógeno junto con el ciclo de la urea. Las cepas CA06-0012 y CA06-0013 transformadas por el método de la presente invención son transformantes que sobre-expresan el gen *argD2*, preparados por el método siguiente. El gen *argD2* que codifica una supuesta proteína que tiene una función de acetilornitina-aminotransferasa, que se obtiene por PCR a partir del cromosoma de la cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC21831 productora de L-arginina se inserta en un vector y se introduce en las cepas productoras de L-arginina, *Corynebacterium glutamicum* ATCC21493 y ATCC21831. Se encontró que las cepas CA06-0012 y CA06-0013 transformadas de acuerdo con la presente invención sobre-expresan el gen *argD2* aumentando la síntesis de N-acetilornitina, activando con ello la ruta biosintética de la arginina para producir L-arginina con alto rendimiento.

Por consiguiente, en otra realización, la presente invención proporciona un método para producir L-arginina, que comprende las etapas de cultivar el transformante, preferiblemente el transformante representado por el número de acceso KCCM10820P o KCCM10821P.

En el método de producción de L-arginina de acuerdo con la presente invención, el cultivo de los microorganismos transformados que sobre-expresan L-arginina puede ser realizado en medios adecuados y en condiciones de cultivo conocidas en la técnica. Los métodos de cultivo pueden ser ajustados fácilmente por los expertos en la técnica de acuerdo con la cepa seleccionada. Ejemplos de de los métodos de cultivo incluyen, pero sin limitación, los modos de tipo por lotes, los de tipo continuo y los mixtos de alimentación continua-por lotes. En la bibliografía se describen diversos métodos de cultivo, por ejemplo, en "*Biochemical Engineering*" (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp 138-176, 1991).

5 Durante el cultivo, se pueden añadir adecuadamente hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico para ajustar el pH de los cultivos. Se pueden añadir adecuadamente agentes antiespumantes, tales como éster poliglicólico de ácidos grasos para reducir la formación de espumas en los cultivos. Además, para mantener los cultivos en estado aerobio, se les puede inyectar oxígeno gaseoso o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire). Los cultivos se mantienen a 20 a 45°C y preferiblemente a 25 a 40°C. El cultivo puede ser continuado hasta que se obtiene una cantidad deseada de L-arginina, y preferiblemente durante 10 a 160 horas. El aislamiento de L-arginina a partir del caldo de cultivo se puede realizar por un método usual conocido en la técnica. Ejemplos de dichos métodos de aislamiento incluyen centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio iónico y cristalización. Por ejemplo, los cultivos se pueden someter a una centrifugación a baja velocidad para separar la biomasa y el líquido sobrenadante puede ser separado por cromatografía de intercambio iónico.

### Modo para la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solamente con fines ilustrativos, y no se pretende que la invención sea limitada por estos Ejemplos.

### 15 Ejemplos

#### Ejemplo 1. Preparación de *argD2*, el promotor *CJ1* y el terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>*

20 Para construir un vector recombinante pHC131T que comprende un gen *argD2* que es un supuesto gen de la acetilornitina-aminotransferasa implicado en la biosíntesis de arginina por *Corynebacterium glutamicum*, el promotor *CJ1* que se expresa fuertemente en *Corynebacterium glutamicum*, y el terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>*, un fragmento de DNA (1,371 Kb) que incluyen el marco de lectura abierto (ORF) del gen *argD2* se obtuvo a partir del DNA genómico (gDNA) de la cepa productora de L-arginina ATCC21831, y la PCR se realizó usando pECCG117-CJ1 (Solicitud de patente coreana N° 10-2004-107215) y el genoma de *E. coli* K-12 W3110 como molde para obtener el promotor *CJ1* (0,3 kb) y el terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>* (0,4 Kb), respectivamente.

#### Ejemplo 1-1. Amplificación del fragmento de DNA incluyendo el ORF del gen *argD2*

25 El DNA genómico (gDNA) se extrajo de la cepa productora de L-arginina ATCC21831 usando un sistema *Genomic-tip* (QIAGEN, igual en lo sucesivo). Para amplificar el fragmento de DNA (1,371 Kb) que incluye el ORF del gen *argD2*, se usó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el gDNA como molde y a un dispositivo de ciclo térmico Peltier PTC-200 (MJ Research, USA, igual en lo sucesivo). En este momento, los cebadores usados en la amplificación de región ORF del gen *argD2* fueron como sigue: SEQ ID NO. 7; 5'-tccccgggggattggcatgaagggttac-3' y SEQ ID NO. 8; 5'-gctctagagcttagaacaacgccccagc-3'. Las condiciones de la PCR incluyeron 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, reasociación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0%, y luego se eluyó del gel una banda de 1,3 kb.

#### Ejemplo 1-2. Amplificación del promotor *CJ1*

35 Para amplificar el promotor *CJ1*, se realizó la PCR usando pECCG117-CJ1 (solicitud de patente coreana N° 10-2004-107215) como molde y un dispositivo de ciclo térmico Peltier PTC-200. En este momento los cebadores usados en la amplificación del promotor *CJ1* fueron como sigue: SEQ ID NO. 3; 5'-cgggtaccaccgcccgttattccattacat-3' y SEQ ID NO. 4; 5'-acgcgatcttaatctcctagattgggttc-3'. Las condiciones de la PCR incluyeron 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, reasociación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 68°C durante 30 segundos. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0%, y luego se eluyó del gel una banda de 0,3 kb.

#### Ejemplo 1-3. Amplificación del terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>*

45 El DNA genómico (gDNA) se extrajo de *E. coli* K-12 W3110 usando un sistema *Genomic-tip*. Para amplificar el terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>*, la PCR se realizó usando el gDNA como molde y un dispositivo de ciclo térmico Peltier PTC-200. En este momento, los cebadores usados en la amplificación del terminador *rrnB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>* fueron como sigue: SEQ ID NO. 5; 5'-gctctagagctgtttggcggatgaga-3' y SEQ ID NO. 6; 5'-ataagaatgcccgcgcaaaaaggccatccgctcag-3'. Las condiciones de la PCR son las mismas que en la amplificación del promotor *CJ1*. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,0%, y luego se eluyó del gel una banda de 411 pb.

#### Ejemplo 2. Construcción de un plásmido recombinante

##### Ejemplo 2-1. Construcción del plásmido recombinante pHC131T

Se trató un plásmido pECCG-117 (Han J.K., et al., *Biotechnology Letters*, 13(10):721-726, 1991 o Publicación de patente coreana N° 92-7401), que es un vector lanzadera de *E. coli/C. glutamicum*, con las enzimas de restricción, EcoRV y KpnI, y luego se sometió a electroforesis sobre un gel de agarosa al 0,8% para eluir una banda de aproximadamente 5,9 kb. Además, el promotor *CJ1* preparado en el Ejemplo 1-2 se trató con las enzimas de

restricción, KpnI y EcoRV, y luego se aisló usando un kit de purificación Quiaquick PCR (Qiagen, igual en lo sucesivo).

5 Dos fragmentos de DNA se ligaron usando el kit de ligación Quick (NEB, igual en lo sucesivo) para preparar un plásmido recombinante pECCG117-CJ1. El plásmido recombinante pECCG117-CJ1 se trató con las enzimas de restricción, XbaI y NotI, y luego se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% para eluir una banda de aproximadamente 6,2 Kb. El plásmido pECCG117-CJ1 preparado y el terminador *rrmB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>* preparado en el Ejemplo 1-3 se ligaron usando un kit de ligación Quick para obtener el plásmido recombinante pECCG117-CJ1-*rrmB<sub>1</sub>B<sub>2</sub>* (aproximadamente 6,6 Kb), que se denominó "pHC131T" en la presente invención.

10 El plásmido preparado pHC131T se trató con EcoRV y XbaI, y luego se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para eluir del gel una banda de aproximadamente 6,6 kb.

#### Ejemplo 2-2. Construcción de plásmido pHC131T-argD2

15 El producto de la PCR del gen *argD2* preparado en el Ejemplo 1-1 se trató con las enzimas de restricción, SmaI y XbaI, y luego se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% para eluir del gel una banda de aproximadamente 1,3 kb. El producto resultante se ligó con pHC131T preparado en el Ejemplo 2-1 usando un kit de ligación Quick, de modo que se construyó un plasmado recombinante de aproximadamente 7,4 Kb (Fig. 1), que se denominó "pHC131T-*argD2*" en la presente invención.

#### Ejemplo 3. Análisis de secuenciación del gen *argD2*

20 Para analizar la secuencia de bases de pHC131T-*argD2* preparado en el Ejemplo 2-2, se realizó la PCR usando 0,1 µg de DNA de pHC131T-*argD2* como molde con 2 mM de un par de cebadores de las SEQ ID NO. 3 y 6 y 1 µ de un *BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing v2.0 Ready Reaction (PE Biosystems)*. Las condiciones de la PCR incluyeron 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, reasociación a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 2 minutos, seguido por enfriamiento brusco a 4°C para terminar la reacción. El producto de la PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%, y luego se eluyó del gel un fragmento de DNA de 2 kb.

25 Este fragmento de DNA se sometió a análisis de secuenciación usando el cebador de SEQ ID NO. 3 en un analizador genético ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Una secuencia de aminoácidos codificada por el gen *argD2* de la presente invención y una secuencia de bases para la misma se muestran en las SEQ ID NO. 1 y 2, respectivamente.

#### Ejemplo 4. Preparación de transformantes

30 El plásmido recombinante pHC131T-*argD2* preparado en el Ejemplo 2-2 se introdujo en las cepas productoras de L-arginina, ATCC 21493 y ATCC 21831 por electroporación para preparar transformantes que sobre-expresan el gen *argD2*, que se denominaron CA06-0012 y CA06-0013, respectivamente. Los microorganismos transformados CA06-0012 y CA06-0013 se depositaron en el *Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)* el 13 de diciembre de 2006 con los números de acceso KCMM 10820P y KCMM 10821 P, respectivamente.

35 Las cepas y transformantes se extendieron sobre medios sólidos que contienen 25 mg/L de kanamicina (composición: 3,0 g/L de extracto de vacuno, 5,0 g/L de peptona), y se cultivó a 30°C durante 16 horas. Las colonias seleccionadas se sometieron a un ensayo de titulación en matraz como en el Ejemplo 5 siguiente. Como resultado, se encontró que el transformante que sobre-expresa el *argD2* de acuerdo con la presente invención produjo L-arginina con alto rendimiento.

#### Ejemplo 5. Comparación del título de la producción de arginina en matraz Erlenmeyer

40 Los transformantes preparados en el Ejemplo 4 y las cepas parentales, ATCC21831 y ATCC21493 se extendieron sobre medios sólidos que contenían 25 mg/L de kanamicina, y se cultivaron a 30°C durante 16 horas para seleccionar 10 colonias individuales de cada cepa. Las colonias seleccionadas se cultivaron en los medios de siembra de L-arginina indicados en la Tabla 1, y luego se evaluaron en cuanto a la productividad de L-arginina en un matraz Erlenmeyer usando los medios de titulación indicados en la Tabla 1. Se calcularon y compararon los valores medios de la productividad de L-arginina.

45

Tabla 1

Ingredientes	Medios de siembra de L-arginina	Medios de titulación de L-arginina
Glucosa	5%	4%
Bactopeptona	1%	-
Cloruro sódico (NaCl)	0,25%	-
Extracto de levadura	1%	-
Biotina	3 µg/L	200 µg/L
Urea	0,4%	0.3%
pH	7,0	7,2
Sulfato amónico ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	-	3%
Dihidrógeno-fosfato de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	-	0,1%
Hidrógeno-fosfato de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	-	0,1%
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	-	0,025%
Líquido de maceración de maíz (LCM)	-	2,0%

5 Las colonias seleccionadas se inocularon en los medios de siembra y se cultivaron en una incubadora a 30°C durante 16 horas. 1 ml de del cultivo de siembra se inoculó en 24 ml de los medios de títulos, y el cultivo se llevó a cabo a 30°C y 220 rpm durante 72 horas. Los resultados del ensayo de titulación de la producción de L-arginina para ATCC21831, ATCC21493 y los transformantes se indican en la Tabla 2.

10 Como se muestra en la Tabla 2, las cepas productoras de arginina *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21493 y ATCC 21831 exhibieron una productividad de L-arginina de 0,9 g/L y 4,4 g/ L, respectivamente. Mientras tanto las cepas recombinantes que sobre-expresan el gen *argD2*, CA06-0012 y CA06-0013 de la presente invención exhibieron una productividad de L-arginina de 1,1 g/L y 4,9 g/L, respectivamente. Puede verse que la productividad de las cepas recombinantes CA06-0012 y CA06-0013 fue aumentada en 0,2 g/L (22,2%) y 0,5 g/L (11,4%), en comparación con cada cepa parental.

Tabla 2

Productividad	Cepa			
	Cepa parental (ATCC21493)	Transformante (CA06-0012)	Cepa parental (ATCC21831)	Transformante (CA06-0013)
L-arginina (g/L)	0,9	1,1	4,4	4,9

15 Debe entenderse que los Ejemplos y los Ejemplos experimentales anteriores no son limitativos, sino ilustrativos en todos los aspectos.

#### Aplicabilidad industrial

20 La presente invención proporciona un polinucleótido que comprende un gen *argD2* (*Ncg12355*) que es un supuesto gen de la acetilornitina-aminotransferasa implicado en la biosíntesis de arginina por *Corynebacterium glutamicum*, un polipéptido codificado por el polinucleótido, un vector recombinante que comprende el polinucleótido, un transformante capaz de producir L-arginina con alto rendimiento que se prepara introduciendo el vector recombinante en un microorganismo hospedante productor de L-arginina para sobre-expresar el gen *argD2*, y un método para producir L-arginina cultivando el transformante. El transformante de la presente invención sobre-expresa el gen *argD2* para producir L-arginina con alto rendimiento, tras lo cual se usa en las industrias de  
25 medicamentos y farmacéutica y en la industria alimentaria.

<110> CJ cheiljedang Corporation

<120> Variedad de *Corynebacterium glutamicum* que produce L-arginina y método para fabricar la misma.

<130> OPA08001/PCT

<150> KR10-2007-0005831

5 <151> 2007-01-18

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 456

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de amino ácidos de ArgD2

<400> 1

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

Gln Pro Asp Met Ile Thr Phe Ala Lys Gly Val Asn Ala Gly Tyr Ala  
 290 295 300  
 Pro Leu Gly Gly Ile Val Met Thr Gln Ser Ile Arg Asp Thr Phe Gly  
 305 310 315 320  
 Ser Glu Ala Tyr Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Ser Gly His Pro Leu Ala  
 325 330 335  
 Val Ala Pro Ala Lys Ala Ala Leu Glu Ile Tyr Ala Glu Gly Glu Ile  
 340 345 350  
 Ile Pro Arg Val Ala Arg Leu Gly Ala Glu Leu Ile Glu Pro Arg Leu  
 355 360 365  
 Arg Glu Leu Ala Glu Glu Asn Val Ala Ile Ala Asp Val Arg Gly Ile  
 370 375 380  
 Gly Phe Phe Trp Ala Val Glu Phe Asn Ala Asp Ala Thr Ala Met Ala  
 385 390 395 400  
 Ala Gly Ala Ala Glu Phe Lys Glu Arg Gly Val Trp Pro Met Ile Ser  
 405 410 415  
 Gly Asn Arg Phe His Ile Ala Pro Pro Leu Thr Thr Thr Asp Asp Glu  
 420 425 430  
 Leu Val Ala Leu Leu Asp Ala Val Glu Ala Ala Ala Gln Ala Val Glu  
 435 440 445  
 Leu Thr Phe Ala Gly Ala Leu Phe  
 450 455

<210> 2  
 <211> 1371  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Secuencia de amino ácidos de ArgD2

<400> 2

ttgacactga agggttacac caactttgac ggtgaattca tcgaattcgg atctgcgcaa  
 60  
 gcaaaagaag aggaaaaacg ggcattcgac aacgatcgcg cgcacgtttt ccactcctgg  
 120  
 tccgcgcagg acaaaatcag ccccaaagta tgggcagctg ccgaaggttc cacgctgtac  
 180  
 gacttcgacg gcaacgcctt catcgacatg ggttccaac ttgtctcggc aaacttaggc  
 240  
 cacaacaacc ctcgattagt tgaggcgatc cagcgccaag cagcccgggt gaccaacatc  
 300  
 aaccgggctt tcggcaatga tgtgcgctct gatgttgctg caaagatcgt gtcgatggcc  
 360  
 cgtggcgaat tctcccacgt gtttttcacc aacggcggcg ccgacgccat cgaacactcc  
 420  
 atccgcatgg ctcgcctgca caccggacgc aacaaaattc tgtccgcata ccgacgctac  
 480  
 cacggcgcaa ccgatccgc gatgatgctc accggcgaac accgccgctt gggcaacccc  
 540  
 accaccgacc cagatatcta ccaattctgg gcaccattcc tgcaccactc ctattcttt  
 600  
 gccaccacc aagaagaaga atgcgaacgc gactcaagc acttgaaga tgtcatcgcg  
 660  
 tttgaaggty ctggcatgat cgcagcgatc gtcctggagc cagtggggg atcatcagga  
 720  
 atcatcctgc caccagcagg ttacttaaat ggcgtgcgcg aactttgcaa caagcacggc  
 780  
 atcctttca tcgccgacga agtcatggtc ggattcggac gcaccggaaa actgtttgc  
 840  
 tacgagcatg ctggcgacga tttccagcca gacatgatca ctttcgcaa gggtgtaac  
 900  
 gcaggttacg cccactcgg tggcatcgtg atgaccaat caatccgga taccttcgga  
 960  
 tcagaggcat actccggcgg actcacctac tccggacacc cacttgagc agcaccgcc  
 1020  
 aaggcagcgc tggagattta cgcggaagga gagatcattc cacgcgtagc tcgacttggc  
 1080  
 gctgaactga tcgaacctc cttcgtgaa ctacggaag aaaacgtagc gatcgctgac  
 1140  
 gtgcggggca tcggattctt ctgggcagtg gagttcaatg cagacgccac tgccatggct  
 1200  
 gccggtgctg cagaattcaa ggaacgcggc gtgtggccga tgatctccgg caaccgattc  
 1260  
 cacatcgcg cgccgctgac caccactgat gacgaattgg tagcactgct ggacgcggty  
 1320  
 gaagctgcag cccaagctgt cgagctgacc ttcgctgggg cgttgttcta a  
 1371

- <210> 3  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>  
 <223> Cebador hacia delante para PCR del promotor CJ1
- <400> 3  
 cgggtaccac cgcgggctta ttccattaca t  
 31
- 10 <210> 4  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>  
 <223> Cebador hacia atrás para PCR del promotor CJ1
- <400> 4  
 acgcgatatc ttaatctcct agattgggtt tc  
 32
- 20 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Cebador hacia delante para PCR del terminador rrnB1B2
- 25 <400> 5  
 gctctagagc tgtttggcg gatgaga
- 30 <210> 6  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Cebador hacia atrás para PCR del terminador rrnB1B2
- <400> 6  
 ataagaatgc ggccgccgca aaaaggccat ccgtcag  
 37
- 35 <210> 7  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>  
 <223> Cebador hacia delante para PCR de la ORF del gen argD2
- <400> 7  
 tccccgggg gattggcatg aagggttac  
 29

<210> 8  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Cebador hacia atrás para PCR de la ORF del gen argD2

<400> 8  
gctctagagc ttagaacaac gccccagc  
28

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir L-arginina, que comprende la etapa de cultivar un microorganismo que contiene un vector recombinante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido *argD2*, en donde el polipéptido *argD2* tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEQ ID NO. 1.
2. El método para producir L-arginina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polinucleótido consiste en la SEQ ID NO.2.
3. El método para producir L-arginina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo pertenece al género *Corynebacterium*.
4. El método para producir L-arginina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo se identifica por el número de acceso KCCM10820P o KCCM10821P.

[Fig. 1]

