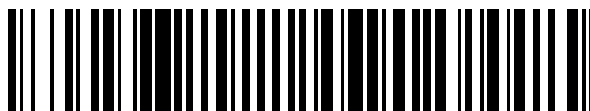


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 191**

51 Int. Cl.:

C12P 13/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 09015195 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 2196535**

54 Título: **Procedimiento para producir L- arginina utilizando una bacteria de la familia de las enterobacteriáceas, que presenta una expresión atenuada de un gen codificante de un transportador de la L- arginina**

30 Prioridad:

09.12.2008 RU 2008148283

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

29.04.2013

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, KYOBASHI 1-CHOME CHUO-KU
TOKYO, 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**KIRYUKHIN, MIKHAIL YURIEVICH;
ROSTOVA, YULIA GEORGIEVNA;
VOROSHILOVA, ELVIRA BORISOVNA y
GUSYATINER, MIKHAIL MARKOVICH**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 402 191 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

Procedimiento para producir L-arginina utilizando una bacteria de la familia de las enterobacteriáceas, que presenta una expresión atenuada de un gen codificante de un transportador de la L-arginina.

5

Antecedentes de la invención**Campo técnico**

La presente invención se refiere a la industria microbiológica, y específicamente a un procedimiento para producir L-arginina. El procedimiento utiliza una bacteria de la familia de las enterobacteriáceas, que ha sido modificado para atenuar la expresión de uno o varios genes codificantes de un transportador de la L-arginina.

Descripción de la técnica relacionada

Convencionalmente, los L-aminoácidos se han producido industrialmente mediante procedimientos de fermentación utilizando cepas de microorganismos de fuentes naturales, o mutantes de los mismos. Típicamente, los microorganismos se modifican para incrementar los rendimientos de producción de L-aminoácidos diana.

Se han publicado muchas técnicas para incrementar los rendimientos de producción de L-aminoácidos, incluyendo la transformación de microorganismos con ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.278.765). Entre otras técnicas para incrementar los rendimientos de producción se incluyen incrementar las actividades de enzimas que participan en la biosíntesis de los aminoácidos y/o desensibilizar los enzimas diana respecto a la inhibición por retroalimentación por el L-aminoácido producido (ver, por ejemplo, el documento WO 95/16042 o las patentes US nº 4.346.170, nº 5.661.012 y nº 6.040.160).

Otras maneras de incrementar los rendimientos de producción de L-aminoácidos son atenuar la expresión de uno o varios genes que participan en la degradación del L-aminoácido, genes que desvían los precursores del L-aminoácido diana de la ruta biosintética de L-aminoácidos, genes implicados en la redistribución de los flujos de carbono, nitrógeno y fosfato, y genes codificantes de toxinas, etc.

Un sistema de transporte dependiente de una proteína de unión en *Escherichia coli* específica para la L-arginina se caracterizó por medios genéticos y bioquímicos. El sistema está formado de cinco genes contiguos, *artPIQMJ* ("art" se refiere al transporte de arginina), que se organizan en dos unidades transcripcionales (*artPIQM* y *artJ*). Los productos de los genes *artI* y *artJ*, ArtI y ArtJ, son proteínas de unión periplasmáticas con similitud de secuencia con proteínas de unión para aminoácidos polares o básicos. Los productos de *artQ*, *artM* y *artP* son similares a las proteínas transmembranales conocidas y la ATPasa de los portadores dependientes de proteína de unión. Las proteínas ArtI y ArtJ maduras se localizan en el periplasma y no presentan un péptido de señal de 19 residuos aminoácidos. ArtI y ArtJ se aíslan de cepas sobreproductoras. ArtJ se une específicamente a L-arginina con elevada afinidad y la sobreproducción de ArtJ estimula la incorporación de L-arginina por parte de las bacterias. No se conoce cuál es el sustrato para ArtI y la proteína ArtI aislada no se une a los aminoácidos comunes, a diversos aminoácidos no comunes básicos ni a aminas. Se ha concluido que los genes *artPIQM artJ* codifican un tercer sistema de incorporación de la arginina, además del sistema conocido *argT hisJQMP* de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* y el portador arginina (-ornitina) (*aps*) de *E. coli* (Wissenbach U. *et al.*, Mol. Microbiol. 17(4):675-86, (1995).

Sin embargo, actualmente no existen publicaciones de atenuación de la expresión de un gen codificante de un transportador de la L-arginina para la producción de L-arginina.

El documento EP 1 829 965 A1 da a conocer una lista de genes, entre ellos el gen *artI*, que pueden deletionarse en mutantes de *E. coli* para producir sustancias útiles, entre ellas la L-arginina.

El documento WO 2007/013639 A1 da a conocer un procedimiento para producir L-arginina utilizando *Escherichia coli* en el que se ha atenuado el gen *cpxR*.

Sumario de la invención

La presente invención incluye incrementar la productividad de las cepas productoras de L-arginina y proporcionar un procedimiento para producir ácido L-arginina utilizando dichas cepas.

La presente invención proporciona lo siguiente:

[1] un procedimiento para producir L-arginina, que comprende:

- cultivar una bacteria productora de L-arginina de la familia de las enterobacteriáceas en un medio, y
- recoger L-arginina a partir del medio, en el que dicha bacteria ha sido modificada para atenuar la expresión

del gen *artI* mediante inactivación del gen *artI*.

[2] El procedimiento según [1], en el que dicho gen *artI* codifica una proteína que presenta una homología no inferior a 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos completa SEC ID nº 4.

[3] El procedimiento según [1], en el que dicha bacteria ha sido modificada para atenuar la expresión del complejo *artPIQM-artJ*.

[4] El procedimiento según [3], en el que se ha atenuado la expresión del complejo *artPIQM-artJ* mediante inactivación del complejo *artPIQM-artJ*.

[5] El procedimiento según cualquiera de [1] a [4], en el que dicha bacteria pertenece al género *Escherichia*.

[6] El procedimiento según cualquiera de [1] a [4], en el que dicha bacteria pertenece al género *Pantoea*.

[7] El procedimiento según [5], en el que dicha bacteria es *Escherichia coli*.

A continuación se describe en detalle la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra las posiciones relativas de las parejas de cebadores P1 y P2, y P5 y P6 en el plásmido pMW118-attL-Cm-attR.

La figura 2 muestra la construcción del fragmento de ADN cromosómico que comprende el gen *artI* inactivado o el complejo *artPIQM-artJ*.

Descripción detallada de las formas de realización ejemplificativas

1. Bacteria utilizada en la presente invención

La bacteria es una bacteria productora de L-arginina de la familia de las enterobacteriáceas, en la que la bacteria ha sido modificada para atenuar la expresión de uno o varios genes codificantes de un transportador de la L-arginina.

La expresión "bacteria productora de L-arginina" se refiere a una bacteria que es capaz de producir y secretar L-arginina al medio, durante el cultivo de la bacteria en el medio.

La expresión "bacteria productora de L-arginina" también puede referirse a una bacteria que es capaz de producir y provocar la acumulación de la L-arginina en un medio de cultivo en una cantidad superior a la de una cepa de tipo salvaje o parental de una bacteria de la familia de las enterobacteriáceas, por ejemplo *E. coli*, tal como *E. coli* K12, y preferentemente se refiere a que la bacteria es capaz de provocar la acumulación en el medio de una cantidad no inferior a 0,5 g/l, más preferentemente no inferior a 1,0 g/l, de L-arginina.

La familia de las enterobacteriáceas incluye bacterias pertenecientes a los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella* y *Yersinia*, etc. Específicamente, pueden utilizarse aquéllas clasificadas como enterobacteriáceas según la taxonomía utilizada en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>). Resulta preferida una bacteria que pertenezca al género *Escherichia* o *Pantoea*.

La expresión "una bacteria perteneciente al género *Escherichia*" se refiere a que la bacteria se clasifica en el género *Escherichia* según la clasificación conocida por el experto en el campo de la microbiología. Un ejemplo de una bacteria perteneciente al género *Escherichia* es, aunque sin limitarse a ella, *Escherichia coli* (*E. coli*).

La bacteria perteneciente al género *Escherichia* no se encuentra particularmente limitada; sin embargo, se encuentran comprendidas, por ejemplo, las bacterias indicadas por Neidhardt F.C. *et al.* (*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, Tabla 1).

La expresión "una bacteria perteneciente al género *Pantoea*" se refiere a que la bacteria se clasifica como del género *Pantoea* según la clasificación conocida por el experto en el campo de la microbiología. Algunas especies de *Enterobacter agglomerans* se han reclasificado recientemente como *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Panttoea stewartii* o similar basándose en el análisis de la secuencia de nucleótidos del ARNr 16S, etc.

La expresión "bacteria que ha sido modificada para atenuar la expresión de uno o varios genes codificantes de un transportador de la L-arginina" puede referirse a que la bacteria ha sido modificada de manera que la bacteria modificada contenga una cantidad reducida de transportador de la L-arginina o cualquier subunidad del mismo en

comparación con una bacteria no modificada, o también puede referirse a que la bacteria es incapaz de sintetizar el transportador de la L-arginina o cualquier subunidad del mismo.

5 El sistema transportador de la L-arginina está formado de los productos de cinco genes contiguos, *artPIQMJ*, que se organizan en dos subunidades transcripcionales, *artPIQM* y *artJ*. Los productos de los genes *artI* y *artJ*, ArtI y ArtJ, son proteínas de unión periplasmáticas con secuencias similares a las proteínas de unión a aminoácidos polares o básicos. Los productos de *artQ*, *artM* y *artP* son similares a las proteínas transmembranales y a la ATPasa de los portadores dependientes de proteína de unión.

10 La expresión "inactivación de un gen" se refiere a que el gen modificado codifica una proteína completamente no funcional. También resulta posible que la región de ADN modificado sea incapaz de expresar naturalmente el gen debido a la delección de una parte del gen o del gen completo, a un desplazamiento del marco de lectura del gen, a la introducción de unas o más mutaciones de falta de sentido/sin sentido, o a la modificación de una región contigua del gen, incluyendo las secuencias que controlan la expresión génica tales como promotores, intensificadores, atenuadores, sitios de unión ribosómica, etc.

15 La presencia o ausencia de un gen en el cromosoma de una bacteria puede detectarse mediante procedimientos bien conocidos, incluyendo la PCR, la transferencia southern y similares. Además, el nivel de expresión génica puede estimarse mediante la medición de la cantidad de ARNm transcrita, a partir del gen utilizando diversos procedimientos bien conocidos, entre ellos la transferencia northern, la RT-PCR cuantitativa y similares. La cantidad de proteína codificada por el gen puede medirse mediante procedimientos bien conocidos, incluyendo la SDS-PAGE seguido de un ensayo de inmunotransferencia (análisis de transferencia western) y similares.

20 El gen *artP* (sinónimos: *ECK0855*, *b0864*) codifica la subunidad de la proteína ArtP del transportador ABC de la arginina (sinónimo B0864) situado en el citoplasma. El gen *artP* (nucleótidos complementarios a los nucleótidos 902.229 a 902.957 en el GenBank número de acceso NC_000913.2; gi:49175990, SEC ID nº 1) se encuentra situado entre los genes *ybjP* y *artI* en el cromosoma de la cepa *E. coli* K-12. La secuencia de nucleótidos del gen *artP* y la secuencia de aminoácidos de la proteína ArtP codificada por el gen *artP*, se muestran en SEC ID nº 1 y SEC ID nº 2, respectivamente.

30 El gen *artI* (sinónimos: *ECK0854*, *b0863*) codifica la subunidad de la proteína ArtI del transportador ABC de la arginina (sinónimo: B0863) situado en el espacio periplasmático. El gen *artI* (nucleótidos complementarios a los nucleótidos 901.480 a 902.211 en GenBank número de acceso NC_000913.2; gi:49175990, SEC ID nº 3) se encuentra situado entre los genes *artQ* y *artP* en el cromosoma de la cepa *E. coli* K-12. La secuencia de nucleótidos del gen *artI* y la secuencia de aminoácidos de la proteína ArtI codificada por el gen *artI*, se muestra en SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4, respectivamente.

35 El gen *artQ* (sinónimos: *ECK0853*, *b0862*) codifica la subunidad de la proteína ArtQ del transportador ABC de la arginina (sinónimo: B0862) situado en la membrana interna. El gen *artQ* (nucleótidos complementarios a los nucleótidos 900.757 a 901.473 en GenBank número de acceso NC_000913.2; gi:49175990, SEC ID nº 5) se encuentra situado entre los genes *artI* y *artM* en el cromosoma de la cepa *E. coli* K-12. La secuencia de nucleótidos del gen *artQ*, y la secuencia de aminoácidos de la proteína ArtQ codificada por el gen *artI*, se muestran en SEC ID nº 5 y SEC ID nº 6, respectivamente.

40 El gen *artM* (sinónimos: *ECK0852*, *b0861*) codifica la subunidad de la proteína ArtM del transportador ABC de la arginina (sinónimo: B0861) situado en la membrana interna. El gen *artI* (nucleótidos complementarios a los nucleótidos 900.089 a 900.757 en GenBank número de acceso NC_000913.2; gi:49175990, SEC ID nº 7) se encuentra situado entre los genes *artQ* y *artJ* en el cromosoma de la cepa *E. coli* K-12. La secuencia de nucleótidos del gen *artM* y la secuencia de aminoácidos de la proteína ArtM codificada por el gen *artM* se muestra en SEC ID nº 7 y en SEC ID nº 8, respectivamente.

45 El gen *artJ* (sinónimos: *ECK0851*, *b0860*) codifica la subunidad de la proteína ArtJ del transportador ABC de la arginina (sinónimo: B0860) situado en el espacio periplasmático. El gen *artJ* (nucleótidos complementarios a los nucleótidos 899.067 a 899.798 en GenBank número de acceso NC_000913.2; gi:49175990, SEC ID nº 9) se encuentra situado entre los genes *artM* y *rlmC* en el cromosoma de la cepa *E. coli* K-12. La secuencia de nucleótidos del gen *artJ* y la secuencia de aminoácidos de la proteína ArtJ codificada por el gen *artJ*, se muestran en SEC ID nº 9 y en SEC ID nº 10, respectivamente.

50 Debido a que existen algunas diferencias en las secuencias de ADN de diferentes géneros o cepas de la familia de las enterobacteriáceas, el gen que debe inactivarse en el cromosoma no se encuentra limitado a los genes mostrados en SEC ID nº 1, nº 3, nº 5, nº 7 o nº 9, sino que puede incluir genes homólogos a SEC ID nº 1, nº 3, nº 5, nº 7 y nº 9, que codifican una proteína variante de la proteína correspondiente. La expresión "proteína variante" se refiere a una proteína que presenta cambios en la secuencia, sean delecciones, inserciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos, pero que sigue manteniendo la actividad del producto como proteína.

55 El número de cambios en la proteína variante depende de la posición en la estructura tridimensional de la proteína o

del tipo de residuos aminoácidos. Puede ser de 1 a 30, preferentemente de 1 a 15, y más preferentemente de 1 a 5. Estos cambios en las variantes son mutaciones conservadoras, que conservan la función de la proteína. En otras palabras, estos cambios en las variantes pueden producirse en regiones de la proteína que no resultan críticas para la función de la proteína. Esto se debe a que algunos aminoácidos presentan una elevada homología unos respecto a otros, de manera que la estructura tridimensional o la actividad no resulta afectada por dicho cambio. Una mutación conservadora es una mutación en la que la sustitución tiene lugar mutuamente entre Phe, Trp y Tyr, en el caso de que el sitio de sustitución sea un aminoácido aromático; entre Leu, Ile y Val en el caso de que el sitio de sustitución sea un aminoácido hidrofóbico; entre Gln y Asn en el caso de que sea un aminoácido polar; entre Lys, Arg y His en el caso de que sea un aminoácido básico; entre Asp y Glu en el caso de que sea un aminoácido ácido, y entre Ser y Thr en el caso de que sea un aminoácido que presente un grupo hidroxilo. Las mutaciones conservadoras típicas son sustituciones conservadoras. Entre los ejemplos de sustituciones conservadoras se incluyen la sustitución de Ser o Thr por Ala, la sustitución de Gln, His o Lys por Arg, la sustitución de Glu, Gln, Lys, His o Asp por Asn, la sustitución de Asn, Glu o Gln por Asp, la sustitución de Ser o Ala por Cys, la sustitución de Asn, Glu, Lys, His, Asp o Arg por Gln, la sustitución de Asn, Gln, Lys o Asp por Pro por Gly, la sustitución de Asn, Lys, Gln, Arg o Tyr por His, la sustitución de Leu, Met, Val o Phe por Ile, la sustitución de Ile, Met, Val o Phe por Leu, la sustitución de Asn, Glu, Gln, His o Arg por Lys, la sustitución de Ile, Leu, Val o Phe por Met, la sustitución de Trp, Tyr, Met, Ile o Leu por Phe, la sustitución de Thr o Ala por Ser, la sustitución de Ser o Ala por Thr, la sustitución de Phe o Tyr por Trp, la sustitución de His, Phe o Trp por Tyr, y la sustitución de Met, Ile o Leu por Val. Las sustituciones, deleciones, inserciones, adiciones o inversiones y similares de los aminoácidos indicados anteriormente incluyen las mutaciones naturales (mutantes o variantes), dependiendo de diferencias en las especies, o de diferencias individuales entre los microorganismos que conservan el gen *artI*. Dicho gen puede obtenerse mediante modificación de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID nº 1, utilizando, por ejemplo, la mutagénesis sitio-dirigida de manera que el residuo aminoácido específico de sitio en la proteína codificada incluya sustituciones, deleciones, inserciones o adiciones. La proteína variante codificada por el gen puede presentar una homología no inferior a 80%, preferentemente no inferior a 90%, y más preferentemente no inferior a 95%, con respecto a la secuencia de aminoácidos completa mostrada en SEC ID nº 2, nº 4, nº 6, nº 8 o nº 10, con la condición de que la proteína previamente a la inactivación sea capaz de funcionar como transportador ABC de la arginina al acomplejarse con el resto de las 4 subunidades de las 5 proteínas de tipo salvaje que componen el transportador de la L-arginina.

La homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando procedimientos bien conocidos, por ejemplo el programa informático BLAST 2.0, que calcula tres parámetros: puntuación, identidad y similitud.

Además, cualquiera de los genes *artP*, *artI*, *artQ*, *artM* o *artJ* puede ser una variante que se hibride con la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia mostrada en SEC ID nº 1, nº 3, nº 5, nº 7 o nº 9, respectivamente, o una sonda que puede prepararse a partir de la secuencia de nucleótidos, bajo condiciones restrictivas, con la condición de que codifique una proteína funcional previamente a la inactivación. La expresión "condiciones restrictivas" incluye aquéllas bajo las que se forma un híbrido específico, por ejemplo un híbrido que presente una homología no inferior a 60%, preferentemente no inferior a 70%, más preferentemente no inferior a 80%, todavía más preferentemente no inferior a 90%, y todavía más preferentemente no inferior a 95%, y bajo las que un híbrido no específico, por ejemplo un híbrido que presenta una homología inferior a la anteriormente indicada, no se forma. Por ejemplo, las condiciones restrictivas se ejemplifican mediante el lavado una vez, preferentemente dos o tres veces a una concentración salina correspondiente a 1x SSC, SDS al 0,1%, preferentemente 0,1x SSC, SDS al 0,1%, a 60°C. La duración del lavado depende del tipo de membrana utilizado para la transferencia y, a modo de regla general, puede ser la recomendada por el fabricante. Por ejemplo, la duración recomendada del lavado para la membrana de nilón Hybond™ N+ (Amersham) bajo condiciones restrictivas es de 15 minutos. Preferentemente el lavado puede llevarse a cabo 2 a 3 veces. La longitud de la sonda puede seleccionarse convenientemente dependiendo de las condiciones de hibridación y habitualmente es de entre 100 pb y 1 kpb.

La expresión de un gen puede atenuarse mediante la introducción de una mutación en el gen en el cromosoma de manera que la actividad intracelular de la proteína codificada por el gen se reduzca en comparación con una cepa no modificada. Entre las mutaciones que resultan en la atenuación de la expresión del gen se incluyen la sustitución de una base o más para provocar una sustitución de un aminoácido en la proteína codificada por el gen (mutación de sentido incorrecto), la introducción de un codón de parada (mutación sin sentido), la deleción o la inserción de una o dos bases para provocar un desplazamiento de marco, la inserción de un gen de resistencia a fármaco o la deleción de una parte del gen o el gen entero (Qiu Z. y Goodman M.F., J. Biol. Chem. 272:8611-8617, (1997); Kwon D.H. *et al.*, J. Antimicrob. Chemother. 46:793-796, (2000)). La expresión del gen *artI* también puede atenuarse mediante la modificación de una secuencia reguladora de la expresión, tal como el promotor, la secuencia de Shine-Dalgarno (SD), etc. (documento WO 95/34672; Carrier T.A. y Keasling J.D., Biotechnol. Prog. 15:58-64, (1999)).

Por ejemplo, pueden utilizarse los procedimientos siguientes para introducir una mutación mediante recombinación génica. Se prepara un gen mutante codificante de una proteína mutante con actividad reducida, y la bacteria que debe modificarse se transforma con un fragmento de ADN que contiene el gen mutante. A continuación, el gen nativo presente en el cromosoma se sustituye por el gen mutante mediante recombinación homóloga, y la cepa resultante se selecciona. La sustitución génica utilizando la recombinación homóloga puede llevarse a cabo mediante la utilización de un ADN lineal, lo que se conoce como "integración controlada por Red" (Datsenko K.A. y

Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):6640-6645, 2000) o mediante la utilización de un plásmido que contiene un origen de replicación sensible a la temperatura (patente US nº 6.303.383 o documento JP nº 05-007491A). Además, también puede incorporarse una mutación específica de sitio mediante sustitución génica utilizando la recombinación homóloga, tal como se ha indicado anteriormente, utilizando un plásmido que se incapaz de replicarse en el huésped.

La expresión del gen también puede atenuarse mediante inserción de un trasposón o un factor IS en la región codificante del gen (patente US nº 5.175.107) o mediante procedimientos convencionales, tales como la mutagénesis por irradiación con luz UV o con nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina).

El gen también puede inactivarse mediante procedimientos convencionales, tales como la mutagénesis utilizando la irradiación con luz UV o la nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina), la mutagénesis sitio-dirigida, la interrupción génica mediante recombinación homóloga y/o la mutagénesis por inserción-delección (Yu D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):5978-83, 2000, y Datsenko K.A. y Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):6640-45, 2000), también denominada "integración conducida por Red".

Los procedimientos para la preparación del ADN plasmídico, la digestión y la ligación del ADN, la transformación, la selección de oligonucleótidos como cebadores, y similares, pueden ser procedimientos ordinarios bien conocidos por el experto en la materia. Estos procedimientos se describen en, por ejemplo, Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Bacterias productoras de L-arginina

Pueden utilizarse bacterias que se modifican para atenuar la expresión de uno o varios genes codificantes de un transportador de la L-arginina y que son capaces de producir L-arginina.

La bacteria puede obtenerse mediante inactivación de uno o varios genes codificantes de un transportador de L-arginina en una bacteria que presenta una capacidad nativa o inherente de producir L-arginina. Alternativamente, la bacteria puede obtenerse proporcionando la capacidad de producir L-arginina a una bacteria que ya presenta uno o varios genes inactivados codificantes de un transportador de L-arginina.

Entre los ejemplos de cepas parentales que pueden utilizarse para derivar bacterias productoras de L-arginina se incluyen, aunque sin limitación, cepas pertenecientes al género *Escherichia*, tales como la cepa *E. coli* 237 (VKPM B-7925) (solicitud de patente US nº 2002/058315 A1) y sus cepas derivadas que portan N-acetilglutamato sintasa mutante (solicitud de patente rusa nº 2001/112869), la cepa *E. coli* 383 (VKPM B-7926) (documento EP 1 170 358 A1), una cepa productora de arginina en la que se ha introducido el gen *argA* codificante de la N-acetilglutamato sintetasa (documento EP 1 170 361 A1) y similares.

Entre los ejemplos de cepas parentales que pueden utilizarse para derivar bacterias productoras de L-arginina también se incluyen cepas en las que se ha incrementado la expresión de uno o más genes codificantes de enzimas biosintéticos de la L-arginina. Entre los ejemplos de dichos genes se incluyen los genes codificantes de la N-acetilglutamato fosfato reductasa (*argC*), de la ornitina acetiltransferasa (*argJ*), de la N-acetilglutamato quinasa (*argB*), de la acetilornitina transaminasa (*argD*), de la ornitina carbamoil transferasa (*argF*), de la ácido argininosuccínico sintetasa (*argG*), de la ácido argininosuccínico liasa (*argH*) y de la carbamoilfosfato sintetasa (*carAB*). Las abreviaturas entre paréntesis después de los nombres de los enzimas representan los nombres de los genes.

2. Procedimiento de la presente invención

El procedimiento de la presente invención incluye producir L-arginina mediante el cultivo de la bacteria descrita en la presente memoria en un medio de cultivo para producir y secretar L-arginina al medio, y recoger la L-arginina del medio.

El cultivo, la recolección y la purificación de la L-arginina a partir del medio y similares pueden llevarse a cabo mediante procedimientos de fermentación convencionales, en los que se produce un aminoácido utilizando una bacteria.

El medio utilizado para el cultivo puede ser un medio sintético o natural, con la condición de que el medio incluya una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno y minerales y, en caso necesario, cantidades apropiadas de nutrientes que la bacteria requiere para el crecimiento. La fuente de carbono puede incluir diversos carbohidratos, tales como la glucosa y la sacarosa, y diversos ácidos orgánicos. Dependiendo del modo de asimilación del microorganismo seleccionado, puede utilizarse alcohol, incluyendo etanol y glicerol. A modo de fuente de nitrógeno, pueden utilizarse diversas sales amónicas tales como amonio y sulfato amónico, otros compuestos del nitrógeno tales como las aminas, una fuente natural de nitrógeno tal como peptona, hidrolizado de soja y microorganismos fermentadores digeridos. A modo de minerales puede utilizarse monofosfato potásico, sulfato de magnesio, cloruro sódico, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, cloruro de calcio y similares. A modo de vitaminas puede utilizarse

tiamina, extracto de levadura y similares.

El cultivo preferentemente se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas, tales como un cultivo bajo agitación, y un cultivo bajo agitación con aireación, a una temperatura de entre 20°C y 40°C, preferentemente entre 30°C y 38°C. El pH del cultivo habitualmente es de entre 5 y 9, preferentemente de entre 6,5 y 7,2. El pH del cultivo puede ajustarse con amonio, carbonato de calcio, diversos ácidos, diversas bases y tampones. Habitualmente un cultivo de 1 a 5 días conduce a la acumulación de L-arginina en el medio líquido.

Tras el cultivo, pueden retirarse los sólidos, tales como las células, del medio líquido mediante centrifugación o filtración a través de membrana, y después puede recogerse la L-arginina y purificarse mediante procedimientos de intercambio iónico, concentración y/o cristalización.

Ejemplos

La presente invención se explicará con mayor detalle a continuación, haciendo referencia a los ejemplos siguientes.

Ejemplo 1. Construcción de una cepa con un gen *artI* inactivado

1. Delección del gen *artI*

El gen *artI* en una cepa bacteriana puede delecionarse mediante el procedimiento desarrollado inicialmente por Datsenko K.A. y Wanner B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):6640-6645, 2000) denominado "integración conducida por Red". Según este procedimiento, se construyeron los cebadores de PCR P1 (SEC ID nº 11) y P2 (SEC ID nº 12), los cuales son homólogos tanto de la región contigua al gen *artI* como del gen que proporciona resistencia a antibiótico en el plásmido molde. Se utilizó el plásmido pMW118-attL-Cm-attR (documento WO 05/010175) como molde en la reacción de PCR. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial del ADN durante 5 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, apareamiento a 54°C durante 30 segundos, alargamiento a 72°C durante 40 segundos y el alargamiento final durante 5 minutos a +72°C.

El producto de PCR de 1,7 kb (figura 1) se purificó a partir de un gel de agarosa y se utilizó para la electroporación de la cepa *E. coli* MG1655 (ATCC nº 700926), que contiene el plásmido pKD46. El plásmido pKD46 (Datsenko K.A. y Wanner B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(12):6640-45, 2000) contiene un origen de replicación sensible a la temperatura e incluye un fragmento de ADN de 2.154 nucleótidos del fago (posiciones de nucleótidos 31.088 a 33.241, GenBank nº de acceso J02459), así como los genes del sistema de recombinación homóloga *Red* de (genes γ , β y *exo*), los cuales se encuentran bajo el control del promotor P_{araB} inducible con arabinosa. El plásmido pKD46 resulta necesario para la integración del producto de PCR en el cromosoma de la cepa MG1655. La cepa MG1655 puede obtenerse de la American Type Culture Collection (P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, U.S.A.).

Se prepararon células electrocompetentes del modo siguiente: se cultivaron durante la noche a 30°C en medio LB que contenía ampicilina (100 mg/l) células de *E. coli* MG1655/pKD46 y el cultivo se diluyó 100 veces con 5 ml de medio SOB (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) que contenía ampicilina y L-arabinosa (1 mM). Las células se cultivaron bajo aireación a 30°C hasta una DO_{600} de $\approx 0,6$ y después se convirtieron en electrocompetentes mediante la concentración 100 veces y el lavado tres veces con H₂O desionizada helada. La electroporación se llevó a cabo utilizando 70 μ l de células y ≈ 100 ng del producto de PCR. Tras la electroporación las células se incubaron con 1 ml de medio SOC (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) a 37°C durante 2,5 horas y después se sembraron en placas sobre L-agar que contenía cloranfenicol (30 μ g/ml) y se cultivaron a 37°C para seleccionar los recombinante Cm^R. A continuación, para eliminar el plásmido pKD46, se llevaron a cabo dos pases sobre L-agar con Cm a 42°C y las colonias se sometieron a ensayo para la sensibilidad a la ampicilina.

2. Verificación de la delección del gen *artI* mediante PCR

Los mutantes en los que se había delecionado el gen *artI* y que se marcaron con el gen de resistencia Cm se verificaron mediante PCR utilizando los cebadores específicos de locus P3 (SEC ID nº 13) y P4 (SEC ID nº 14). Con este fin, una colonia recién aislada se suspendió en 20 μ l de agua y después se utilizó 1 μ l de suspensión para la PCR. El perfil de temperatura fue el siguiente: desnaturalización inicial del ADN durante 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, apareamiento a 55°C durante 30 segundos y alargamiento a 72°C durante 1 minuto, y alargamiento final durante 5 minutos a 72°C. El producto de PCR obtenido en la reacción de PCR utilizando las células de la cepa *artI*⁺ parental MG1655 como molde presentaba una longitud de 803 pb. El producto de PCR obtenido en la reacción de PCR utilizando las células de la cepa mutante MG1655 $\Delta artI::cat$ como molde presentaba una longitud de 1.453 nucleótidos (figura 2). La cepa mutante se denominó MG1655 $\Delta artI$.

Ejemplo 2: construcción de una cepa con un complejo *artPIQM-artJ* inactivado1. Delección del complejo *artPIQM-artJ*

5 Se delecionó el complejo *artPIQM-artJ* en una cepa bacteriana mediante integración conducida por Red. Siguiendo este procedimiento, se construyeron los cebadores de PCR P5 (SEC ID nº 15) y P6 (SEC ID nº 16), los cuales son homólogos a tanto la región contigua al complejo *artPIQM-artJ* como al gen que proporciona resistencia a antibiótico en el plásmido molde. Se utilizó el plásmido pMW118-attL-Cm-attR (documento WO 05/010175) como el molde en la reacción de PCR. Las condiciones para la PCR fueron las indicadas anteriormente.

10 Se purificó el producto de PCR de 1,7 kb (figura 1) a partir de un gel de agarosa y se utilizó para la electroporación de la cepa *E. coli* MG1655 (ATCC nº 700926), que contiene el plásmido pKD46.

15 Se prepararon células electrocompetentes tal como se ha descrito anteriormente. La electroporación se llevó a cabo utilizando 70 µl de células y ≈ 100 ng del producto de PCR. Después de la electroporación las células se incubaron con 1 ml de medio SOC a 37°C durante 2,5 horas y seguidamente se sembraron en placas sobre L-agar que contenía cloranfenicol (30 µg/ml) y se cultivaron a 37°C para seleccionar los recombinantes Cm^R. A continuación, para eliminar el plásmido pKD46, se llevaron a cabo dos pases son L-agar con Cm a 42°C y las colonias se sometieron a ensayo para la sensibilidad a la ampicilina.

2. Verificación de la delección del complejo *artPIQM-artJ* mediante PCR

25 Los mutantes en los que se había delecionado el complejo *artPIQM-artJ* y que se encontraban marcados con el gen de resistencia Cm, se verificaron mediante PCR utilizando los cebadores específicos de locus P7 (SEC ID nº 17) y P8 (SEC ID nº 18) tal como se ha indicado anteriormente. El producto de PCR obtenido en la reacción de PCR utilizando las células de la cepa mutante MG1655Δ*artPIQM-artJ*::cat como el molde presentaba una longitud de 1,5 kb (figura 2). La cepa mutante se denominó MG1655Δ*artPIQM-artJ*.

Ejemplo 3. Producción de L-arginina por parte de *E. coli* 382Δ*artI* y *E. coli* 382Δ*artPIMQ-artJ*

30 Para someter a ensayo el efecto de la inactivación del gen *artI* o del complejo *artPIMQ-artJ* sobre la producción de la L-arginina, se transfirieron fragmentos de ADN del cromosoma de los anteriormente indicados *E. coli* MG1655Δ*artI* y *E. coli* MG1655Δ*artPIMQ-artJ* a la cepa productora de -arginina *E. coli* 382 mediante transducción de P1 (Miller J.H., Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY, (1972)) con el fin de obtener las cepas de *E. coli* 382Δ*artI* y 382Δ*artPIMQ-artJ*, respectivamente. La cepa 382 ha sido depositada en la colección nacional rusa de microorganismos industriales (VKPM) (Rusia, 117545 Moscú, 1 Dorozhny proezd, 1) el 10 de abril de 2000 bajo el número de acceso VKPM B-7926 y después convertida en un depósito bajo el Tratado de Budapest el 18 de mayo de 2001.

40 Las cepas de *E. coli* 382, 382Δ*artI* y 382Δ*artPIMQ-artJ* se cultivaron separadamente bajo agitación a 37°C durante 18 horas en 3 ml de caldo nutritivo y se inocularon 0,3 ml de los cultivos en 2 ml de un medio de fermentación en tubos de ensayo de 20x200 mm y se cultivaron a 32°C durante 48 horas en un agitador rotatorio.

45 Tras el cultivo, la cantidad de L-arginina que se había acumulado en el medio se determinó mediante cromatografía de papel utilizando la fase móvil siguiente: butanol:ácido acético:agua=4:1:1 (v/v). Se utilizó una solución de ninhidrina (al 2%) en acetona como agente de visualización. Se recortó un punto que contenía L-arginina, se eluyó la L-arginina con solución acuosa al 0,5% de CdCl₂ y se estimó espectrofotométricamente a 540 nm la cantidad de L-arginina.

50 La composición del medio de fermentación (g/l) era la siguiente:

Glucosa	48,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	35,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
HCl de tiamina	0,0002
Extracto de levadura	1,0
L-isoleucina	0,1
CaCO ₃	5,0

Se esterilizaron la glucosa y el sulfato de magnesio separadamente. El CaCO₃ se esterilizó con calor seco a 180°C durante 2 horas. El pH se ajustó a 7,0.

55 Los resultados de las fermentaciones en tubos de ensayo se muestran en la Tabla 1. Tal como puede observarse en la Tabla 1, las cepas con gen *artI* o complejo *artPIMQ-artJ* inactivado causaron un nivel de acumulación más alto de L-arginina que la cepa parental productora de L-arginina *E. coli* 382.

Tabla 1

Cepa	Cantidad de L-arginina (g/l)
382	12,0 ± 0,1
382ΔartI	14,3 ± 0,1
382ΔartPIMQ-artJ	13,4 ± 0,1

5 **Listado de secuencias**

<110> Ajinomoto Co., Inc.

10 <120> PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR L-ARGININA UTILIZANDO UNA BACTERIA DE LA FAMILIA DE LAS ENTEROBACTERIÁCEAS, QUE PRESENTA UNA EXPRESIÓN ATENUADA DE GENES CODIFICANTES DE UN TRANSPORTADOR DE LA L-ARGININA

<130> EPA-64841

15 <160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 729

20 <212> ADN

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> CDS

25 <222> (1) .. (729)

<400> 1

```

atg agt att caa tta aac ggc att aat tgc ttc tac ggc gcg cat cag      48
Met Ser Ile Gln Leu Asn Gly Ile Asn Cys Phe Tyr Gly Ala His Gln
1 5 10 15
gcg ctg ttc gat atc acg ctg gat tgc cca cag ggc gaa acg ctg gtg      96
Ala Leu Phe Asp Ile Thr Leu Asp Cys Pro Gln Gly Glu Thr Leu Val
20 25 30
tta ctt ggc ccc agc ggc gcg ggt aaa agc tcg ctg ctg cgt gta ctc      144
Leu Leu Gly Pro Ser Gly Ala Gly Lys Ser Ser Leu Arg Val Leu
35 40 45
aat ctg ctt gag atg ccg cgc tcc ggt acg ctc aac att gca ggc aac      192
Asn Leu Leu Glu Met Pro Arg Ser Gly Thr Leu Asn Ile Ala Gly Asn
50 55 60
cat ttc gat ttc acc aaa aca ccc tct gac aaa gcg att cgc gat ttg      240
His Phe Asp Phe Thr Lys Thr Pro Ser Asp Lys Ala Ile Arg Asp Leu
65 70 75 80
cgt cgt aac gtt ggc atg gtg ttt cag caa tac aac ctg tgg ccg cat      288
Arg Arg Asn Val Gly Met Val Phe Gln Gln Tyr Asn Leu Trp Pro His
85 90 95
ctg acc gtg cag caa aac ctg att gaa gcg ccc tgc cgt gta ctg ggg      336
Leu Thr Val Gln Gln Asn Leu Ile Glu Ala Pro Cys Arg Val Leu Gly
100 105 110
ttg agt aaa gat cag gcg ctg gcc cgt gca gaa aaa ctg ctg gaa cgt      384
Leu Ser Lys Asp Gln Ala Leu Ala Arg Ala Glu Lys Leu Leu Glu Arg
115 120 125
ctg cgt ctc aaa cct tat agc gat cgt tac ccg ctg cat ctt tct ggt      432
Leu Arg Leu Lys Pro Tyr Ser Asp Arg Tyr Pro Leu His Leu Ser Gly
130 135 140
ggt cag cag cag cgt gtt gct att gcc cgt gcg ttg atg atg gaa ccg      480
Gly Gln Gln Gln Arg Val Ala Ile Ala Arg Ala Leu Met Met Glu Pro
145 150 155
cag gta ctg ctg ttc gat gaa ccg acc gcc gca ctg gac ccg gaa att      528
Gln Val Leu Leu Phe Asp Glu Pro Thr Ala Ala Leu Asp Pro Glu Ile
165 170 175
acg gca caa atc gtc agc atc att cgt gag ctg gca gaa acg aat att      576
Thr Ala Gln Ile Val Ser Ile Ile Arg Glu Leu Ala Glu Thr Asn Ile
180 185 190
acc cag gtg atc gtc acc cac gaa gtt gaa gtg gcg cgt aaa acc gcc      624
Thr Gln Val Ile Val Thr His Glu Val Glu Val Ala Arg Lys Thr Ala
195 200 205
agc cga gtg gtg tat atg gaa aat ggt cat atc gta gaa caa ggc gac      672
Ser Arg Val Val Tyr Met Glu Asn Gly His Ile Val Glu Gln Gly Asp
210 215 220
gcg agc tgc ttt acc gag ccg caa acc gaa gca ttt aaa aac tat ctc      720
Ala Ser Cys Phe Thr Glu Pro Gln Thr Glu Ala Phe Lys Asn Tyr Leu
225 230 235

```

tct cac taa
Ser His

<210> 2
<211> 242
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

5

<400> 2

```
Met Ser Ile Gln Leu Asn Gly Ile Asn Cys Phe Tyr Gly Ala His Gln
1 Ala Leu Phe Asp Ile Thr Leu Asp Cys Pro Gln Gly Glu Thr Leu Val
Leu Leu Gly Pro Ser Gly Ala Gly Lys Ser Ser Leu Leu Arg Val Leu
Asn Leu Leu Glu Met Pro Arg Ser Gly Thr Leu Asn Ile Ala Gly Asn
His Phe Asp Phe Thr Lys Thr Pro Ser Asp Lys Ala Ile Arg Asp Leu
Arg Arg Asn Val Gly Met Val Phe Gln Gln Tyr Asn Leu Trp Pro His
Leu Thr Val Gln Gln Asn Leu Ile Glu Ala Pro Cys Arg Val Leu Gly
Leu Ser Lys Asp Gln Ala Leu Ala Arg Ala Glu Lys Leu Leu Glu Arg
Leu Arg Leu Lys Pro Tyr Ser Asp Arg Tyr Pro Leu His Leu Ser Gly
Gly Gln Gln Gln Arg Val Ala Ile Ala Arg Ala Leu Met Met Glu Pro
Gln Val Leu Leu Phe Asp Glu Pro Thr Ala Ala Leu Asp Pro Glu Ile
Thr Ala Gln Ile Val Ser Ile Ile Arg Glu Leu Ala Glu Thr Asn Ile
Thr Gln Val Ile Val Thr His Glu Val Glu Val Ala Arg Lys Thr Ala
Ser Arg Val Val Tyr Met Glu Asn Gly His Ile Val Glu Gln Gly Asp
Ala Ser Cys Phe Thr Glu Pro Gln Thr Glu Ala Phe Lys Asn Tyr Leu
Ser His
```

10

<210> 3
<211> 732
<212> ADN
<213> *Escherichia coli*

15

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(732)

20

<400> 3

```
atg aaa aaa gtt ctg att gcc gcg tta att gca ggt ttt agt ctt tcc 48
Met Lys Lys Val Leu Ile Ala Ala Leu Ile Ala Gly Phe Ser Leu Ser
1 gcc aca gct gcc gaa acc att cgt ttt gct acc gaa gcc tcc tat cct 96
Ala Thr Ala Ala Glu Thr Ile Arg Phe Ala Thr Glu Ala Ser Tyr Pro
20 ccg ttt gaa tcg att gat gca aac aac cag atc gtt ggt ttt gac gtc 144
Pro Phe Glu Ser Ile Asp Ala Asn Asn Gln Ile Val Gly Phe Asp Val
35 gac ctg gca caa gcg ctg tgt aaa gag att gat gca acc tgc act ttc 192
Asp Leu Ala Gln Ala Leu Cys Lys Glu Ile Asp Ala Thr Cys Thr Phe
50 tct aac cag gcg ttt gac agc ctg atc cca agc ctg aaa ttc cgt cgc 240
Ser Asn Gln Ala Phe Asp Ser Leu Ile Pro Ser Leu Lys Phe Arg Arg
65
```

ES 2 402 191 T3

gta gaa gcc gtg atg gcg ggc atg gat atc act ccg gag cgt gaa aag 288
 Val Glu Ala Val Met Ala Gly Met Asp Ile Thr Pro Glu Arg Glu Lys
 85 90
 cag gtg ctg ttt acc acc ccg tac tat gac aac tct gcc ctg ttt gtg 336
 Gln Val Leu Phe Thr Thr Pro Tyr Tyr Asp Asn Ser Ala Leu Phe Val
 100 105 110
 ggt cag caa ggc aaa tac acc agt gtt gat cag ctg aaa ggc aaa aaa 384
 Gly Gln Gln Gly Lys Tyr Thr Ser Val Asp Gln Leu Lys Gly Lys Lys
 115 120 125
 gtc ggc gta cag aac ggg acg aca cac cag aaa ttc att atg gat aag 432
 Val Gly Val Gln Asn Gly Thr Thr His Gln Lys Phe Ile Met Asp Lys
 130 135 140
 cac ccg gaa atc act acc gtt ccg tat gac agc tac cag aac gca aaa 480
 His Pro Glu Ile Thr Thr Val Pro Tyr Asp Ser Tyr Gln Asn Ala Lys
 145 150 155 160
 ctg gat ctg caa aac ggg cgt atc gac ggc gtc ttc ggt gac acc gca 528
 Leu Asp Leu Gln Asn Gly Arg Ile Asp Gly Val Phe Gly Asp Thr Ala
 165 170 175
 gtg gtc act gag tgg ctg aaa gat aac ctc ggc gcg gcg gtc ggc 576
 Val Val Thr Glu Trp Leu Lys Asp Asn Pro Lys Leu Ala Ala Val Gly
 180 185 190
 gac aaa gtg acc gat aaa gat tac ttc ggc act ggc ctc ggc atc gcg 624
 Asp Lys Val Thr Asp Lys Asp Tyr Phe Gly Thr Gly Leu Gly Ile Ala
 195 200 205
 gta cgt cag ggc aac act gag ctg cag cag aaa ctc aac act gcg ctg 672
 Val Arg Gln Gly Asn Thr Glu Leu Gln Gln Lys Leu Asn Thr Ala Leu
 210 215 220
 gaa aaa gtg aag aaa gat ggc act tac gaa acc atc tac aac aaa tgg 720
 Glu Lys Val Lys Lys Asp Gly Thr Tyr Glu Thr Ile Tyr Asn Lys Trp
 225 230 235 240
 ttc cag aag taa 732
 Phe Gln Lys

<210> 4
 <211> 243
 5 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

<400> 4

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

<210> 5
 <211> 717
 15 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

<220>
 <221> CDS
 20 <222> (1) .. (717)

ES 2 402 191 T3

<400> 5

```

atg aat gaa ttt ttt cct tta gca agc gcc gcc ggg atg acc gtc ggc      48
Met Asn Glu Phe Phe Pro Leu Ala Ser Ala Ala Gly Met Thr Val Gly
1 5 10 15
ctt gcc gtt tgt gca ttg att gtc ggg ctg gcg ctg gcg atg ttc ttt      96
Leu Ala Val Cys Ala Leu Ile Val Gly Leu Ala Leu Ala Met Phe Phe
20 25 30
gcg gta tgg gag tcg gca aaa tgg cgt gtc gcg tgg gca ggt tca      144
Ala Val Trp Glu Ser Ala Lys Trp Arg Pro Val Ala Trp Ala Gly Ser
35 40 45
gcg ctg gta acc att ctg cgt ggc ctg cca gaa att ctg gtg gtg ctg      192
Ala Leu Val Thr Ile Leu Arg Gly Leu Pro Glu Ile Leu Val Val Leu
50 55 60
ttt atc tat ttt ggc tcc tcg cag ctg ctg ctg acg ctt tcg gat ggc      240
Phe Ile Tyr Phe Gly Ser Ser Gln Leu Leu Leu Thr Leu Ser Asp Gly
65 70 75 80
ttc act atc aat ctt ggg ttc gtg cag atc cca gtg cag atg gac att      288
Phe Thr Ile Asn Leu Gly Phe Val Gln Ile Pro Val Gln Met Asp Ile
85 90 95
gag aac ttc gac gtt agc ccg ttc ctt tgt ggt gtc atc gct ctg tca      336
Glu Asn Phe Asp Val Ser Pro Phe Leu Cys Gly Val Ile Ala Leu Ser
100 105 110
ctg ctg tat gcc gcc tat gcc tcg caa acg ctt cgg ggc gcg ttg aaa      384
Leu Leu Tyr Ala Ala Tyr Ala Ser Gln Thr Leu Arg Gly Ala Leu Lys
115 120 125
gcg gtg ccg gtg ggt cag tgg gag tct ggt cag gcg ctg ggg ctg tcg      432
Ala Val Pro Val Gly Gln Trp Glu Ser Gly Gln Ala Leu Gly Leu Ser
130 135 140
aaa tcg gct atc ttt ttc cgt ctg gtg atg ccg cag atg tgg cgt cat      480
Lys Ser Ala Ile Phe Phe Arg Leu Val Met Pro Gln Met Trp Arg His
145 150 155 160
gcg ctg cct ggc ctc ggt aac cag tgg ctg gtg ctg ctg aaa gat acc      528
Ala Leu Pro Gly Leu Gly Asn Gln Trp Leu Val Leu Leu Lys Asp Thr
165 170 175
gcg ctg gtc agt ttg att agt gtg aat gat tta atg ctg caa aca aaa      576
Ala Leu Val Ser Leu Ile Ser Val Asn Asp Leu Met Leu Gln Thr Lys
180 185 190
agc atc gct act cgt acc cag gaa cca ttt acc tgg tac att gtg gcg      624
Ser Ile Ala Thr Arg Thr Gln Glu Pro Phe Thr Trp Tyr Ile Val Ala
195 200 205
gcg gcg att tac ctg gtg atc acc ctg ctc agt cag tac att ctc aaa      672
Ala Ala Ile Tyr Leu Val Ile Ile Leu Leu Ser Gln Tyr Ile Leu Lys
210 215 220
cgc att gac ctg cgc gcg aca cgt ttt gag cgg agg ccc agc taa      717
Arg Ile Asp Leu Arg Ala Thr Arg Phe Glu Arg Arg Pro Ser
225 230 235

```

- 5 <210> 6
- <211> 238
- <212> PRT
- <213> *Escherichia coli*

10 <400> 6

```

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

```

<210> 7
 <211> 669
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (669)

10 <400> 7

```

atg ttt gag tat tta ccc gaa ctg atg aaa ggg cta cac acc agc ctg      48
Met Phe Glu Tyr Leu Pro Glu Leu Met Lys Gly Leu His Thr Ser Leu
1 5 10 15
acg cta acc gtt gcc tcg ctg att gtg gca ctg att ctg gca ttg att      96
Thr Leu Thr Val Ala Ser Leu Ile Val Ala Leu Ile Leu Ala Leu Ile
20 25 30
ttt acc atc atc ctg acg ctg aaa acg ccg gtg ctg gtg tgg ctg gtg      144
Phe Thr Ile Ile Leu Thr Leu Lys Thr Pro Val Leu Val Trp Leu Val
35 40 45
cgg ggt tat atc acg ctg ttt acc ggt acg ccg ctg ctg gtg cag atc      192
Arg Gly Tyr Ile Thr Leu Phe Thr Gly Thr Pro Leu Leu Val Gln Ile
50 55 60
ttc ctg att tat tac ggg ccg ggc cag ttt ccg act ttg cag gag tat      240
Phe Leu Ile Tyr Tyr Gly Pro Gly Gln Phe Pro Thr Leu Gln Glu Tyr
65 70 75 80
ccg gca ctg tgg cat ttg ttg tca gaa ccg tgg tta tgt gcg ctg att      288
Pro Ala Leu Trp His Leu Leu Ser Glu Pro Trp Leu Cys Ala Leu Ile
85 90 95
gcg ttg tcg ctg aat agt gcg gcg tat acc acg cag ctg ttt tac ggt      336
Ala Leu Ser Leu Asn Ser Ala Ala Tyr Thr Thr Gln Leu Phe Tyr Gly
100 105 110
gca att cgt gcg atc ccg gaa ggt cag tgg cag tcc tgt agc gcc ctg      384
Ala Ile Arg Ala Ile Pro Glu Gly Gln Trp Gln Ser Cys Ser Ala Leu
115 120 125
gga atg agc aaa aaa gat acg ctg gcg atc ctg ctg ccg tat gcc ttt      432
Gly Met Ser Lys Lys Asp Thr Leu Ala Ile Leu Leu Pro Tyr Ala Phe
130 135 140
aaa cgc tcg ctc tct tct tat tcc aac gaa gtg gtg ctg gta ttc aaa      480
Lys Arg Ser Leu Ser Ser Tyr Ser Asn Glu Val Val Leu Val Phe Lys
145 150 155 160
agt acc tct ctg gca tac acc att acg ctg atg gaa gtg atg gga tac      528
Ser Thr Ser Leu Ala Tyr Thr Ile Thr Leu Met Glu Val Met Gly Tyr
165 170 175
agc cag ttg ttg tac gga cgc acc tac gat gta atg gtg ttc ggt gcg      576
Ser Gln Leu Leu Tyr Gly Arg Thr Tyr Asp Val Met Val Phe Gly Ala
180 185 190
gca ggg att att tac ctg gtc gtt aac ggc ctg ctg acg ctg atg atg      624
Ala Gly Ile Ile Tyr Leu Val Val Asn Gly Leu Leu Thr Leu Met Met
195 200 205
cgt ctg atc gag cgc aaa gcg ctg gca ttc gaa cgg cga aat taa      669
Arg Leu Ile Glu Arg Lys Ala Leu Ala Phe Glu Arg Arg Asn
210 215 220
    
```

15 <210> 8
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

20 <400> 8

```

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

<210> 9
 <211> 732
 <212> ADN
 <213> *Escherichia coli*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (732)

10 <400> 9

```

atg aaa aag tta gtt ctt gcc gct tta ctt gct tcc ttt act ttc ggt      48
Met Lys Lys Leu Val Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Phe Thr Phe Gly
1 5 10 15
gct tct gcc gca gag aaa atc aat ttt ggc gtt tca gcc acc tat cca      96
Ala Ser Ala Ala Glu Lys Ile Asn Phe Gly Val Ser Ala Thr Tyr Pro
20 25 30
ccc ttt gaa tct ata ggt gct aat aat gag att gtc ggc ttt gat atc      144
Pro Phe Glu Ser Ile Gly Ala Asn Asn Glu Ile Val Gly Phe Asp Ile
35 40 45
gat ctg gca aaa gcc ttg tgc aaa caa atg cag gca gaa tgt act ttt      192
Asp Leu Ala Lys Ala Leu Cys Lys Gln Met Gln Ala Glu Cys Thr Phe
50 55 60
act aat cac cgg ttc gac agc ctg atc ccg tcc ctg aaa ttc aga aaa      240
Thr Asn His Ala Phe Asp Ser Leu Ile Pro Ser Leu Lys Phe Arg Lys
65 70 75 80
tat gac gcc gta atc tcc ggt atg gat atc acc ccg gag cgt agc aaa      288
Tyr Asp Ala Val Ile Ser Gly Met Asp Ile Thr Pro Glu Arg Ser Lys
85 90 95
cag gta tcg ttt acc acg ccc tac tat gaa aac tca gcc gtc gtg att      336
Gln Val Ser Phe Thr Pro Tyr Tyr Glu Asn Ser Ala Val Val Ile
100 105 110
gcc aaa aaa gat acc tac aaa acg ttt gcc gat ctg aaa ggc aaa cgt      384
Ala Lys Lys Asp Thr Tyr Lys Thr Phe Ala Asp Leu Lys Gly Lys Arg
115 120 125
att ggg atg gaa aac ggt act acg cac cag aaa tat att cag gat cag      432
Ile Gly Met Glu Asn Gly Thr Thr His Gln Lys Tyr Ile Gln Asp Gln
130 135 140
cac ccg gaa gtg aaa act gtc tct tat gac agt tat cag aat gcc ttt      480
His Pro Glu Val Lys Thr Val Ser Tyr Asp Ser Tyr Gln Asn Ala Phe
145 150 155 160
atc gat ctg aaa aat ggt cgt att gat ggg gta ttt ggt gac aca gcg      528
Ile Asp Leu Lys Asn Gly Arg Ile Asp Gly Val Phe Gly Asp Thr Ala
165 170 175
gtg gta aac gaa tgg ctg aaa acc aat cca caa ctt ggt gtt gct act      576
Val Val Asn Glu Trp Leu Lys Thr Asn Pro Gln Leu Gly Val Ala Thr
180 185 190
gag aaa gtg acc gat ccg caa tat ttt ggc acc ggc ctg ggc atc gct      624
Glu Lys Val Thr Asp Pro Gln Tyr Phe Gly Thr Gly Leu Gly Ile Ala
195 200 205
gta cgt ccg gat aac aaa gcc ctg ctg gaa aaa ctg aat aac gcg ctg      672
Val Arg Pro Asp Asn Lys Ala Leu Leu Glu Lys Leu Asn Asn Ala Leu
210 215 220
gca gca att aaa gct gac ggt act tat caa aaa atc agt gac cag tgg      720
Ala Ala Ile Lys Ala Asp Gly Thr Tyr Gln Lys Ile Ser Asp Gln Trp
225 230 235 240
ttc cca cag taa
Phe Pro Gln
732
    
```

15 <210> 10
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

20 <400> 10

ES 2 402 191 T3

Met Lys Lys Leu Val Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ser Phe Thr Phe Gly
 1 Ala Ser Ala Ala Glu Lys Ile Asn Phe Gly Val Ser Ala Thr Tyr Pro
 20
 Pro Phe Glu Ser Ile Gly Ala Asn Asn Glu Ile Val Gly Phe Asp Ile
 35
 Asp Leu Ala Lys Ala Leu Cys Lys Gln Met Gln Ala Glu Cys Thr Phe
 50
 Thr Asn His Ala Phe Asp Ser Leu Ile Pro Ser Leu Lys Phe Arg Lys
 65
 Tyr Asp Ala Val Ile Ser Gly Met Asp Ile Thr Pro Glu Arg Ser Lys
 80
 Gln Val Ser Phe Thr Thr Pro Tyr Tyr Glu Asn Ser Ala Val Val Ile
 100
 Ala Lys Lys Asp Thr Tyr Lys Thr Phe Ala Asp Leu Lys Gly Lys Arg
 115
 Ile Gly Met Glu Asn Gly Thr Thr His Gln Lys Tyr Ile Gln Asp Gln
 130
 His Pro Glu Val Lys Thr Val Ser Tyr Asp Ser Tyr Gln Asn Ala Phe
 145
 Ile Asp Leu Lys Asn Gly Arg Ile Asp Gly Val Phe Gly Asp Thr Ala
 160
 Val Val Asn Glu Trp Leu Lys Thr Asn Pro Gln Leu Gly Val Ala Thr
 180
 Glu Lys Val Thr Asp Pro Gln Tyr Phe Gly Thr Gly Leu Gly Ile Ala
 195
 Val Arg Pro Asp Asn Lys Ala Leu Leu Glu Lys Leu Asn Asn Ala Leu
 210
 Ala Ala Ile Lys Ala Asp Gly Thr Tyr Gln Lys Ile Ser Asp Gln Trp
 225
 Phe Pro Gln 230 235 240

5 <210> 11
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 11

15 **aaaaagttct gattgccgcg ttaattgcag gttttacgct caagttagta taaaaagct** 60
gaac 64

<210> 12
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 12

25 **gtttcgtaag tgccatcttt cttcactttt tccagctgaa gcctgctttt ttatactaag** 60
ttgg 64

<210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador

<400> 13

atgaaaaaag ttctgattgc cg 22

40 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 402 191 T3

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 14
 aatgcacaaa cggcaaggcc 20
 10 <210> 15
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 20 **tagctatcag actgccagta tacgagtgtc aatgagcgct caagttagta taaaaaagct 60**
gaac 64
 <210> 16
 <212> 64
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 16
tctcaagccg cggttgcggc tttctgaatc ttactgtgaa gcctgccttt ttatactaag 60
ttgg 64
 <210> 17
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 17
 gacatttatg ctcgccgacc 20
 45 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador
 <400> 18
 55 aggctgata agcgtagcgc 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir L-arginina, que comprende:
 - 5 - cultivar una bacteria productora de L-arginina de la familia de las enterobacteriáceas en un medio, y
 - recoger la L-arginina del medio, en el que dicha bacteria ha sido modificada para atenuar la expresión del gen *artI* mediante la inactivación del gen *artI*.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho gen *artI* codifica una proteína que presenta una homología no inferior a 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos entera de SEC ID nº 4.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha bacteria ha sido modificada para atenuar la expresión del complejo *artPIQM-artJ*.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la expresión del complejo *artPIQM-artJ* se atenúa mediante la inactivación del complejo *artPIQM-artJ*.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha bacteria pertenece al género *Escherichia*.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha bacteria pertenece al género *Pantoea*.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha bacteria es la *Escherichia coli*.

Fig. 1

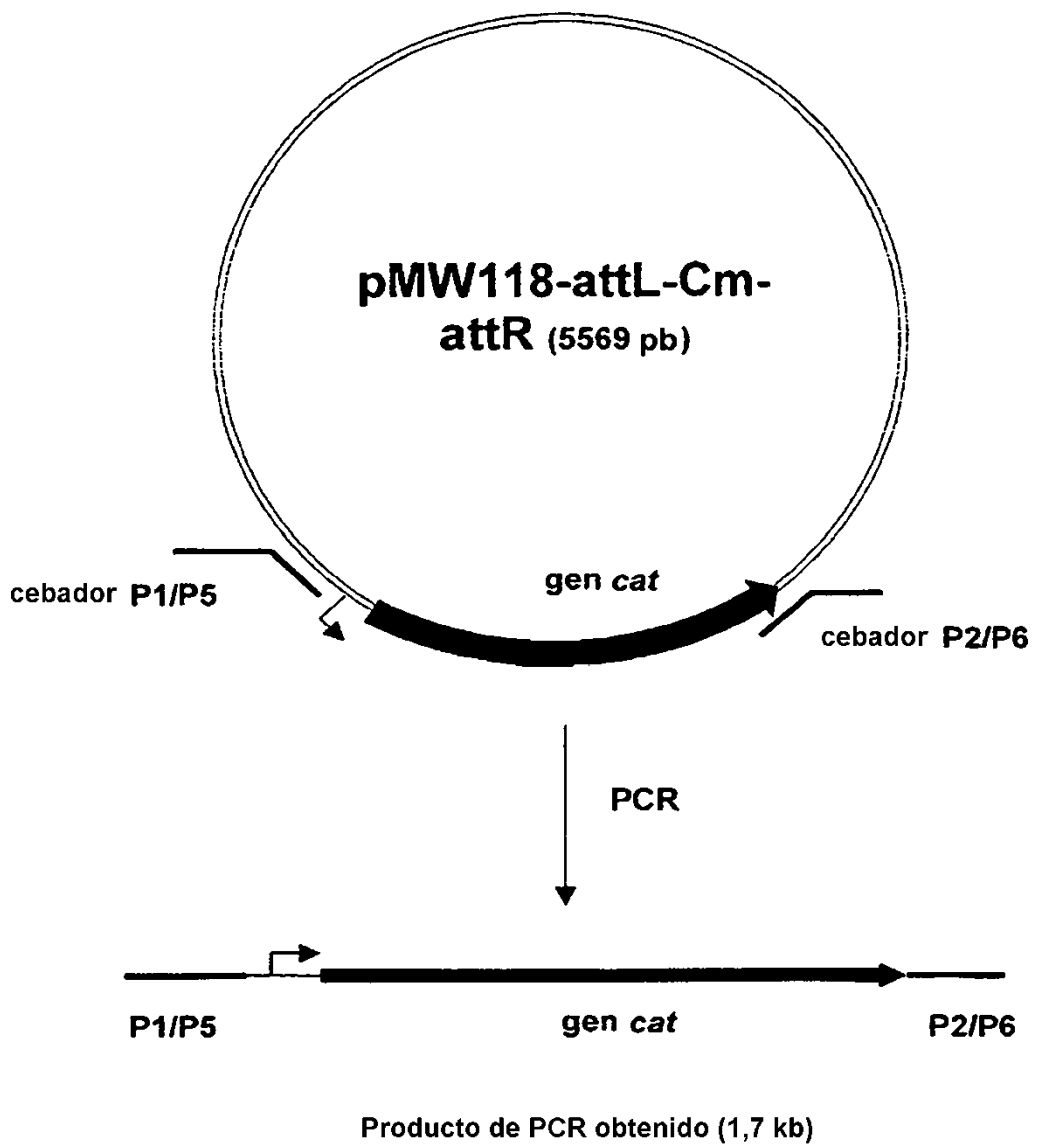


Fig. 2

