

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 256**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2011 PCT/KR2011/009477**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.06.2012 WO12077994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2011 E 11846603 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2650358**

54 Título: **Microorganismo que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina y método de producción de ornitina usando el mismo**

30 Prioridad:

08.12.2010 KR 20100124866

07.12.2011 KR 20110130594

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

07.03.2019

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
292, Ssangnim-dong, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**CHOI, HYANG;
LEE, KYOUNG MIN;
KANG, MIN SUN;
JHON, SUNG HOO;
UM, HYE WON;
CHOI, SU JIN;
LEE, HAN WON y
SHIN, SOO AN**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 703 256 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismo que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina y método de producción de ornitina usando el mismo

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a un microorganismo que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina y a un método de producción de ornitina usando el mismo.

[Antecedentes de la técnica]

La ornitina es una sustancia que se encuentra ampliamente en plantas, animales y microorganismos, y que se usa como un precursor en la biosíntesis de arginina, prolina y poliaminas. Como aminoácido no esencial, la ornitina no se encuentra en las proteínas, pero está presente en los antibióticos peptídicos tales como la tirosidina y la gramicidina. La ornitina desempeña un papel importante en la vía de excreción de la urea producida a partir del aminoácido o del amoníaco a través del ciclo de la ornitina en el metabolismo *in vivo* de animales superiores.

La ornitina ayuda a construir los músculos y a reducir la grasa corporal, y por lo tanto, se usa como suplemento nutricional. El ornitina-alfa quetoglutarato (OKG) que contiene ornitina y el ácido alfa-cetoglutarico a una proporción de 2:1 se usa como un potenciador inmunitario. La ornitina también se usa como fármacos para mejorar la cirrosis hepática y los trastornos de la función hepática, ya que ayuda a eliminar el amoníaco dañino del hígado. Los métodos conocidos para producir ornitina son el tratamiento de la caseína láctea con enzimas digestivas y el uso de *E. coli* transformada o microorganismos industriales pertenecientes a *Corynebacterium* sp., que se usan ampliamente en la producción de aminoácidos, ácidos nucleicos, enzimas y sustancias similares a antibióticos.

En los microorganismos que pertenecen a *Corynebacterium* sp., L-arginina es sintetizada a partir del glutamato por una enzima expresada de un gen en el operón de arginina en forma de argCJBDFRGH. Los genes del operón de arginina, que desempeñan el papel más importante en la biosíntesis de la arginina, sintetizan la arginina usando glutamato intracelular (L-glutamato) como sustrato, y se produce ornitina como producto intermedio durante la síntesis de la arginina. Específicamente, como en la FIG. 2, que ilustra esquemáticamente una vía sintética de arginina a partir de glutamato en un microorganismo perteneciente a *Corynebacterium* sp., se sabe que argJ codifica una enzima que convierte el glutamato en N-acetil-glutamato, argB codifica una enzima que convierte el N-acetil-glutamato en N-acetilglutamil-fosfato, argC codifica una enzima que convierte el N-acetilglutamil-fosfato en semialdehído de N-acetil-glutamato, argD codifica una enzima que convierte el semialdehído de N-acetil-glutamato en N-acetil-ornitina, argJ codifica una enzima que convierte la N-acetil-ornitina en ornitina, argF codifica una enzima que convierte la ornitina en citrulina, argG codifica una enzima conversora de la citrulina en argininosuccinato, y argH codifica una enzima conversora del argininosuccinato en arginina en la vía sintética de la arginina, y la vía sintética de ornitina se incluye en la vía sintética de la arginina.

Las cepas productoras de arginina conocidas se han desarrollado mediante la introducción de una mutación en el operón de arginina o mediante una mutación en el promotor para aumentar los niveles de expresión de las enzimas que participan en la biosíntesis de la arginina. Entre ellos, argR que controla y suprime la expresión del operón de arginina y argB inhibida por el nivel de arginina han sido ampliamente estudiadas como dianas para aumentar la producción de arginina (publicación de patente coreana n.º 2010-0060909).

Para mejorar la productividad de la ornitina, se sabe que la producción de ornitina es aumentada por la acción de la ornitina ciclodesaminasa (ocd) mediante el cultivo del microorganismo *Corynebacterium* en un medio complementado con prolina, o mediante la modificación de los impulsores y las condiciones de cultivo durante el cultivo del microorganismo. Además, cuando se usa una *E. coli* transformada, la productividad de la ornitina se mejora cultivando las cepas con argF y argR eliminados en un medio complementado con glutamato, o usando una cepa transformada con la eliminación del gen proB que codifica la γ -glutamylquinasa que participa en la primera etapa de la vía sintética de la prolina a partir del glutamato en lugar de la vía sintética de la ornitina a partir del glutamato.

Además, se ha usado sistemáticamente *Corynebacterium glutamicum* para la producción de alto rendimiento de glutamato como un precursor de la ornitina. Se sabe que la excreción de glutamato a partir de *Corynebacterium glutamicum* aumenta mediante la limitación de la biotina o el tratamiento con penicilina G o un tensioactivo de éster de ácido graso. Dado que estos tratamientos se correlacionan con el daño en la pared celular, anteriormente se creía que el glutamato se filtra de forma pasiva a través de la pared celular dañada.

La proteína NCgl1221 derivada de *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre (Cgl 13032) proporciona un flujo de betaína y su secuencia de aminoácidos es similar a la de la proteína del canal mecanosensible de *E. coli*, yggB (publicación de patente coreana n.º 2010-0017581). Hwang Joong-Hee *et al.* (*J. of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18, 704-710) desvelan el efecto del aumento de la disponibilidad de glutamato en la producción de L-ornitina en *Corynebacterium glutamicum* con la eliminación de argF, argR y proB. Se concluye que la concentración intracelular de glutamato no es una etapa limitante de la velocidad en *C. glutamicum*, pero que es limitante de la velocidad en *E.*

coli (sumario, Figura 1, página 705, 2º párrafo de la izquierda).

[DIVULGACIÓN]

5 **[Problema técnico]**

En este contexto, los presentes inventores han hecho muchos esfuerzos para desarrollar una cepa de *Corynebacterium* capaz de producir la ornitina útil a un rendimiento superior. Como resultado de ello, encontraron que se puede desarrollar una cepa sobreproductora de ornitina mediante el bloqueo de la vía biosintética de la arginina a partir de la ornitina, mediante el bloqueo de una proteína que participa en la exportación del glutamato para aumentar el nivel de glutamato intracelular y la mejora de la vía biosintética de la ornitina a partir del glutamato, completando de esta forma la presente invención.

15 **[Solución técnica]**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo que tenga una mejor capacidad de producción de ornitina. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de ornitina usando el microorganismo.

20 **[Efecto ventajoso]**

El microorganismo de la presente invención que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina se puede usar de manera más eficaz en una amplia variedad de aplicaciones para la producción de ornitina.

25 **[Breve descripción de los dibujos]**

La FIG. 1 muestra la vía biosintética de ornitina y los genes relacionados de *Corynebacterium glutamicum* transformada de la presente invención;
la FIG. 2 muestra la vía biosintética de arginina conocida de *Corynebacterium glutamicum*; y
30 la FIG. 3 muestra un vector pDZ que se introducirá en el cromosoma del microorganismo perteneciente a *Corynebacterium* sp.

[Mejor modo]

35 En un aspecto para conseguir los objetos anteriores de la presente invención, la presente invención proporciona un microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium* sp. que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina, en el que se modifican las actividades de la ornitina carbamoiltransferasa y una proteína que participa en la exportación del glutamato (NCgl1221) para que sean atenuadas mediante una eliminación parcial o completa de los genes que codifican la ornitina carbamoiltransferasa y NCgl1221, en comparación con sus actividades endógenas.

40 Como se usa en el presente documento, "ornitina carbamoiltransferasa (OCT)" se refiere a una enzima catalítica que media la reacción entre el fosfato de carbamoilo y la ornitina para sintetizar citrulina y ácido fosfórico. La OCT está presente en el hígado de animales que excretan urea, así como en plantas y en microorganismos; y en los microorganismos, participa en la síntesis de la arginina. La enzima OCT comprende un dominio catalítico y un dominio regulador, y cuando la ornitina se une al dominio regulador, la actividad de la enzima se inhibe.

45 La cepa de *E. coli* K12 tiene dos tipos de OCT (ArgF y ArgI), y los microorganismos intestinales que incluyen las cepas *E. coli* B y W tienen una proteína OCT similar a ArgI. Las OCT codificadas por *argF* y *argI* tienen diferentes secuencias de aminoácidos entre sí, pero se consideran isoenzimas que tienen la misma función (*EMBO J.* (1982) 1:853-857). La cepa de *Corynebacterium* sp. solo tiene OCT codificada por el gen *argF*. La OCT solo actúa en la vía sintética de la ornitina a la arginina y, por lo tanto, si la actividad de la OCT se debilita, el nivel de ornitina intracelular puede aumentar.

50 Para la acumulación de ornitina intracelular, la presente invención proporciona un microorganismo de *Corynebacterium* en el que se bloquea la vía sintética de la arginina a partir de la ornitina. Para conseguir esto, se preparó una cepa transformada con una eliminación del gen que codifica la ornitina carbamoiltransferasa. En este sentido, la ornitina carbamoiltransferasa puede ser, pero sin limitarse en particular a, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, o una proteína que tiene un 70 % o más de homología con la secuencia, más preferentemente, un 80 % o más de homología con la secuencia, y mucho más preferentemente un 90 % o más de homología con la secuencia.

55 Como se usa en el presente documento, "homología" se refiere a la similitud en las secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos del gen que codifica una proteína. Cuando la homología es suficientemente alta, los productos del gen correspondiente pueden ser iguales o tener una actividad similar.

60 Como se usa en el presente documento, "proteína que participa en la exportación de glutamato" se refiere a un tipo de canales mecanosensibles que funcionan para exportar el glutamato producido intracelularmente al entorno extracelular. La presente invención proporciona un microorganismo de *Corynebacterium* que tiene mejor productividad de ornitina. Para esta labor, se prepara una cepa transformada capaz de mantener un alto nivel de glutamato intracelular eliminando un gen que codifica la proteína que funciona para excretar el glutamato, que es una materia prima para la síntesis de ornitina.

Al aumentar el nivel intracelular de glutamato, es decir, un precursor de la ornitina, se puede estimular una vía biosintética de ornitina. En la presente invención, la exportación de glutamato puede reducirse o inhibirse disminuyendo la actividad de NCgl1221. La proteína eliminada que participa en la exportación del glutamato puede ser una proteína que tenga una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o una secuencia de aminoácidos que

tenga una homología del 70 % o más, y más preferentemente, que tenga una homología del 80 % o más, incluso más preferentemente, que tenga una homología del 90 % o más, pero sin limitación. La actividad de la ornitina carbamoiltransferasa y la proteína que participa en la exportación del glutamato se puede disminuir mediante un método seleccionado del grupo que consiste en (1) una eliminación parcial o completa de un gen que codifica la proteína; (2) la modificación de una secuencia reguladora de la expresión para suprimir la expresión

génica; (3) la modificación de la secuencia de nucleótidos en el cromosoma para disminuir la actividad de la proteína; y 4) una combinación de las mismas, pero sin limitación. Se puede realizar una eliminación parcial o completa de un polinucleótido que codifica la proteína introduciendo un vector para la inserción cromosómica en un microorganismo, reemplazando así el polinucleótido que codifica una proteína diana endógena en el cromosoma con un polinucleótido parcialmente eliminado o un gen marcador. La

longitud "parcial" puede variar dependiendo del tipo de polinucleótido, pero específicamente se refiere a una longitud de 1 a 300 nucleótidos, preferentemente de 1 a 100 nucleótidos y, más preferentemente, 1 a 50 nucleótidos. Además, la modificación de una secuencia reguladora de la expresión para reducir la expresión del polinucleótido puede realizarse induciendo una modificación en la secuencia reguladora de la expresión a través de la eliminación, inserción, sustitución no conservativa o conservativa de la secuencia de nucleótidos, o una combinación de las mismas para disminuir la actividad de la secuencia reguladora de la expresión, o reemplazando la secuencia reguladora de la expresión con una secuencia de nucleótidos que tiene una actividad más débil. La secuencia reguladora de la expresión incluye un promotor, una secuencia de operador, una secuencia que codifica el sitio de unión al ribosoma y una secuencia que regula la terminación de la transcripción y la traducción.

Por otra parte, la modificación de una secuencia de polinucleótidos en el cromosoma, que codifica la enzima de la presente invención, se puede realizar mediante la inducción de una mutación en la secuencia a través de la eliminación, inserción, sustitución no conservativa o conservativa de la secuencia de polinucleótido, o una combinación de las mismas para disminuir la actividad enzimática, o reemplazando la secuencia con una secuencia de polinucleótidos que se modifica para tener una actividad más débil.

Como se usa en el presente documento, "actividad endógena" se refiere a la actividad de enzima que posee un microorganismo en su estado nativo. En la presente invención, la actividad endógena se refiere a la actividad de la ornitina carbamoil transferasa y una proteína que participa en la exportación del glutamato, es decir, NCgl1221, que un microorganismo posee de manera natural. Además, como se usa en el presente documento, "modificadas para que tenga una actividad más débil que una actividad endógena" se refiere al estado en el que una ornitina carbamoil transferasa y una proteína que participa en la exportación del glutamato, es decir, NCgl1221, no funcionan correctamente debido a la eliminación o mutación de genes, y de ese modo, la actividad de la ornitina carbamoil transferasa y una proteína que participa en la exportación del glutamato, es decir, NCgl1221, que un microorganismo posee de manera natural, se debilita.

Como se usa en el presente documento, la expresión "microorganismo que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina" se refiere a un microorganismo que tiene una capacidad de producción de ornitina superior a la de la cepa parental, y el microorganismo que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina puede ser, pero sin limitarse en particular a, un microorganismo que se transforma adicionalmente para tener una mayor actividad de la acetilglutamato sintasa (ArgJ), que convierte el glutamato en acetil-glutamato (*N*-acetil-glutamato) o la ornitina acetiltransferasa (ArgJ), que convierte la acetil-ornitina en ornitina, la acetilglutamato quinasa (ArgB), que convierte el acetil-glutamato en acetilglutamil-fosfato (*N*-acetilglutamil-fosfato), la acetil-gamma-glutamil-fosfato reductasa (ArgC), que convierte el acetil-glutamil-fosfato en semialdehído de acetil-glutamato (semialdehído de *N*-acetil-glutamato), la acetilornitina aminotransferasa (ArgD), que convierte el semialdehído de acetil-glutamato en acetilornitina (*N*-acetilornitina) o similares en comparación con la actividad endógena, para mejorar la vía biosintética de la ornitina a partir del glutamato.

El microorganismo transformado se preparó mediante un método diferente al método conocido de desarrollo de una cepa productora de ornitina, es decir, el método conocido se realiza eliminando o atenuando la función de ArgR que actúa como un inhibidor de la transcripción en la vía biosintética de la arginina para aumentar la producción de ornitina, y eliminando además el gen de la ornitina carbamoiltransferasa e introduciendo la *N*-acetilglutamato sintasa resistente a la retroalimentación para aumentar la producción de ornitina (publicación de patente coreana n.º 2010-0060909).

En este sentido, la acetil gamma-glutamil-fosfato reductasa (ArgC), la acetilglutamato sintasa o la ornitina acetiltransferasa (argJ), la acetilglutamato quinasa (ArgB) y la acetilornitina aminotransferasa (argD) pueden tener preferentemente, pero sin limitarse en particular a, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, 25, 27 y 29, o un 70 % o más de homología con la secuencia, más preferentemente, un 80 % o más de homología con la secuencia, y mucho más preferentemente, un 90 % o más de homología con la secuencia, respectivamente. El aumento en su actividad se puede realizar mediante uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en 1) un aumento en el número de copias de un polinucleótido que codifica la proteína; y 2) un aumento en la expresión del polinucleótido mediante la modificación de la secuencia de control de la expresión; 3) la potenciación de la actividad enzimática mediante la modificación de la secuencia polinucleotídica en el cromosoma; y 4) la potenciación mediante una

combinación de las mismas.

Para ser específicos, se pueden usar varios métodos para aumentar la actividad enzimática en un microorganismo en general. Por ejemplo, el nivel de expresión de un polinucleótido puede aumentarse aumentando el número de copias del polinucleótido a través de la transformación que implica la inserción del plásmido, la recombinación homóloga, la conjugación y la translocación; modificando una secuencia reguladora de la expresión del polinucleótido; amplificando un gen que codifica un factor regulador que estimula la expresión del polinucleótido; o eliminando o inhibiendo un gen que codifica un factor regulador que suprime la expresión del polinucleótido. Para ser más específicos, el nivel de expresión de un polinucleótido puede aumentarse uniendo operativamente un fragmento de gen que comprende el polinucleótido a un vector multicopia que puede replicarse en cepas de *Corynebacterium* sp., introduciendo copias únicas o múltiples del polinucleótido en el cromosoma, o reemplazando la secuencia reguladora de la expresión del polinucleótido por una que tenga una mejor actividad que incluya un promotor potente.

Por ejemplo, el grupo de genes *argCJBD* puede transformarse en un microorganismo usando el vector pHC139T para preparar un microorganismo con una productividad de ornitina significativamente mejorada. Como alternativa, se puede preparar un microorganismo en el que se mejore la vía biosintética de la ornitina mejorando una región promotora reguladora de la expresión del gen *argCJBD* en el cromosoma del microorganismo o reemplazando una región promotora por un promotor con una actividad más mejorada. En particular, un método para mejorar la región promotora puede implicar, para reemplazar un promotor dentro del cromosoma, preparar un fragmento génico que comprenda secuencias de nucleótidos de ambos sitios terminales adyacentes al sitio diana en el cromosoma y una secuencia promotora para insertarse de la misma forma que en el cromosoma original y siguiendo el mismo método de eliminación de genes usando un vector pDZ publicado por la publicación de patente coreana n.º 2009-0082702, pero sin limitación. Aquí, el promotor mejorado puede ser preferentemente, pero sin limitación, el promotor pcj7 (o P(CJ7)) que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 30 (patente coreana con n.º de registro 0620092). El vector pDZ puede ser preferentemente, pero sin limitación, un vector representado por un mapa de escisión de la Figura 3.

Como se usa en el presente documento, "vector" se refiere a una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos del gen que está unida operativamente a una secuencia reguladora de la expresión apropiada para expresar un gen diana en una célula hospedadora adecuada. La secuencia reguladora de la expresión comprende un promotor que puede iniciar la transcripción, una secuencia de operador opcional para regular la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma de ARNm adecuado y una secuencia que regula la terminación de la transcripción y la traducción.

Los ejemplos de vectores convencionales incluyen un plásmido natural o recombinante, un cósmido, un virus y un bacteriófago. Por ejemplo, pWE15, M13, λ EMBL3, λ EMBL4, λ FIXII, λ DASHII, λ ZAPII, λ gt10, Agt11, Charon4A y Charon21A pueden usarse como vector de fago o vector de cósmido. Como vector plásmido, se pueden usar el vector pDZ, tipo pBR, tipo pUC, tipo pBluescriptII, tipo pGEM, tipo pTZ, tipo pCL y tipo pET. El vector que se puede usar no se limita a uno en particular, y puede usarse cualquier vector de expresión conocido, preferentemente, se puede usar el vector pDZ.

Paralelamente, el microorganismo de la presente invención puede ser, pero sin limitarse en particular a, un microorganismo preparado mediante la transformación de un microorganismo que pertenece a *Escherichia* sp., *Shigella* sp., *Citrobacter* sp., *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *Yersinia* sp., *Klebsiella* sp., *Erwinia* sp., *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Selenomonas* sp., o *Vibrio* sp., que tiene las actividades de la ornitina carbamoiltransferasa y una proteína que participa en la exportación del glutamato (NCgl1221).

Preferentemente, el microorganismo de la presente invención puede ser la cepa de *Corynebacterium* sp., y más preferentemente, *Corynebacterium glutamicum*. Para ser más específicos, se puede usar una cepa de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 o una cepa sobreproductora de glutamato KCCM-10785P (publicación de patente coreana n.º 2008-0034334), pero sin limitación. La cepa KCCM-10785P es una cepa sobreproductora de glutamato generada mediante la eliminación de los genes cg2624 (NCBI LOCUS ID YP_226636) y cg2115 (NCBI LOCUS ID YP_226173) en una cepa productora de glutamato (KFCC-11074), que se generó usando un mutágeno tal como *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG). Aunque la sobreproducción de glutamato mediante la eliminación de cg2624 y cg2115 no se ha identificado antes de la publicación anterior, cg2624 se identifica como pcaR, que es una proteína reguladora de la familia IclR, y cg2115 se identifica como sugR, que es un regulador de la transcripción del metabolismo del azúcar.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se prepararon una cepa de *Corynebacterium glutamicum* con una eliminación del gen *argF* (ATCC 13032 Δ argF y KCCM-10785P Δ argF) (Ejemplo 1), una cepa de *Corynebacterium glutamicum* con la eliminación de los genes *argF* y *NCgl1221* (ATCC 13032 Δ argF Δ NCgl1221 y KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221) (Ejemplo 2), una cepa de *Corynebacterium glutamicum* con la eliminación de los genes *argF* y *NCgl1221* y con una introducción del gen *argCJBD* (ATCC 13032 Δ argF Δ NCgl1221/pHC139T-argCJBD(Cgl)) y KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221/pHC139T-argCJBD(Cgl)) (Ejemplo 3-1), y una cepa de *Corynebacterium glutamicum* con la eliminación de los genes *argF* y *NCgl1221* y con el reemplazo del promotor de la agrupación de genes *argCJBD* en el cromosoma (ATCC 13032 Δ argF Δ NCgl1221 P(CJ7)-argCJBD y KCCM-10785P

Δ argF Δ NCgl1221 P(CJ7)-argCJBD) (Ejemplo 3-2). El resultado de comparar sus productividades de ornitina mostró que la cepa *Corynebacterium glutamicum* con las eliminaciones de los genes *argF* y *NCgl1221* y con el reemplazo del promotor de la agrupación de genes *argCJBD* en el cromosoma (ATCC 13032 Δ argF Δ NCgl1221 P(CJ7)-argCJBD y KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221 P(CJ7)-argCJBD) tiene una productividad de ornitina excelente (Tablas 5 y 6).

5 Por lo tanto, la cepa productora de ornitina que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina se designó como "CC01-0061 (ATCC 13032 Δ argF Δ NCgl1221 P(CJ7)-argCJBD)", y se depositó en virtud del Tratado de Budapest en el Centro de Cultivos de Microorganismos de Corea, cuya dirección es Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, el 24 de noviembre de 2010, con el número de acceso KCCM11137P.

10 En otro aspecto de la presente invención para conseguirse los objetos anteriores, la presente invención proporciona un método para producir ornitina, incluyendo las etapas de (i) cultivar el microorganismo que tiene una mejor capacidad de producción de ornitina para obtenerse un cultivo; y (ii) recuperar la ornitina del microorganismo cultivado o del cultivo.

15 En el método, el cultivo del microorganismo puede realizarse preferentemente mediante cultivo discontinuo, cultivo continuo y cultivo discontinuo alimentado, conocidos en la técnica, pero sin limitación. Además, en cuanto a las condiciones de cultivo, se puede mantener un pH óptimo de 5 a 9, preferentemente de 6 a 8, y lo más preferentemente un pH 6,8 usando un agente químico básico (por ejemplo: hidróxido sódico, hidróxido potásico o amoníaco) o un agente químico ácido (por ejemplo: ácido fosfórico o ácido sulfúrico). Además, pueden mantenerse condiciones

20 aeróbicas añadiendo oxígeno o una mezcla gaseosa que contenga oxígeno al cultivo celular. La temperatura de cultivo puede mantenerse a de 20 °C a 45 °C, y preferentemente a de 25 °C a 40 °C. Además, es preferible cultivar durante aproximadamente 10 a 160 horas. La ornitina producida por el cultivo anterior puede excretarse a un medio de cultivo o permanecer dentro de la célula.

Además, el medio para el cultivo puede comprender azúcar e hidratos de carbono (por ejemplo: glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa), aceite y grasa (por ejemplo: aceite de soja, aceite de semillas de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco), ácido graso (por ejemplo: ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico), alcohol (por ejemplo: glicerol y etanol) y ácido orgánico (por ejemplo: ácido acético) individualmente o en combinación como fuente de carbono; compuesto orgánico que contiene nitrógeno (por ejemplo: peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, solución de maíz, harina de soja en polvo y urea) o compuesto inorgánico

30 (por ejemplo: sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio) individualmente o en combinación, como fuente de nitrógeno; dihidrogenofosfato de potasio, fosfato de dipotasio o una sal que contenga sodio correspondiente al mismo, individualmente o en combinación, como una fuente de fósforo; otras sustancias esenciales estimulantes del crecimiento, incluyendo las sales metálicas (por ejemplo: sulfato de magnesio o sulfato de hierro), aminoácidos y vitaminas.

35 [Modo para la invención]

En lo sucesivo, en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son únicamente con fines ilustrativos, y no se pretende que la invención esté

40 limitada por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de la cepa de *Corynebacterium glutamicum* con *argF* eliminado

En este ejemplo, se preparó una cepa con *argF* eliminado a partir de la cepa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 y una cepa sobreproductora de glutamato KCCM-10785P que se generó mediante la eliminación de los genes *cg2624* y *cg2115* en una cepa productora de glutamato KFCC-11074 generada mediante el uso de mutágenos tales como NTG (publicación de patente coreana n.º 2008-0034334) para bloquear una vía sintética de arginina a partir de ornitina. Los genes biosintéticos de arginina de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 están organizados en un operón que tiene una forma de *argCJBDFRGH*, y está presente un gen *argF* diana de eliminación (SEQ ID NO: 17) adyacente a los genes que codifican enzimas que participan en la vía sintética de la ornitina en el cromosoma. Por lo tanto, se preparó un plásmido para eliminar el gen *argF* basándose en la secuencia de nucleótidos de *argD* y *argR* que se encuentran adyacentes al gen *argF* diana de eliminación.

50

Para ser específicos, basados en la secuencia de nucleótidos de *argD* y *argR* de la cepa ATCC 13032, se construyeron un fragmento de recombinación homóloga adyacente a la secuencia N-terminal de *argF* y un fragmento de recombinación homóloga adyacente a la secuencia C-terminal de *argF*. Para ello, se obtuvo el fragmento adyacente a la secuencia N-terminal de *argF* mediante PCR usando el ADN genómico de la cepa ATCC 13032 como molde, y los cebadores (SEQ ID NO: 1 y 2) (28 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °), hibridación durante 30 segundos a 55 °C y extensión durante 30 segundos a 72 °C). Asimismo, se obtuvo el fragmento adyacente a la

60 secuencia C-terminal de *argF* mediante PCR usando el ADN genómico de la cepa ATCC 13032 como molde, y los cebadores (SEQ ID NO: 3 y 4) en las mismas condiciones de PCR (Tabla 1).

[Tabla 1]

Cebadores para la preparación de la cepa con <i>argF</i> eliminado ($\Delta argF$)		
Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia (5'-3')
argF-del-F1_BamHI	1	CGGGATCCTGGCCGTACCGGCGATTTCT
argF-del-R1_Sall	2	CGCGTCGACAAGTTTGTAGTCCTTTATGCG
argF-del-F2_Sall	3	CGCGTCGACGACATGTCCCTTGCTCAAC
argF-del-R2_XbaI	4	TGCTCTAGAAGTAATTCACCTAGTTCTTTACC

El fragmento de recombinación homóloga preparado anteriormente adyacente a la secuencia N-terminal de *argF* fue digerido con BamHI y Sall, y el fragmento de recombinación homóloga adyacente a la secuencia C-terminal de *argF* fue digerido con Sall y XbaI. Luego, se insertó cada uno de los fragmentos escindidos en el vector pDZ que también se digirió con BamHI y XbaI, produciendo así un plásmido pDZ-argF (K/O).

El plásmido PDZ-argF (K/S) preparado anteriormente se transformó en la cepa ATCC 13032 y en la cepa KCCM-10785P. A continuación, se sembraron las cepas transformadas en placas y se cultivaron en una placa BHIS (infusión de cerebro y corazón a 37 g/l, sorbitol a 91 g/l, agar al 2 %) que contiene kanamicina (25 mg/ml) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido), mientras que las colonias crecen en la placa. Entre las colonias formadas en la placa, se recogieron colonias de color azul para seleccionar la cepa insertada con el plásmido pDZ-argF (K/O).

Las cepas seleccionadas anteriores se cultivaron con agitación en medio CM (glucosa 10 g/l, polipeptona a 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, extracto de carne a 5 g/l, NaCl a 2,5 g/l, urea a 2 g/l, pH 6,8) a 30 °C durante 8 horas. Posteriormente, cada cultivo celular se diluyó en serie de 10^{-4} a 10^{-10} . A continuación, se sembraron las muestras diluidas en placas y se cultivaron en un medio sólido que contenía X-gal, dejando que las colonias crecieran. Entre las colonias formadas en la placa, solo se recogieron las colonias blancas que aparecían con una frecuencia relativamente baja para seleccionar las cepas con *argF* eliminado.

La inserción exitosa del plásmido pDZargF (K/O) en las cepas seleccionadas anteriormente se confirmó realizando una PCR usando el ADN cromosómico de la cepa seleccionada anteriormente como molde y los cebadores de SEQ ID NO. 1 y 4. A través de esta confirmación por PCR, se confirmó que la cepa seleccionada anteriormente es la cepa con *argF* eliminado (es decir, ATCC 13032 $\Delta argF$ y KCCM-10785P $\Delta argF$).

Ejemplo 2: Preparación de la cepa de *Corynebacterium glutamicum* con *argF* y *NCgl1221* eliminados

El gen *NCgl1221* codificante de la proteína que participa en la exportación del glutamato se eliminó además en la cepa ATCC 13032 $\Delta argF$ y en la cepa KCCM-10785P $\Delta argF$ obtenidas en el Ejemplo 1 para aumentar el nivel intracelular del glutamato, que es un precursor de ornitina.

Para ser específicos, basado en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 19) de NCgl1221 de la cepa ATCC 13032, se construyeron un fragmento de recombinación homóloga adyacente a la secuencia N-terminal de NCgl1221 y un fragmento de recombinación homóloga adyacente a la secuencia C-terminal de NCgl1221. Para ello, se generó el fragmento adyacente a la secuencia adyacente de N-terminal de NCgl1221 por PCR usando el ADN genómico de la cepa ATCC 13032 como molde y cebadores (SEQ ID NO: 5 y 6), y se generó el fragmento adyacente a la secuencia C-terminal de NCgl1221 por PCR usando el ADN genómico de la cepa ATCC 13032 como molde y cebadores (SEQ ID NO: 7 y 8) en las mismas condiciones de PCR que en el Ejemplo 1 (Tabla 2).

[Tabla 2]

Cebadores para la preparación de la cepa con <i>NCgl1221</i> eliminado		
Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia (5'-3')
NCgl1221-del-F1_BamHI	5	CGGGATCCGTCCAAGCCAAGCCGATTTCAAC
NCgl1221-del-R1_Sall	6	ACGCGTCGACCCACTCGGCGCTTGATAATAC
NCgl1221-del-F2_Sall	7	ACGCGTCGACCTGGAACAAGAACTCTCCAGC
NCgl1221-del-R2_XbaI	8	CTAGTCTAGA GGTGTTGCTTCCACTGCTG

El fragmento de recombinación homóloga preparado anteriormente adyacente a la secuencia N-terminal de *NCgl1221* fue digerido con BamHI y Sall. Asimismo, el fragmento de recombinación homóloga adyacente a la secuencia C-terminal de NCgl1221 se digirió con Sall y XbaI. Luego, se insertó cada uno de los fragmentos escindidos en el vector pDZ que se escindió con BamHI y XbaI, produciéndose así un plásmido pDZ-NCgl1221 (K/O).

El plásmido PDZ-NCgl1221 (K/S) preparado anteriormente se transformó en la cepa ATCC 13032 $\Delta argF$ y en la cepa KCCM-10785P $\Delta argF$. A continuación, se sembraron las cepas transformadas en placas y se cultivaron en una placa BHIS (infusión de cerebro y corazón a 37 g/l, sorbitol a 91 g/l, agar al 2 %) que contiene kanamicina (25 mg/ml) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido), mientras que las colonias crecen en la placa. Entre las colonias formadas en la placa, se recogieron colonias de color azul para seleccionar la cepa insertada con el plásmido pDZ-NCgl1221 (K/O).

Las cepas seleccionadas anteriores se cultivaron con agitación en medio CM a 30 °C durante 8 horas. Posteriormente, cada cultivo celular se diluyó en serie de 10^{-4} a 10^{-10} . A continuación, se sembraron las muestras diluidas en placas y se cultivaron en un medio sólido que contenía X-gal, dejando que las colonias crecieran. Entre las colonias formadas en la placa, solo se recogieron las colonias blancas que aparecieron con una frecuencia relativamente baja para

seleccionar las cepas con *NCgl1221* eliminado. La inserción exitosa del plásmido pDZ-NCgl1221(K/O) en las cepas seleccionadas anteriormente se confirmó realizando una PCR usando el ADN cromosómico de la cepa seleccionada anteriormente como molde y los cebadores de SEQ ID NO. 5 y 8. Por consiguiente, las cepas con *NCgl1221* eliminado seleccionadas se nombraron como ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ o KCCM-10785P $\Delta argF \Delta NCgl1221$.

Ejemplo 3: Preparación de cepa de *Corynebacterium glutamicum* con *argCJBD* introducido

Ejemplo 3-1: Clonación del gen *argCJBD* y preparación del transformante

En este ejemplo, se preparó un vector insertado con los genes *argC*, *argJ*, *argB*, y *argD* (SEQ ID NO: 22, 24, 26 y 28 respectivamente), y se preparó un transformante mediante la introducción del mismo, para potenciar la vía sintética de la ornitina mediante el aumento del número de copias del operón de *argCJBD* (SEQ ID NO: 21, que comprende la región promotora) que codifica las enzimas que participan en una vía sintética de la ornitina a partir del glutamato.

En primer lugar, se realizó la PCR, obteniéndose el gen *argCJBD* mediante el uso del cromosoma de la cepa ATCC 13032 como molde y cebadores (SEQ ID NO: 9 y 10, Tabla 3) (30 ciclos de desnaturalización durante 40 segundos a 95 °C, hibridación durante 40 segundos a 55 °C y extensión durante 150 segundos a 72 °C), obteniéndose así un fragmento génico que tiene un tamaño de 4.900 pb.

[Tabla 3]

Cebadores para la adquisición del fragmento de gen <i>argCJBD</i> de ATCC 13032		
Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia (5'-3')
P_argC-5-KpnI	9	CGGGGTACCCTCCTCCAGCAGCTCTAGCTC
argD-3_XbaI	10	TGCTCTAGAAAGTTTGAGTCCTTTATGCG

Se procesó el fragmento del gen preparado anteriormente a través de electroforesis en gel sobre gel de agarosa al 0,8 %, y se cortó una banda del tamaño diana y se aisló una muestra de ADN de la misma. El ADN aislado se digirió con KpnI y XbaI, obteniéndose un fragmento, luego se clonó el fragmento escindido en un vector pHC139T-gfp (publicación de patente coreana n.º 2008-0074286), produciéndose así un vector de expresión pHC139T-*argCJBD*(Cgl).

Posteriormente, se introdujo el vector de expresión pHC139T-*argCJBD*(Cgl) preparado para aumentar el nivel de producción de ornitina en la célula en la cepa ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ y la cepa KCCM-10785P $\Delta argF \Delta NCgl1221$ a través de electroporación. A continuación, se seleccionó un transformante exitoso sembrando en placas las células transformadas en una placa de BHIS que contenía 25 µg/ml de kanamicina. Por último, cada uno de los transformantes seleccionados se denominó correspondientemente ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ /pHC139T-*argCJBD*(Cgl) y KCCM-10785P $\Delta argF \Delta NCgl1221$ /pHC139T-*argCJBD*(Cgl).

Ejemplo 3-2: Sustitución del promotor del gen *argCJBD* en el cromosoma

En este ejemplo, se sustituyó un promotor de *argCJBD* con el promotor CJ7 que fue desarrollado recientemente por el presente solicitante en el cromosoma, para aumentar el nivel de expresión mediante la eliminación de la regulación del gen *argCJBD* que codifica las enzimas que participan en una vía sintética de la ornitina a partir del glutamato.

En primer lugar, se preparó un fragmento de recombinación homóloga que comprendía un promotor CJ7 y una secuencia de nucleótidos de ambos sitios terminales del promotor.

Para ser específicos, se obtuvo la secuencia de nucleótidos del sitio 5'-terminal del promotor CJ7 realizando una PCR con el uso del ADN genómico de la cepa ATCC 13032 como molde y cebadores (SEQ ID NO: 11 y 12) (28 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, hibridación durante 30 segundos a 55 °C y extensión durante 30 segundos a 72 °C). Asimismo, se obtuvo la secuencia de nucleótidos de la región del promotor CJ7 mediante PCR usando cebadores (SEQ ID NO: 13 y 14) en las mismas condiciones de PCR, y se obtuvo la secuencia de nucleótidos del sitio 3'-terminal del promotor CJ7 mediante PCR usando el ADN genómico de las cepas ATCC 13032 como molde y cebadores (SEQ ID NO: 15 y 16) en las mismas condiciones de PCR.

[Tabla 4]

Cebadores para la sustitución del promotor del gen <i>argCJBD</i>		
Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia (5'-3')
argC-L-5-BamHI	11	CGGGATCCGCAACGCTTGCGGTGAGAGA

Cebadores para la sustitución del promotor del gen <i>argCJBD</i>		
Nombre	SEQ ID NO.	Secuencia (5'-3')
argC-L-3-EcoRI	12	CCGGAATTCCTGGAAGTGGTCTGAAGAAGA
CJ7-5-EcoRI	13	CCGGAATTCGCCGGCATAGCCTACCGATG
CJ7-3-XbaI	14	TGCTCTAGAGATATCAGTGTTCCTTTTCG
argC-R-5-XbaI	15	TGCTCTAGAATGATAATGCATAACGTGTA
argC-R-3-SalI	16	ACGCGTCGACGCTTTCCGGAGGTGTTGTAC

El fragmento de sitio 5'-terminal preparado anteriormente de promotor (*argC-L*) se digirió con BamHI y EcoRI, el fragmento de la región del promotor CJ7 se digirió con EcoRI y XbaI, y el fragmento del sitio 3'-terminal del promotor (*argC-R*) se digirió con XbaI y SalI. Luego, se clonó cada uno de los productos de la PCR escindidos en el vector pDZ que también se digirió con BamHI y SalI, produciéndose así un vector de expresión pDZ-CJ7(arg) en el que el promotor de *argCJBD* estaba sustituido con el promotor CJ7.

El vector de expresión anteriormente preparado PDZ-CJ7(arg) se transformó en la cepa ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ y KCCM-10785P $\Delta argF \Delta NCgl1221$ a través de electroporación. A continuación, se cultivaron los transformantes con agitación en medio CM (30 °C, 8 horas) y se diluyó el cultivo celular en serie de 10^{-4} a 10^{-10} . A continuación, se sembraron y se cultivaron las muestras diluidas en una placa de BHIS que contenía 25 µg/ml de kanamicina y X-gal, dejando que las colonias crecieran.

Se aislaron las colonias de color blanco que aparecieron a baja frecuencia de la mayoría de las colonias azules, seleccionando de este modo solamente la cepa en la que el promotor *arg* fue sustituido con éxito con el promotor CJ7 a través de un entrecruzamiento doble.

La sustitución con éxito del promotor *argCJBD* en el cromosoma mediante el vector de expresión introducido PDZ-CJ7(arg) se confirmó mediante la realización de la PCR usando el ADN genómico de las cepas seleccionadas anteriormente como molde y cebadores (SEQ ID NO: 13 y 16) (28 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, hibridación durante 30 segundos a 55 °C y extensión durante 60 segundos a 72 °C). Por último, las cepas confirmadas se nombraron como ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ P(CJ7)-*argCJBD* y KCCM-10785P $\Delta argF \Delta NCgl1221$ P(CJ7)-*argCJBD*, correspondientemente.

Ejemplo 4: Mejora de la productividad de ornitina mediante la eliminación de los genes *argF* y *NCgl1221* y mejora del nivel de expresión de *argCJBD*

Ejemplo 4-1: Productividad de ornitina de la cepa derivada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Para examinar si la productividad de la ornitina se ve afectada por la eliminación de los genes *argF* y *NCgl1221* y la mejora del nivel de expresión de *argCJBD* en las cepas derivadas de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, se comparó la capacidad de producción de ornitina entre las cepas preparadas en los Ejemplos 2 y 3.

En detalle, se dispersó cada una de las cepas preparadas en los Ejemplos 2 y 3 (ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$, ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ /pHC139T-*argCJBD*(Cgl), ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ P(CJ7)-*argCJBD*) en una placa de CMA que contenía arginina 1 mM, y se cultivó a 37 °C durante 24 horas. Se inoculó cada una de las cepas cultivadas en 25 ml de medio de titulación (glucosa al 2 % (p/v), polipeptona al 1 % (p/v), extracto de levadura al 0,5 % (p/v), (NH₄)₂SO₄ al 0,5 % (p/v), urea al 0,15 % (p/v), KH₂PO₄ al 0,4 % (p/v), K₂HPO₄ al 0,8 % (p/v), MgSO₄ al 0,05 % (p/v), 100 µg/l de biotina y 1 mg/l de tiamina) que contenía arginina 1 mM, y luego se cultivó con agitación a 30 °C y 200 rpm durante 48 horas, y se determinó la concentración de ornitina producida en cada cultivo, y se comparó entre sí (Tabla 5). En este momento, la cepa ATCC 13032 sin modificación genómica se usó como grupo de control.

[Tabla 5]

Comparación de la productividad de ornitina en cepas derivadas de ATCC 13032	
Cepa	Contenido de ornitina (g/l)
ATCC 13032	0,0
ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$	6,0
ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ /pHC139T- <i>argCJBD</i> (Cgl)	6,4
ATCC 13032 $\Delta argF \Delta NCgl1221$ P(CJ7)- <i>argCJBD</i>	7,7

Como se muestra en la Tabla 5, la cepa con *argF* y *NCgl1221* eliminados produjeron 6,0 g/l de ornitina, que no fueron producidos por la cepa de tipo silvestre. Con respecto al aumento del nivel de expresión del gen *argCJBD*, cuando el gen *argCJBD* se introdujo en forma de vector, la concentración de la ornitina producida fue de 6,4 g/l, y cuando se reemplazó el promotor *argCJBD* en el cromosoma por CJ7, la concentración de la ornitina producida aumentó ligeramente hasta 7,7 g/l.

Ejemplo 4-2: Productividad de ornitina de la cepa derivada de *Corynebacterium glutamicum* KCCM-10785P

productora de glutamato

Para examinar si la productividad de la ornitina se ve afectada por la eliminación de los genes *argF* y *NCgl1221* y la mejora del nivel de expresión de *argCJBD* en la cepa de *Corynebacterium glutamicum* KCCM-10785P sobreproductora de glutamato, un precursor de la ornitina, se comparó la capacidad de producción de ornitina entre las cepas preparadas en los Ejemplos 2 y 3.

En detalle, cada una de las cepas preparadas en los Ejemplos 2 y 3 (KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221, KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221/pHC139T-argCJBD(Cgl), KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221 P(CJ7)-argCJBD) se inoculó de la misma manera que en el Ejemplo 4-1, y luego se cultivó con agitación a 30 °C y 200 rpm durante 48 horas, y se determinó la concentración de ornitina producida en cada cultivo, y se comparó entre sí (Tabla 6). En este momento, se usó una cepa KCCM-10785P sin modificación genética como grupo de control.

[Tabla 6]

Comparación de la productividad de ornitina en cepas derivadas de KCCM-10785P		
cepa	Contenido de glutamato (g/l)	Contenido de ornitina (g/l)
KCCM-10785P	15,5	0,0
KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221	5,2	7,6
KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221/pHC139T-argCJBD(Cgl)	4,8	7,9
KCCM-10785P Δ argF Δ NCgl1221 P(CJ7)-argCJBD	2,0	9,0

Como se muestra en la Tabla 6, las eliminaciones de *argF* y *NCgl1221* en la cepa sobreproductora de glutamato mostraron 7,6 g/l de producción de ornitina, que no fueron producidos por la cepa de tipo silvestre. Con respecto al aumento del nivel de expresión del gen *argCJBD*, cuando el gen *argCJBD* se introdujo en forma de vector, la concentración de la ornitina producida fue de 7,9 g/l, y cuando se reemplazó el promotor argCJBD en el cromosoma por CJ7, la concentración de la ornitina producida aumentó ligeramente hasta 9,0 g/l.

Por consiguiente, se puede ver que es posible aumentar la producción de ornitina a través de la mejora de la vía sintética de la ornitina mediante el aumento del nivel de expresión del gen *argCJBD*. Por lo tanto, el presente inventor denominó la cepa que tenía la capacidad de producción de ornitina más excelente preparada en el Ejemplo 3-2 "CC01-0061 (ATCC 13032 Δ argF Δ NCgl1221 P(CJ7)-argCJBD)", y la depositó en virtud del Tratado de Budapest en el Centro de Cultivos de Microorganismos de Corea, cuya dirección es Hongje-1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, el 24 de noviembre de 2010, con el número de acceso KCCM11137P.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Microorganismos para producir ornitina y proceso de producción de ornitina usando los mismos

<130> OPA11141PCT

<150> KR 10-2010-0124866

<151> 08-12-2010

<150> KR 10-2011-0130594

<151> 07-12-2011

<160> 29

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

cgggatcctg gccgtaccgg cgatttct 28

<210> 2

<211> 29

<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 2	
	cgcgctcgaca agtttgagtc cttatgcg	29
10	<210> 3	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 3	
	cgcgctcgacg acatgtccct tggctcaac	29
20	<210> 4	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 4	
30	tgctctagaa gtaatcacc tagtcttta cc	32
	<210> 5	
	<211> 31	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 5	
40	acgcgtcgac ccactcggcg ctgataata c	31
	<210> 6	
	<211> 31	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 6	
	acgcgtcgac ccactcggcg ctgataata c	31
	<210> 7	
	<211> 31	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
60	<400> 7	
	acgcgtcgac ctggaacaag aactctccag c	31
	<210> 8	
65	<211> 30	
	<212> ADN	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 5
 <400> 8
 ctagtctaga gggttggtgct tccactgctg30
 <210> 9
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 9
 cggggtaccc tctccagca gctctagctc 30
 <210> 10
 20 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 10
 30 tgctctagaa agtttgagtc cttatgcg 29
 <210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 11
 40 cgggatccgc aacgcttgcg gtgagaga 28
 <210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 12
 50 ccggaattcc tggaagtggc cgaagaaga 29
 <210> 13
 <211> 29
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 60 <400> 13
 ccggaattcg ccggcatagc ctaccgatg 29
 <210> 14
 65 <211> 29
 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 14	
	tgctctagag atatcagtgt ttcctttcg	29
10	<210> 15	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 15	
	tgctctagaa tgataatgca taacgtgta	29
20	<210> 16	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 16	
30	acgcgtcgcac gctttccgga ggtgtgtac	30
	<210> 17	
	<211> 960	
	<212> ADN	
35	<213> argF	
	<400> 17	

ES 2 703 256 T3

atgacttcac aaccacaggt tcgccatttt ctggctgatg atgatctcac ccctgcagag	60
caggcagagg ttttgaccct agccgcaaag ctcaaggcag cgccgttttc ggagcgtcca	120
ctcgagggac caaagtccgt tgcagttctt tttgataaga cttcaactcg tactcgcttc	180
tccttcgacg cgggcatcgc tcatttgggt ggacacgcca tcgtcgtgga ttccggtagc	240
tcacagatgg gtaagggcga gtccctgcag gacaccgcag ctgtattgtc ccgctacgtg	300
gaagcaattg tgtggcgcac ctacgcacac agcaatttcc acgccatggc ggagacgtcc	360
actgtgccgc tgggtgaactc cttgtccgat gatctgcacc catgccagat tctggctgat	420
ctgcagacta tcgtggaaaa cctcagccct gaagaaggcc cagcaggcct taagggtaag	480
aaggctgtgt acctgggcga tggcgacaac aacatggcca actcctacat gattggcttt	540
gccaccgcgg gcatggatat ttccatcatc gtcctgaag ggttccagcc tcgtgcggaa	600
ttcgtggagc gcgcggaaaa gcgtggccag gaaaccggcg cgaaggttgt tgtcacccgac	660
agcctcgacg aggttgccgg cgccgatggt gtcatcaccg atacctgggt atccatgggt	720
atggaaaacg acggcatcga tcgcaccaca ctttcgttc cttaccaggt caacgatgag	780
gtcatggcga aagctaacga cggcgccatc ttcctgcact gccttcctgc ctaccgtggc	840
aaagaagtgg cagcctccgt gattgatgga ccagcgtcca aagttttcga tgaagcagaa	900
aaccgcctcc acgctcagaa agcactgctg gtgtggctgc tggccaacca gccgaggtaa	960

5
 <210> 18
 <211> 319
 <212> PRT
 <213> ArgF
 <400> 18

ES 2 703 256 T3

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

ES 2 703 256 T3

<210> 19
<211> 1602
<212> ADN
<213> NCgl1221

5

<400> 19

atgatttttag gcgtagcccat tcaatatttg ctctattcat tgtggaattg gattgtcgat	60
accggttttg atgtagcaat taccctgggtc ttggcgtttt tgattccacg tatcggtccga	120
ctggccatgc gtattatcaa gcgcccagtg gaggctgcag ccgatgcgga caccactaag	180
aaccagctcg cggttcgcccg cggttggcggt tatatcgccg aaattgtggc gtttttcatg	240
cttgccgtct ccgcatgca ggcttttgggt ttctctctcg cgggctgtgc gattccggca	300
accattgcgt cagctgccat tggccttgggt ggcagtcga ttgttgcgga cttcttggcc	360
ggatttttca tcctgacgga aaagcaattc ggcgtgggtg actgggtgcg ttttgagggc	420
aacggcatcg ttgtcgaagg caccgtcatt gagatcacca tgcgcgcgac caaaattcgc	480
acgattgcac aagagaccgt gatcatcccc aactccacgg cgaaagtgtg catcaacaat	540
tctaataact ggtcgcgtgc ggttgtcggt attccgatcc ccattgtggg ttctgaaaac	600
atcacagatg tcatcgccg ctctgaagct ggcactcgtc ggcacttgg ccaggagaaa	660
atcgccaccg aaatcctcgg tgaactcgat gtgcaccacg ccacggaagt caccgcccca	720
acggtggtcg gcatgccgtg gatggtcacc atgcgtttcc tcgtgcaagt caccgccggc	780
aatcaatggc tggtcgaacg cgccatccgc acagaaatca tcagcgaatt ctgggaagaa	840
tacggcagcg caaccactac atcggaacc ctcatcgatt ccttacacgt tgagcatgaa	900
gagccaaaga cctcgcttat cgacgcctcc cccaggtcc ttaaggaaacc gaagccggag	960
gctgcggcga cggttgcac gctagctgca tcctctaacg acgatgcaga caatgcagac	1020
gcctcggatga tcaatgcagg caatccagag aaggaaactg attccgatgt gctggaacaa	1080
gaactctcca gcgaagaacc ggaagaaaca gcaaaaccag atcactctct ccgaggcttc	1140
ttccgcactg attactacc aaatcggtgg cagaagatcc tgcgttttgg cggacgtgtc	1200
cgcatgagca cgtccctggt gttgggtgcg ctgctcttgc tgtcactatt taaggatcatg	1260
actgtggaac caagtgagaa ttggcaaaac tccagtggtg ggctgtcacc aagcactgcc	1320
acctcaactg cggtgaccac ctccgaaact tccgcgccag taagcacgcc ttcgatgaca	1380
gtgcccacta cggtggagga gacccaacg atggaatcta acgtcgaaac gcagcaggaa	1440
acctcaaccc ctgcaaccgc aacgccccag cgagccgaca ccacgaacc gaccgaggaa	1500
gccacgtcgc aggaggaaac gactgcgtcg cagacgcagt ctccagcagt ggaagcacca	1560
accgcggtcc aagagacagt tgcgccgacg tccaccctt ag	1602

ES 2 703 256 T3

<210> 20
<211> 533
<212> PRT
<213> NCgl1221

5

<400> 20

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

ES 2 703 256 T3

Ile	Leu	Gly	Glu	Leu	Asp	Val	His	Pro	Ala	Thr	Glu	Val	Thr	Pro	Pro	225	230	235	240
Thr	Val	Val	Gly	Met	Pro	Trp	Met	Val	Thr	Met	Arg	Phe	Leu	Val	Gln	245	250	255	
Val	Thr	Ala	Gly	Asn	Gln	Trp	Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Ile	Arg	Thr	Glu	260	265	270	
Ile	Ile	Ser	Glu	Phe	Trp	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ala	Thr	Thr	Thr	Ser	275	280	285	
Gly	Thr	Leu	Ile	Asp	Ser	Leu	His	Val	Glu	His	Glu	Glu	Pro	Lys	Thr	290	295	300	
Ser	Leu	Ile	Asp	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Leu	Lys	Glu	Pro	Lys	Pro	Glu	305	310	315	320
Ala	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Ser	Asn	Asp	Asp	Ala	325	330	335	
Asp	Asn	Ala	Asp	Ala	Ser	Val	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Pro	Glu	Lys	Glu	340	345	350	
Leu	Asp	Ser	Asp	Val	Leu	Glu	Gln	Glu	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Pro	Glu	355	360	365	
Glu	Thr	Ala	Lys	Pro	Asp	His	Ser	Leu	Arg	Gly	Phe	Phe	Arg	Thr	Asp	370	375	380	
Tyr	Tyr	Pro	Asn	Arg	Trp	Gln	Lys	Ile	Leu	Ser	Phe	Gly	Gly	Arg	Val	385	390	395	400
Arg	Met	Ser	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	405	410	415	
Phe	Lys	Val	Met	Thr	Val	Glu	Pro	Ser	Glu	Asn	Trp	Gln	Asn	Ser	Ser	420	425	430	
Gly	Trp	Leu	Ser	Pro	Ser	Thr	Ala	Thr	Ser	Thr	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	435	440	445	
Glu	Thr	Ser	Ala	Pro	Val	Ser	Thr	Pro	Ser	Met	Thr	Val	Pro	Thr	Thr	450	455	460	
Val	Glu	Glu	Thr	Pro	Thr	Met	Glu	Ser	Asn	Val	Glu	Thr	Gln	Gln	Glu	465	470	475	480
Thr	Ser	Thr	Pro	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Gln	Arg	Ala	Asp	Thr	Ile	Glu	485	490	495	
Pro	Thr	Glu	Glu	Ala	Thr	Ser	Gln	Glu	Glu	Thr	Thr	Ala	Ser	Gln	Thr	500	505	510	
Gln	Ser	Pro	Ala	Val	Glu	Ala	Pro	Thr	Ala	Val	Gln	Glu	Thr	Val	Ala	515	520	525	
Pro	Thr	Ser	Thr	Pro												530			

<210> 21
<211> 4733

ES 2 703 256 T3

<212> ADN
<213> operón de *argCJBD*

<400> 21

5

ggctacttcc	gaggaatctt	ccgcagttga	agagccagca	gtggaagctc	ctgtggaaga	60
ggctccagtc	gaggcacctg	ttgagcaggc	acctgtcgtg	gagcaagctc	cagttgagca	120
ggctccggca	ccggttcagg	aagcacctgc	accagtcgag	caggctccag	ctccagttca	180
ggaagcacct	gcagctgacg	cgccacctgc	acttccaggt	ggtggcggcg	gacacgctgg	240
ctactaaaaa	ttcatgcttt	tacccacttg	cagtttttagc	tgtaggtggg	tttttgcatg	300
tctaaccctg	cttttatgca	cacccccgca	atgaatcaaa	aatttatgca	tgaataattt	360
gcatgatcat	gcataacgtg	tatggtgtaa	ctatgacaat	caaggttgca	atcgagaggag	420
ccagtggata	tgccggcgga	gaaatccttc	gtctcctttt	aggccatcca	gcttatgcat	480
ctggtgaact	agaaatcgga	gcactcaccg	cggcatcaac	cgcaggcagc	acgctcgggtg	540
aattgatgcc	acacattccg	cagttggcgg	atcgtgttat	tcaagacacc	acagctgaaa	600
ctctagccgg	tcatgatgtc	gtattttctag	gacttccaca	cggattctct	gcagaaattg	660
cacttcagct	cggaccagat	gtcacagtga	ttgactgtgc	agctgacttt	cgtctgcaaa	720
atgctgcaga	ttgggagaag	ttctacggct	cagagcacca	gggaacatgg	ccttatggca	780
ttccagaaat	gccaggacac	cgcgaggctc	ttcgtggtgc	taagcgtgta	gcagtgccag	840
gatgtttccc	aaccggtgca	accttggttc	ttcttcctgc	ggttcaagcg	ggacttatcg	900
agccagatgt	ttccgtagtg	tccatcaccg	gogtatcagg	tgcaggtaag	aaagcatctg	960
ttgcactact	tggctcggaa	accatgggtt	cactcaaggc	gtacaacacc	tccggaaagc	1020
accgccacac	cccggaaatt	gcccagaacc	tggcggaagt	cagcgacaag	ccagtcaagg	1080
tgagcttcac	cccagtgttt	gcaccgttac	ctcgcggaat	tctcaccact	gcaaccgcac	1140
ctttgaaaga	aggcgttacc	gcagaacagg	ctcgcgcagt	atatgaagag	ttctatgcac	1200
aggaaacctt	cgtgcatgtt	cttccagaag	gtgcacagcc	acaaacccaa	gcagttcttg	1260
gctccaacat	gtgccacgtg	caggtagaaa	ttgatgagga	agcaggcaaa	gtccttgтта	1320
cctccgcaat	cgataacctc	accaagggaa	ctgccggcgc	cgtgttcag	tgcatgaact	1380
taagcgttgg	ttttgatgag	gcagcaggcc	tgccacaggt	cggcgtcgca	ccttaaattgg	1440
cagaaaaagg	cattaccgcg	ccgaaaggct	tcgttgcttc	tgcaacgacc	gcgggtatta	1500
aagcttctgg	caatcctgac	atggcgttgg	tggttaacca	gggtccagag	ttttccgcag	1560
cggccgtgtt	tacacgtaac	cgagttttcg	cagcgcctgt	gaaggtgagc	cgagagaacg	1620
ttgctgatgg	ccagatcagg	gctgttttgt	acaacgctgg	taatgctaata	gcgtgtaattg	1680
gtctgcaggg	tgagaaggat	gctcgtgagt	ctgtttctca	tctagctcaa	aatttgggct	1740

ES 2 703 256 T3

tggaggattc	cgatattggt	gtgtgttcca	ctggtcttat	tggtgagttg	cttccgatgg	1800
ataagctcaa	tgcaggtatt	gatcagctga	ccgctgaggg	cgctttgggt	gacaatgggtg	1860
cagctgctgc	caaggcgatc	atgaccactg	acacgggtgga	taaggaaacc	gtcgtgtttg	1920
ctgatggttg	gactgtcggc	ggaatgggca	agggcgtggg	catgatggcg	ccgtctcttg	1980
ccaccatgct	ggtctgcttg	accactgatg	catccgttac	tcaggaaatg	gctcagatcg	2040
cgctggctaa	tgtacggcc	gttacgtttg	acaccctgga	tattgatgga	tcaacctcca	2100
ccaatgacac	cgtgttcctg	ctggcatctg	gcgctagcgg	aatcacccca	actcaggatg	2160
aactcaacga	tgcggtgtac	gcagcttggt	ctgatatcgc	agcgaagctt	caggctgatg	2220
cagagggtgt	gaccaagcgc	gttgctgtga	cagtgggtggg	aaccaccaac	aacgagcagg	2280
cgattaatgc	ggctcgcact	gttgctcgtg	acaatttggt	caagtgcgca	atgtttggat	2340
ctgatccaaa	ctggggtcgc	gtgttggtcg	cagtcggcat	ggctgatgct	gatatggaac	2400
cagagaagat	ttctgtgttc	ttcaatggtc	aagcagtatg	ccttgattcc	actggcgctc	2460
ctggtgctcg	tgagggtggat	ctttccggcg	ctgacattga	tgtccgaatt	gattttgggca	2520
ccagtgggga	aggccaggca	acagttcgaa	ccactgacct	gagcttctcc	tacgtggaga	2580
tcaactccgc	gtacagctct	taaatgaatg	acttgatcaa	agatttaggc	tctgagggtgc	2640
gcgcaaagt	cctcgctgag	gcgttgccat	ggttgacgca	cttccgcgac	aagattgttg	2700
tcgtgaaata	tggcggaaac	gccatgggtg	atgatgatct	caaggctgct	tttgctgccg	2760
acatggtctt	cttgccgacc	gtgggcgcaa	aaccagtggg	ggtgcacggg	ggtggacctc	2820
agatttctga	gatgctaaac	cgtgtgggtc	tccagggcga	gttcaagggt	ggtttccgtg	2880
tgaccactcc	tgaggctcatg	gacattgtgc	gcatgggtgct	ctttggtcag	gtcggtcgcg	2940
atttagttgg	tttgatcaac	tctcatggcc	cttacgctgt	gggaacctcc	ggtgaggatg	3000
ccggcctgtt	taccgcgcag	aagcgcagtg	tcaacatcga	tggcgtacct	actgatattg	3060
gtttggtcgg	agacatcatt	aatgtcgatg	cctcttcctt	gatggatatc	atcgaggccg	3120
gtcgcattcc	tgtggtctct	acgattgtc	caggcgaaga	cggccagatt	tacaacatta	3180
acgccgatac	cgcagcaggt	gctttggctg	cagcgattgg	tgcagaacgc	ctgctggttc	3240
tcaccaatgt	ggaaggctctg	tacaccgatt	ggcctgataa	gagctcactg	gtgtccaaga	3300
tcaaggccac	cgagctggag	gccattcttc	cgggacttga	ttccggcatg	attccaaaga	3360
tggagtcttg	cttgaacgcg	gtgcgtgggg	gagtaagcgc	tgctcatgtc	attgacggcc	3420
gcatcgcgca	ctcgggtgttg	ctggagcttt	tgaccatggg	tgggaattggc	acgatggtgc	3480
tgccggatgt	ttttgatcgg	gagaattatc	ctgaaggcac	cgtttttaga	aaagacgaca	3540
aggatgggga	actgtaaagt	agcacgctgg	aaacttgggc	acaggtcatt	attaatacgt	3600
acggcacccc	accagttgag	ctggtgtccg	gcaagggcgc	aaccgtcact	gatgaccagg	3660

gcaatgtcta catcgacttg ctcgcgggca tgcagtcaa cgcgttgggc cacgcccacc	3720
cggcgatcat cgaggcggtc accaaccaga tgggccaact tggtcacgtc tcaaacttgt	3780
tcgcatccag gcccgtcgtc gaggtcgccg aggagctcat caagcgtttt tcgcttgacg	3840
acgccaccct cggcgcgcaa acccggtttt tcttctgcaa ctcgggcgcc gaagcaaacg	3900
aggctgcttt caagattgca cgcttgactg gtcgttcccg gattctggct gcagttcatg	3960
gtttccacgg ccgcaccatg ggttccctcg cgctgactgg ccagccagac aagcgtgaag	4020
cgttcctgcc aatgccaaagc ggtgtggagt tctaccctta cggcgacacc gattacttgc	4080
gcaaaatggt agaaaccaac ccaacggatg tggctgctat cttcctcgag ccaatccagg	4140
gtgaaacggg cgttgttcca gcacctgaag gattcctcaa ggcagtgcgc gagctgtgcg	4200
atgagtacgg catcttgatg atcaccgatg aagtcacagc tggcgttggc cgtaccggcg	4260
atttctttgc acatcagcac gatggcgttg ttcccgatgt ggtgaccatg gccaagggac	4320
ttggcgggcg tcttcccatc ggtgcttggt tggccactgg ccgtgcagct gaattgatga	4380
ccccaggcaa gcacggcacc actttcggtg gcaaccagc tgccttgca gctgccaagg	4440
cagtgtgtgc tgttgtcgat gacgctttct gcgcagaagt tgcccgaag ggcgagctgt	4500
tcaaggaact tcttgccaag gttgacggcg ttgtagacgt ccgtggcagg ggcttgatgt	4560
tgggcgtggt gctggagcgc gacgtcgcaa agcaagctgt tcttgatggt tttaaacacg	4620
gcgttatattt gaatgcaccg gcggacaaca ttatcgttt gaccccgccg ctggtgatca	4680
ccgacgaaga aatcgagac gcagtcaagg ctattgccga gacaatcgca taa	4733

5

<210> 22
 <211> 1074
 <212> ADN
 <213> argC

10

<400> 22

ES 2 703 256 T3

atgatcatgc ataacgtgta tgggtgtaact atgacaatca aggttgcaat cgcaggagacc	60
agtggatatg ccggcgggaga aatccttcgt ctcccttttag gccatccagc ttatgcatct	120
ggtgaactag aaatcggagc actcaccgcg gcatcaaccg caggcagcac gctcggtgaa	180
ttgatgccac acattccgca gttggcggat cgtgttattc aagacaccac agctgaaaact	240
ctagccggtc atgatgtcgt atttctagga cttccacacg gattctctgc agaaattgca	300
cttcagctcg gaccagatgt cacagtgatt gactgtgcag ctgactttcg tctgcaaaat	360
gctgcagatt gggagaagtt ctacggctca gagcaccagg gaacatggcc ttatggcatt	420
ccagaaatgc caggacaccg cgaggctctt cgtggtgcta agcgtgtagc agtgccagga	480
tgtttcccaa ccggtgcaac cttggctctt cttcctgcgg ttcaagcggg acttatcgag	540
ccagatgttt ccgtagtgtc catcaccggc gtatcagggtg caggtaagaa agcatctggt	600
gcactacttg gctcggaaac catgggttca ctcaaggcgt acaacacctc cggaaaagcac	660
cgccacaccc cggaaattgc ccagaacctc ggcgaagtca gcgacaagcc agtcaagggtg	720
agcttcaccc cagtgccttg accgttacct cgcggaattc tcaccactgc aaccgcacct	780
ttgaaagaag gcgttacgc agaacaggct cgcgcagtat atgaagagtt ctatgcacag	840
gaaaccttcg tgcattgttct tccagaaggc gcacagccac aaaccaagc agttcttggc	900
tccaacatgt gccacgtgca ggtagaaatt gatgaggaag caggcaaagt ccttggtacc	960
tccgcaatcg ataacctcac caagggaact gccggcgccg ctgttcagtg catgaactta	1020
agcgttggtt ttgatgaggc agcaggcctg ccacaggctg gcgtcgcacc ttaa	1074

<210> 23
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> ArgC

<400> 23

ES 2 703 256 T3

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

ES 2 703 256 T3

Gly	Ser	Leu	Lys	Ala	Tyr	Asn	Thr	Ser	Gly	Lys	His	Arg	His	Thr	Pro
210						215					220				
Glu	Ile	Ala	Gln	Asn	Leu	Gly	Glu	Val	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Lys	Val
225					230					235					240
Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Leu	Pro	Arg	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr
				245					250					255	
Ala	Thr	Ala	Pro	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Thr	Ala	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala
			260					265					270		
Val	Tyr	Glu	Glu	Phe	Tyr	Ala	Gln	Glu	Thr	Phe	Val	His	Val	Leu	Pro
	275						280					285			
Glu	Gly	Ala	Gln	Pro	Gln	Thr	Gln	Ala	Val	Leu	Gly	Ser	Asn	Met	Cys
290						295					300				
His	Val	Gln	Val	Glu	Ile	Asp	Glu	Glu	Ala	Gly	Lys	Val	Leu	Val	Thr
305					310					315					320
Ser	Ala	Ile	Asp	Asn	Leu	Thr	Lys	Gly	Thr	Ala	Gly	Ala	Ala	Val	Gln
				325					330					335	
Cys	Met	Asn	Leu	Ser	Val	Gly	Phe	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	Leu	Pro	Gln
			340					345					350		
Val	Gly	Val	Ala	Pro											
			355												

<210> 24
 <211> 1167
 <212> ADN
 <213> argJ

<400> 24

ES 2 703 256 T3

atggcagaaa aaggcattac cgcgccgaaa ggcttcggtg cttctgcaac gaccgcgggt	60
attaaagctt ctggcaatcc tgacatggcg ttggtgggta accaggggtcc agagttttcc	120
gcagcggccg tgtttacacg taaccgagtt ttgcgacgc ctgtgaaggt gagccgagag	180
aacgttgctg atggccagat cagggctggt ttgtacaacg ctggtaatgc taatgcgtgt	240
aatggtctgc agggtgagaa ggatgctcgt gagtctgttt ctcatctagc tcaaaatttg	300
ggcttgaggg attccgatat tgggtgtgtg tccactggtc ttattggtga gttgcttccg	360
atggataagc tcaatgcagg tattgatcag ctgaccgctg agggcgcttt gggtgacaat	420
ggtgcagctg ctgccaaggc gatcatgacc actgacacgg tggataagga aaccgtcgtg	480
tttgcgtgat gttggactgt cggcggaatg ggcaagggcg tgggcatgat ggcgccgtct	540
cttgccacca tgctgggtctg cttgaccact gatgcatccg ttactcagga aatggctcag	600
atcgcgctgg ctaatgctac ggccgttacg tttgacaccc tggatattga tggatcaacc	660
tccaccaatg acaccgtgtt cctgctggca tctggcgcta gcggaatcac cccaactcag	720
gatgaactca acgatgcggt gtacgcagct tgttctgata tcgcagcgaa gcttcaggct	780
gatgcagagg gtgtgaccaa gcgcgttgct gtgacagtgg tgggaaccac caacaacgag	840
cagggcatta atgcggctcg cactgttgct cgtgacaatt tgttcaagtg cgcaatgttt	900
ggatctgatc caaactgggg tcgcgtgttg gctgcagtcg gcatggctga tgctgatatg	960
gaaccagaga agatttctgt gttcttcaat ggtcaagcag tatgccttga ttccactggc	1020
gctcctgggtg ctcgtgaggt ggatctttcc ggcgctgaca ttgatgtccg aattgatttg	1080
ggcaccagtg gggaaggcca ggcaacagtt cgaaccactg acctgagctt ctctacgtg	1140
gagatcaact ccgcgtacag ctcttaa	1167

<210> 25
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> ArgJ

 <400> 25

5

ES 2 703 256 T3

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

ES 2 703 256 T3

Thr	Val	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Pro	Thr	Gln
225					230					235					240
Asp	Glu	Leu	Asn	Asp	Ala	Val	Tyr	Ala	Ala	Cys	Ser	Asp	Ile	Ala	Ala
			245						250					255	
Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ala	Glu	Gly	Val	Thr	Lys	Arg	Val	Ala	Val	Thr
			260					265					270		
Val	Val	Gly	Thr	Thr	Asn	Asn	Glu	Gln	Ala	Ile	Asn	Ala	Ala	Arg	Thr
		275					280					285			
Val	Ala	Arg	Asp	Asn	Leu	Phe	Lys	Cys	Ala	Met	Phe	Gly	Ser	Asp	Pro
	290					295					300				
Asn	Trp	Gly	Arg	Val	Leu	Ala	Ala	Val	Gly	Met	Ala	Asp	Ala	Asp	Met
305					310					315					320
Glu	Pro	Glu	Lys	Ile	Ser	Val	Phe	Phe	Asn	Gly	Gln	Ala	Val	Cys	Leu
				325					330					335	
Asp	Ser	Thr	Gly	Ala	Pro	Gly	Ala	Arg	Glu	Val	Asp	Leu	Ser	Gly	Ala
			340					345					350		
Asp	Ile	Asp	Val	Arg	Ile	Asp	Leu	Gly	Thr	Ser	Gly	Glu	Gly	Gln	Ala
		355					360					365			
Thr	Val	Arg	Thr	Thr	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Tyr	Val	Glu	Ile	Asn	Ser
	370					375					380				
Ala	Tyr	Ser	Ser												
385															

<210> 26
 <211> 954
 <212> ADN
 <213> argB

<400> 26

ES 2 703 256 T3

atgaatgact tgatcaaaga tttaggctct gaggtgcgcg caaatgtcct cgctgaggcg	60
ttgccatggt tgcagcactt ccgcgacaag attggtgtcg tgaaatatgg cggaaacgcc	120
atggtggatg atgatctcaa ggctgctttt gctgccgaca tggctcttctt gcgcaccgtg	180
ggcgcaaaac cagtgggtgg gcacgggtgg ggacctcaga tttctgagat gctaaaccgt	240
gtgggtctcc agggcgagtt caaggggtgg ttccgtgtga ccactcctga ggtcatggac	300
attgtgcgca tgggtgctctt tggtcaggtc ggtcgcgatt tagttggttt gatcaactct	360
catggccctt acgctgtggg aacctccggt gaggatgccg gcctgtttac cgcgcagaag	420
cgcatggtca acatcgatgg cgtacccact gatattggtt tggtcggaga catcattaat	480
gtcgatgcct cttccttgat ggatatcatc gaggcgggtc gcattcctgt ggtctctacg	540
attgctccag gcgaagacgg ccagatttac aacattaacg ccgataccgc agcaggtgct	600
ttggctgcag cgattggtgc agaacgcctg ctggttctca ccaatgtgga aggtctgtac	660
accgattggc ctgataagag ctactggtg tccaagatca aggccaccga gctggaggcc	720
attcttccgg gacttgattc cggcatgatt ccaaagatgg agtcttgctt gaacgcggtg	780
cgtgggggag taagcgctgc tcatgtcatt gacggccgca tcgcgcactc ggtgttgctg	840
gagcttttga ccatgggtgg aattggcacg atggtgctgc cggatgtttt tgatcgggag	900
aattatcctg aaggcaccgt ttttagaaaa gacgacaagg atggggaact gtaa	954

<210> 27
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> ArgB

5

<400> 27

ES 2 703 256 T3

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

ES 2 703 256 T3

<211> 1176
<212> ADN
<213> argD

5 <400> 28

```

atgagcacgc tggaaacttg gccacaggtc attattaata cgtacggcac cccaccagtt      60
gagctggtgt ccggcaaggg cgcaaccgtc actgatgacc agggcaatgt ctacatcgac      120
ttgctcgcgg gcatcgcagt caacgcgttg ggccacgccc acccggcgat catcgaggcg      180
gtcaccaacc agatcggcc aacttggtcac gtctcaaact tgttcgcatc caggcccgtc      240
gtcgagggtcg ccgaggagct catcaagcgt ttttcgcttg acgacgccac cctcgccgcg      300
caaaccgggg ttttcttctg caactcgggc gccgaagcaa acgaggctgc tttcaagatt      360
gcacgcttga ctggtcgttc ccggattctg gctgcagttc atggttttcca cggccgcacc      420
atgggttccc tcgcgctgac tggccagcca gacaagcgtg aagcgttcct gccaatgcca      480
agcgggtgtg agttctaccc ttacggcgac accgattact tgcgcaaat ggtagaaacc      540
aaccacaagg atgtggctgc tatcttcctc gagccaatcc agggtgaaac gggcgttggt      600
ccagcacctg aaggattcct caaggcagtg cgcgagctgt gcgatgagta cggcatcttg      660
atgatcacgg atgaagtcca gactggcgtt ggccgtaccg gcgatttctt tgcacatcag      720
cacgatggcg ttgttccoga tgtggtgacc atggccaagg gacttggcgg cggctcttccc      780
atcggtgctt gtttgggcac tggccgtgca gctgaattga tgaccccagg caagcacggc      840
accactttcg gtggcaaccc agttgcttgt gcagctgcc aaggcagtgt gtctgttgtc      900
gatgacgctt tctgcgcaga agttgcccgc aagggcgagc tgttcaagga acttcttgcc      960
aaggttgacg gcgttgtaga cgtccgtggc aggggcttga tgttgggcgt ggtgctggag     1020
cgcgacgtcg caaagcaagc tgttcttgat ggttttaagc acggcgttat tttgaatgca     1080
ccggcgggaca acattatccg tttgaccccg ccgctggtga tcaccgacga agaaatcgca     1140
gacgcagtca aggctattgc cgagacaatc gcataa                                1176

```

<210> 29
<211> 391
<212> PRT
<213> ArgD

10

<400> 29

15

ES 2 703 256 T3

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

ES 2 703 256 T3

Lys Val Asp Gly Val Val Asp Val Arg Gly Arg Gly Leu Met Leu Gly
 325 330 335

Val Val Leu Glu Arg Asp Val Ala Lys Gln Ala Val Leu Asp Gly Phe
 340 345 350

Lys His Gly Val Ile Leu Asn Ala Pro Ala Asp Asn Ile Ile Arg Leu
 355 360 365

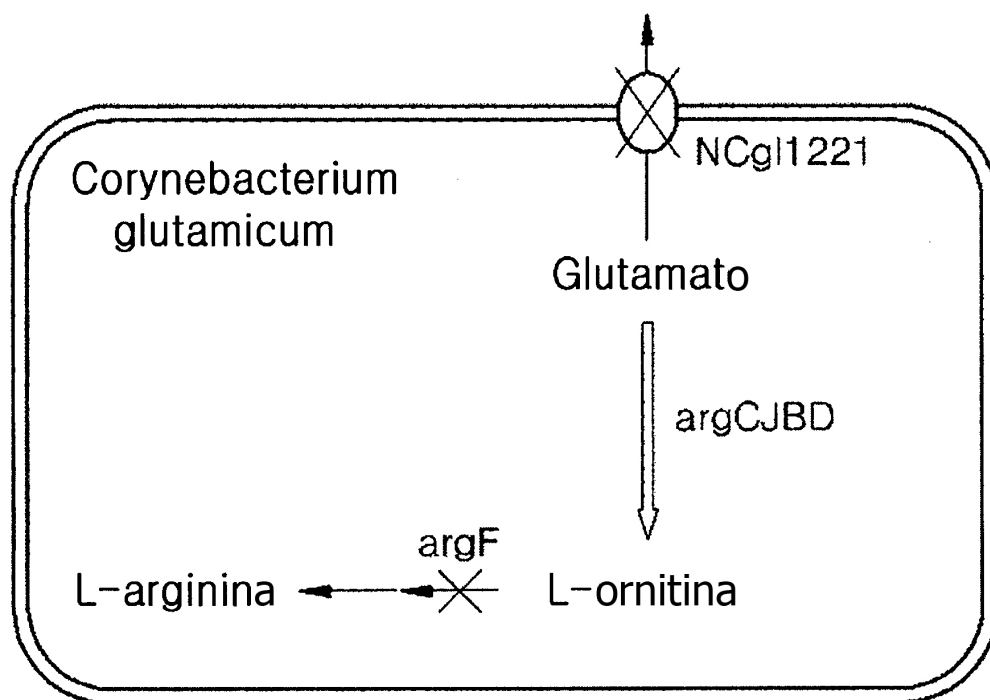
Thr Pro Pro Leu Val Ile Thr Asp Glu Glu Ile Ala Asp Ala Val Lys
 370 375 380

Ala Ile Ala Glu Thr Ile Ala
 385 390

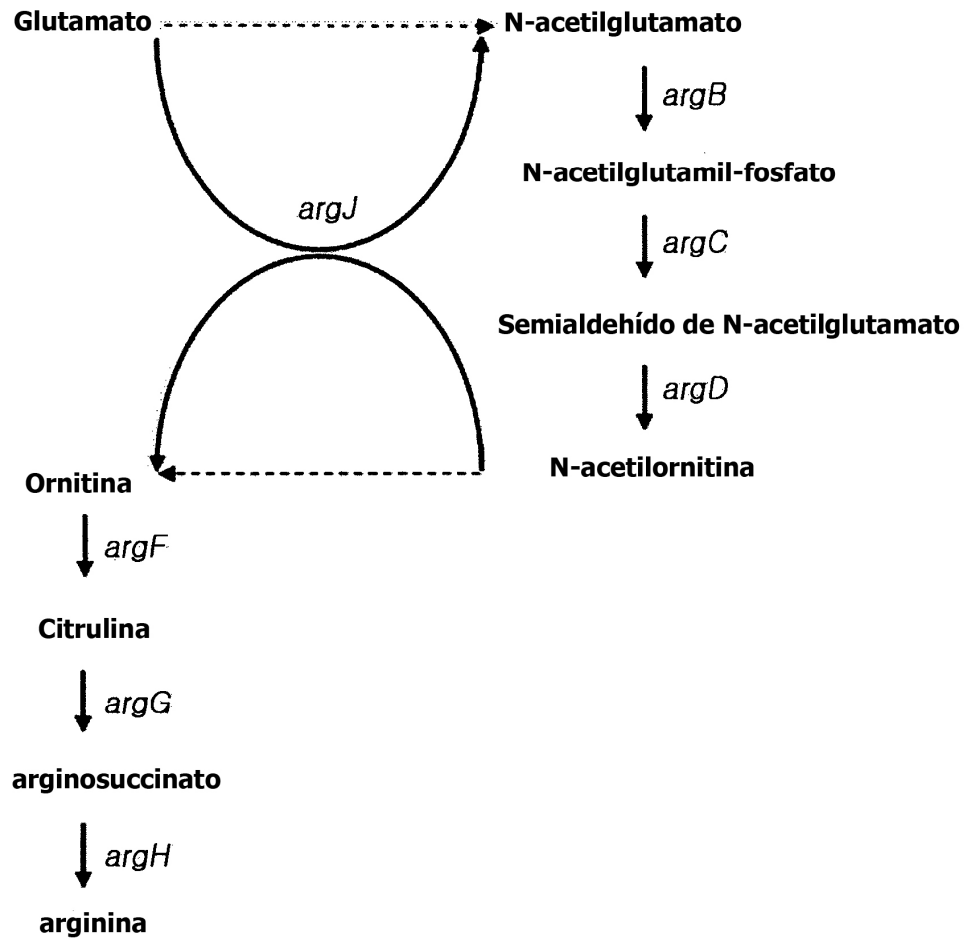
REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo que pertenece a *Corynebacterium* sp., que tiene una capacidad mejorada para producir ornitina en comparación con su cepa parental, en el que se modifican las actividades de la ornitina carbamoiltransferasa y una proteína que participa en la exportación del glutamato (NCgl1221) para que sean atenuadas mediante una eliminación parcial o completa de los genes que codifican la ornitina carbamoil transferasa y NCg11221, en comparación con las actividades de la ornitina carbamoiltransferasa y NCg11221 que posee la cepa parental en su estado nativo, en el que la cepa parental no tiene ninguna modificación en las actividades de la ornitina carbamoiltransferasa ni de NCg11221.
2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la ornitina carbamoiltransferasa tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 70 % o más de homología con la secuencia.
3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que participa en la exportación del glutamato tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 70 % o más de homología con la secuencia.
4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las actividades de la acetil gamma-glutamyl-fosfato reductasa (ArgC), la acetilglutamato sintasa o la ornitina acetiltransferasa (argJ), la acetilglutamato quinasa (ArgB) y la acetilornitina aminotransferasa (ArgD) se potencian aumentando el número de copias de polinucleótidos que codifican las proteínas, en comparación con las actividades de las enzimas que posee la cepa parental en su estado nativo.
5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que ArgC, ArgJ, ArgB y ArgD tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, 25, 27 y 29, respectivamente, o una secuencia de aminoácidos que tiene un 70 % o más de homología con las respectivas secuencias.
6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo que pertenece a *Corynebacterium* sp. es *Corynebacterium glutamicum*.
7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo que pertenece a *Corynebacterium* sp. es *Corynebacterium glutamicum* (KCCM11137P).
8. Un método de producción de ornitina, que comprende las etapas de:
 - (i) cultivar el microorganismo de la reivindicación 1; y
 - (ii) recuperar la ornitina del microorganismo cultivado o del cultivo.

[Figura 1]



[FIG. 2]



[FIG. 3]

