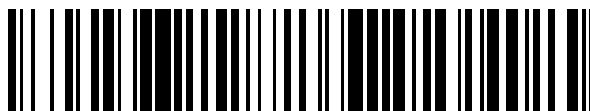


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 405**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2015 PCT/EP2015/058280**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15165740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2015 E 15717860 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3137492**

54 Título: **Procedimiento para la producción de L-aminoácidos en corinebacterias bajo empleo de un sistema que disocia glicina**

30 Prioridad:

30.04.2014 EP 14166649

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

25.03.2019

73 Titular/es:

**EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**OCHROMBEL, INES;
BATHE, BRIGITTE y
HASSELMEYER, MARLEEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 705 405 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 la producción de L-aminoácidos en corinebacterias bajo empleo de un sistema que disocia glicina

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de L-aminoácidos en corinebacterias, en el que se emplea un sistema que disocia glicina.

Los procedimientos para la producción de L-aminoácidos en los que se emplean bacterias de la especie *Corynebacterium* son conocidos por el especialista.

10 Aunque son conocidos numerosos tipos de *Corynebacterium*, en este procedimiento se emplean habitualmente bacterias del tipo *Corynebacterium glutamicum*, ya que ésta se ha mostrado especialmente ventajosa para la producción de L-aminoácidos.

15 Además se descubrió que, mediante el empleo de un sistema que disocia glicina (GCV), se puede aumentar ulteriormente el rendimiento en L-aminoácido, ya que mediante el sistema que disocia glicina se puede evitar sensiblemente la formación del producto secundario no deseado L-glicina. La eliminación de la formación de L-glicina o bien de la degradación de L-glicina excedente es de especial importancia en especial en el caso de producción de L-metionina, ya que en este caso se forma L-glicina como producto equimolar.

Un sistema que disocia glicina está constituido por varias subunidades, esto es, las subunidades GcvP, GcvT y GcvH. Se trata de un complejo multienzimático que cataliza la descarboxilación y desaminación oxidativa de glicina para dar dióxido de carbono, iones amonio y tetrahidrofolato de N⁵⁻¹⁰-metileno.

20 En el caso de la glicina-deshidrogenasa GcvP se trata de una descarboxilasa que contiene piridoxal fosfato, que libera dióxido de carbono y deja el compuesto de aminometilo unido a piridoxal fosfato.

En el caso de la proteína H-GcvH se trata de una aminometiltransferasa que contiene una lipoamida.

La enzima GcvT cataliza el ataque nucleófilo de la aminometillipoamida mediante tetrahidrofolato bajo formación de tetrahidrofolato de N⁵⁻¹⁰-metileno y liberación de iones amónicos, quedando la lipoamida completamente reducida unida a GcvH.

25 Los sistemas que disocian glicina no se presentan en todas las corinebacterias, sino que hasta el momento se han descrito solo para muy pocas corinebacterias. De este modo, a modo de ejemplo en especial le cepa de producción *C. glutamicum* preferente para la producción de aminoácidos no posee ningún sistema propio que disocia glicina. Por lo tanto, para utilizar las ventajas de un sistema que disocia glicina para *C. glutamicum* de debía incorporar y exprimir ésta por vía heteróloga en *C. glutamicum* a partir de otra *Corynebacterium*. Hasta la fecha se empleó a tal efecto el sistema que disocia glicina a partir de *C. jeikeium* (WO 2008/101857). En este caso, un inconveniente agravante es que, en el caso de *C. jeikeium*, se trata de un organismo patógeno. Otro inconveniente consiste en que se debía producir un constructo heterólogo con el fin de la degradación del producto secundario no deseado.

30 Por lo tanto, era tarea primaria de la presente invención poner a disposición un nuevo sistema que disocia glicina, preferentemente un sistema que disocia glicina que no proceda de un organismo patógeno, siendo apropiado el sistema que disocia glicina preferentemente para la incorporación en otras corinebacterias, en especial *C. glutamicum*.

Era otra tarea de la presente invención poner a disposición una *Corynebacterium* que, desde el origen, fuera apta para producir L-aminoácidos, y que dispusiera además de un sistema que disocia glicina propio, de modo que no es necesaria la producción de un constructo heterólogo – como en el caso de *C. glutamicum* –.

40 Según la invención, ahora se descubrió sorprendentemente que el tipo *Corynebacterium humireducens*, que no es patógeno, dispone de un sistema que disocia glicina propio, que se diferencia esencialmente de los sistemas que disocian glicina descritos hasta la fecha desde el punto de vista estructural.

45 Sorprendentemente se descubrió además que el sistema que disocia glicina a partir de *Corynebacterium humireducens* es muy efectivo, de modo que en la cepa de tipo salvaje glicina, que también representa un producto secundario indeseable en la síntesis de aminoácidos, no se acumula en la célula, o lo hace apenas en cantidad reducida. Mediante intensificación de un sistema que disocia glicina según la invención, en especial mediante sobreexpresión, correspondientemente se puede mejorar aún más la eliminación de la formación de productos secundarios de glicina. En especial, mediante la sobreexpresión de un sistema que disocia glicina según la invención en otros microorganismos, en especial en *C. glutamicum*, se puede suprimir la formación de productos secundarios de glicina de manera asimismo eficaz.

Además, sorprendentemente se descubrió que *C. humireducens*, ya desde el origen, es apta para producir L-aminoácidos, en especial L-alanina, L-valina y ácido L-glutámico más allá de la demanda propia, de modo que *C. humireducens* representa una cepa de producción de L-aminoácido con un sistema que disocia una glicina homóloga, al que se puede recurrir en especial como punto de partida para el desarrollo de otras cepas de producción, que disponen de un sistema que disocia glicina propio del huésped.

La cepa *C. humireducens* se describe por primera vez por Wu et al. (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2011), 61, 882-887). Ésta se depositó en la DSMZ bajo el número de depósito DSM 45392, su 16S rRNA se depositó en EMBL, y tiene el número de acceso GQ421281. En el caso de la cepa de partida se trata de una bacteria halotolerante, alcalófila, reductora de ácido húmico.

Se pueden extraer otras informaciones sobre *C. humireducens* de las siguientes publicaciones: Wu et al. (Microb. Biotechnol. (2013), 6(2), 141-149), Lin et al. (Bioresour. Technol. (2013), 136, 302-308).

Por lo tanto, son un primer objeto de la presente invención las enzimas de un sistema que disocia glicina seleccionado a partir del grupo constituido por:

a) una enzima GcvP con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 40,

b) una enzima GcvT con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 42,

c) una enzima GcvH con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 38.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es un sistema que disocia glicina que comprende las enzimas GcvP, GcvT und GcvH, caracterizado por que comprende al menos uno de los siguientes polipéptidos:

a) una enzima GcvP con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 40,

b) una enzima GcvT con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 42,

c) una enzima GcvH con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 38.

En este caso, un sistema que disocia glicina según la invención comprende preferentemente al menos dos, preferentemente los tres polipéptidos (a) a (c) citados anteriormente.

En este caso es especialmente preferente un sistema que disocia glicina, que comprende los tres polipéptidos siguientes:

a) una enzima GcvP con una identidad secuencial de al menos un 95 o un 98 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 40,

b) una enzima GcvT con una identidad secuencial de al menos un 95 o un 98 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 42,

c) una enzima GcvH con una identidad secuencial de al menos un 95 o un 98 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 38.

En un sentido amplio, al sistema que disocia glicina pertenecen también las enzimas LpdA, LplA, LipA, LipB y GcvH.

La dihidrolipoamida-deshidrogenasa (LpdA) reoxida la lipoamida unida a GcvH.

La lipoato-proteína-ligasa A (LplA) cataliza la lipoilación de GcvH.

La ácido lipónico-sintasa (LipA) cataliza la síntesis de ácido lipónico.

5 La lipoil-[acil-portador-proteína]-proteína-N-lipoiltransferasa (LipB) cataliza la transferencia de ácido lipónico a la GcvH.

En el caso de GcvL se trata de una dihidrolipoil-deshidrogenasa.

Por lo tanto, en una forma de realización preferente, un sistema que disocia glicina según la invención comprende además al menos una enzima ulterior seleccionada a partir del grupo constituido por:

10 a) una enzima LipA, vorzugsweise una enzima LipA con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 48,

b) una enzima LipB, vorzugsweise una enzima LipB con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 50,

15 c) una enzima Lpd, vorzugsweise una enzima Lpd con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 52,

20 d) una enzima LplA, vorzugsweise una enzima LplA con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 94,

e) una enzima GcvL, vorzugsweise una enzima GcvL con una identidad secuencial de al menos un 80 %, con una identidad secuencial de al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, 94, 96 o un 98 %, sobre todo un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 96.

25 En una forma de realización especialmente preferente según la invención, un sistema que disocia glicina según la invención comprende en este caso al menos dos, tres o cuatro, preferentemente los cinco polipéptidos citados anteriormente.

De manera alternativa o adicional al empleo de enzimas correspondientes que aseguran una síntesis suficiente de ácido lipónico y/o liponamida, estos compuestos se pueden añadir también al medio de reacción, a modo de ejemplo en cantidades de hasta 15 mM.

30 Otro objeto de la presente invención son asimismo polinucleótidos que codifican para enzimas según la invención y/o un sistema que disocia glicina según la invención. Estos polinucleótidos se seleccionan a partir del grupo constituido por:

35 a) un polinucleótido (gcvP), que codifica para la enzima GcvP y presenta una identidad secuencial de al menos un 70 o un 75 %, preferentemente al menos un 80 o un 85 %, en especial al menos un 90 a un 95 %, sobre todo al menos un 98 o un 100 %, respecto a la secuencia de posición 301 a 3162 según SEQ ID NO: 39, y/o se hibrida bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido, cuya secuencia es complementaria a la secuencia de posición 301 a 3162 según SEQ ID NO: 39;

40 b) un polinucleótido (gcvT), que codifica para la enzima GcvT y presenta una identidad secuencial de al menos un 70 o un 75 %, preferentemente al menos un 80 o un 85 %, en especial al menos un 90 o un 95 %, sobre todo al menos un 98 o un 100 %, respecto a la secuencia de posición 301 a 1404 según SEQ ID NO: 41, y/o se hibrida bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido, cuya secuencia es complementaria a la secuencia de posición 301 a 1404 según SEQ ID NO: 41;

c) un polinucleótido (gcvH), que codifica para la enzima GcvH y presenta una identidad secuencial de al menos un 70 o un 75 %, preferentemente al menos un 80 o un 85 %, en especial al menos un 90 o un 95

%, sobre todo al menos un 98 o un 100 %, respecto a la secuencia de posición 301 a 699 según SEQ ID NO: 37, y/o se hibrida bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido, cuya secuencia es complementaria a la secuencia de posición 301 a 699 según SEQ ID NO: 37.

5 Según la invención, se debe entender por "condiciones restrictivas" lavado a una concentración de sales de 1 x SSC y un 0,1 % en peso de SDS a una temperatura de 80°C.

Correspondientemente, también son otro objeto de la presente invención los vectores, en especial vectores de clonación y expresión, que contienen al menos un polinucleótido según la invención. Estos vectores se pueden incorporar correspondientemente en microorganismos, en especial en bacterias corineformes, sobre todo de la especie *Corynebacterium*, o Enterobacteriaceae, sobre todo de la especie *Escherichia*.

10 Los vectores según la invención pueden contener uno o varios polinucleótidos según la invención. Un vector preferente según la invención contiene al menos un polinucleótido, que codifica para una enzima según la invención seleccionado a partir de GcvP, GcvT y GcvH. Un vector especialmente preferente contiene polinucleótidos, que codifican las tres enzimas GcvP, GcvT y GcvH.

15 Los vectores según la invención disponen preferentemente de un promotor apropiado y/o promotores apropiados, así como, en caso dado, otros elementos reguladores, que posibilitan la expresión de polinucleótidos según la invención en la bacteria recombinante, preferentemente la *Corynebacterium* recombinante.

20 Además, con el fin de la expresión de los genes codificados, los polinucleótidos según la invención se pueden incorporar también en el genoma de microorganismos, en especial en el genoma de bacterias corineformes, en especial aquellas de la especie *Corynebacterium*, o en el genoma de Enterobacteriaceae, sobre todo de la especie *Escherichia*.

25 Correspondientemente, también son otro objeto de la presente invención microorganismos recombinantes, preferentemente bacterias, en especial bacterias corineformes, sobre todo de la especie *Corynebacterium*, de modo especialmente preferente de la especie *C. humireducens* o *C. glutamicum*, así como enterobacterias, sobre todo de la especie *Escherichia*, que contienen al menos una enzima según la invención y/o al menos un polinucleótido según la invención y/o al menos un vector según la invención y/o un sistema que disocia glicina según la invención y/o polinucleótidos que codifican para un sistema que disocia glicina según la invención.

30 En este caso, son un objeto preferente de la invención corinebacterias recombinantes, en especial de tipo *C. humireducens* y de tipo *C. glutamicum*, que contienen al menos una enzima según la invención, preferentemente todas las enzimas según la invención, preferentemente a partir de GcvP, GcvT y GcvH, y/o polinucleótidos que codifican para éstas y/o al menos un vector que comprende estos polinucleótidos.

35 Un objeto especial de la presente invención también son en especial microorganismos recombinantes, preferentemente bacterias, en especial bacterias corineformes, sobre todo aquellas de la especie *Corynebacterium* con excepción del tipo *C. humireducens*, en especial aquellas del tipo *C. glutamicum*, que contienen al menos una enzima según la invención y/o al menos un polinucleótido según la invención y/o al menos un vector según la invención y/o un sistema que disocia glicina según la invención y/o un polinucleótido que codifica para un sistema que disocia glicina según la invención.

40 En este caso, un objeto preferente son corinebacterias recombinantes, con excepción del tipo *C. humireducens*, en especial del tipo *C. glutamicum*, que contiene al menos una enzima según la invención, preferentemente todas las enzimas según la invención, seleccionadas a partir de GcvP, GcvT y GcvH, y/o polinucleótidos que codifican para éstas y/o al menos un vector que comprende estos polinucleótidos.

45 Según la invención, se debe entender por un "microorganismo recombinante", o bien "bacteria recombinante", un microorganismo, o bien una bacteria, que se sometió al menos a una medida de técnica génica. En el caso de la medida de técnica génica se puede tratar en especial de una mutación orientada al objetivo o no orientada, la incorporación de un gen ajeno al huésped y/o la sobreexpresión o el debilitamiento de un gen propio del huésped o ajeno al huésped. Un microorganismo recombinante según la invención, o bien una bacteria recombinante según la invención, se distingue por la sobreexpresión o el debilitamiento de al menos un gen. En una forma de realización especialmente preferente, un microorganismo recombinante según la invención, o bien una bacteria recombinante según la invención, se distingue por la sobreexpresión de al menos una enzima según la invención y/o del polinucleótido que codifica para ésta y/o la sobreexpresión de un sistema que disocia glicina según la invención, o bien de los polinucleótidos que codifican para éste.

Respecto a la formación de glicina, se debe entender por "cantidad reducida" preferentemente una cantidad de un máximo de máximo 0,3 g/l, preferentemente de un máximo de 0,2 o 0,1 g/l, de modo especialmente preferente de un máximo de 0,05 o un máximo de 0,03 g/l, referido respectivamente al contenido en glicina acumulada en la célula y/o en el medio de fermentación una vez concluida la fermentación.

- 5 Según la invención, dentro de la especie *Corynebacterium* son preferentes cepas que se basan en los siguientes tipos: *Corynebacterium efficiens*, como por ejemplo de la cepa de tipo DSM44549, *Corynebacterium glutamicum*, como por ejemplo de la cepa de tipo ATCC13032 o de la cepa R, *Corynebacterium ammoniagenes*, como por ejemplo de la cepa ATCC6871, *Corynebacterium humireducens*, como por ejemplo de la cepa DSM 45392, así como *Corynebacterium pekinese*, como por ejemplo de la cepa CGMCC N° 5361.
- 10 Son especialmente preferentes los tipos *Corynebacterium glutamicum* y *Corynebacterium humireducens*. En tanto en el ámbito de esta solicitud se trate de la cepa *Corynebacterium humireducens*, se trata preferentemente de la cepa DSM 45392 o de una cepa derivada de la misma.

15 Algunos representantes del tipo *Corynebacterium glutamicum* son conocidos en el estado de la técnica también bajo otras denominaciones. A éstas pertenecen, a modo de ejemplo: *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium lilium* DSM20137, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 y *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020. El concepto "*Micrococcus glutamicus*" para *Corynebacterium glutamicum* era igualmente de uso común. Algunos representantes típicos del tipo *Corynebacterium efficiens* se designan también *Corynebacterium thermoaminogenes* en el estado de la técnica, como por ejemplo de la cepa FERM BP-1539.

- 20 Se encuentran datos sobre la clasificación taxonómica de cepas de los grupos de bacterias coreniformes, entre otros, en Seiler (*Journal of General Microbiology* 129, 1433-1477 (1983)), Kinoshita (1985, *Glutamic Acid Bacteria*, p 115-142. En: Demain y Solomon (ed), *Biology of Industrial Microorganisms*. The Benjamin/Cummins Publishing Co., London, UK), Kämpfer y Kroppenstedt (*Canadian Journal of Microbiology* 42, 989-1005 (1996)), Liebl et al (*International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 255-260 (1991)), Fudou et al (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1127-1131 (2002)) y en el documento US-A-5,250,434.

25 Se pueden adquirir cepas con la denominación "ATCC" de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Se pueden adquirir cepas con la denominación "DSM" de la Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Se pueden adquirir cepas con la denominación "NRRL" de la Agricultural Research Service Patent Culture Collection (ARS, Peoria, Illinois, US). Se pueden adquirir cepas con la denominación "FERM" del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japón), se pueden adquirir cepas con la denominación "CGMCC" del China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC, Beijing, China).

35 Asimismo, es otro objeto de la presente invención un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, caracterizado por que en este procedimiento se emplea al menos una enzima según la invención y/o un polinucleótido que codifica para ésta y/o un sistema que disocia glicina según la invención y/o un polinucleótido que codifica para éste y/o un sistema que disocia glicina según la invención y/o polinucleótidos que codifican para éste y/o un microorganismo recombinante según la invención, preferentemente una bacteria recombinante según la invención, en especial una bacteria corineforme recombinante según la invención, de modo especialmente preferente una *Corynebacterium* recombinante según la invención, sobre todo una *Corynebacterium* de tipo C. humireducens o C. glutamicum. En una forma preferente de realización según la invención, en este caso se emplea al menos un polinucleótido según la invención en forma sobreexpresada.

45 En este caso, un objeto preferente de la presente invención es un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, caracterizado por que en este procedimiento se emplea un sistema que disocia glicina, que comprende las enzimas GcvP, GcvT y GcvH, comprendiendo el sistema que disocia la glicina al menos una de las enzimas según la invención GcvP, GcvT y GcvH, y/o empleándose en este procedimiento polinucleótidos que codifican para las enzimas de un sistema que disocia glicina GcvP, GcvT y GcvH, comprendiendo estos polinucleótidos al menos un de los polinucleótidos gcvP, gcvT y gcvH, y/o una corinebacteria recombinante, preferentemente del tipo C. humireducens o C. glutamicum, que contiene al menos una enzima según la invención, preferentemente las tres enzimas según la invención, seleccionadas a partir de GcvP, GcvT y GcvH y/o al menos un polinucleótido según la invención, preferentemente los tres polinucleótidos según la invención, seleccionados a partir de gcvP, gcvT y gcvH.

50 En este caso, un objeto especialmente preferente de la presente invención es un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, caracterizado por que en este procedimiento se emplea un sistema que disocia glicina, que contiene las enzimas según la invención GcvP, GcvT y GcvH y/o polinucleótidos que codifican para estas enzimas, y/o en este procedimiento se emplea una corinebacteria recombinante, preferentemente de tipo

C. humireducens o C. glutamicum, que contiene tal sistema que disocia glicina y/o polinucleótidos que codifican para éste.

Según la invención, se entiende por "L-aminoácido" especialmente los L-aminoácidos proteinógenos.

5 En este caso, el L-aminoácido se selecciona preferentemente a partir de L-alanina, L-valina, L-aminoácidos de la familia de glutamato, en especial L-glutamato, L-glutamina, L-prolina y L-arginina, así como L-aminoácidos de la familia de aspartato, en especial L-aspartato, L-asparagina, L-metionina, L-lisina, L-isoleucina y L-treonina, de modo especialmente preferente seleccionado a partir de L-alanina, L-valina, L-glutamato, L-metionina, L-lisina y L-treonina. De modo especialmente preferente se trata de L-metionina.

10 Según la invención, la superproducción de L-aminoácido se efectúa preferentemente en C. humireducens o C. glutamicum.

Los procedimientos según la invención se distinguen preferentemente por que se producen solo cantidades reducidas de productos secundarios de glicina. En el procedimiento según la invención, la glicina se produce preferentemente en una cantidad de menos de 0,2 g/l, en especial en una cantidad de menos de 0,1 g/l, de modo especialmente preferente en una cantidad de menos de 0,05 g/l.

15 Según la invención, se debe entender por "producción excedente", o bien "superproducción", respecto al L-aminoácido, que los microorganismos producen los L-aminoácidos más allá de su demanda propia, y se concentran en la célula, o bien precipitan en el medio nutriente circundante, y se acumulan en el mismo. En este caso, a tal efecto, los microorganismos son aptos para concentrarse, o bien para acumularse en la célula o en el medio nutriente \geq (al menos) 0,25 g/l, \geq 0,5 g/l, \geq 1,0 g/l, \geq 1,5 g/l, \geq 2,0 g/l, \geq 4 g/l o \geq 10 g/l del respectivo L-aminoácido en \leq (máximo) 120 horas, \leq 96 horas, \leq 48 horas, \leq 36 horas, \leq 24 horas o \leq 12 horas.

20 En una forma de realización preferente, ya antes de la incorporación de polinucleótidos y/o vectores según la invención, los microorganismos recombinantes según la invención, en los que se introdujeron polinucleótidos según la invención y/o vectores según la invención, poseen la capacidad de superproducir un L-aminoácido. En el caso de las cepas de partida se trata preferentemente de cepas que se produjeron mediante mutagénesis y selección, mediante técnicas de ADN recombinantes o mediante una combinación de ambos métodos.

Es evidente, y no requiere explicaciones adicionales, que se puede llegar a un microorganismo recombinante según la invención también estando contenido o incorporándose un polinucleótido según la invención y/o un vector según la invención, induciéndose el mismo a continuación a producir el L-aminoácido, o bien a aumentar la producción de L-aminoácido, mediante otras medidas genéticas apropiadas.

30 La sobreexpresión de los correspondientes polinucleótidos, o bien polipéptidos, puede influir positivamente sobre la producción de aminoácidos de determinados L-aminoácidos.

Por lo tanto, también son objeto de la presente invención:

35 a) una treonina deshidratasa (IIvA, EC 4.3.1.19) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 106, así como polinucleótidos que codifican para ésta,

b) la subunidad de una acetolactato sintasa (IIvB), die eine Sequenzidentität von mindestens 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 98, así como polinucleótidos que codifican para ésta,

40 c) una isomerorreductasa (IIvC, EC 1.1.1.86) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 100, así como polinucleótidos que codifican para ésta,

d) una dihidroxiácido deshidratasa (IIvD, EC 4.2.1.9) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 102, así como polinucleótidos que codifican para ésta,

45 e) una transaminasa (IIvE, EC 2.6.1.42) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 104, así como polinucleótidos que codifican para ésta,

ES 2 705 405 T3

- f) una acetolactato sintasa (IlvH, EC 2.2.1.6) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 122, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 5 g) una 3-metil-2-oxibutanoato-hidroximetiltransferasa (PanB, EC 2.1.2.11) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 118, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- h) una pantotenato sintasa (PanC, EC 6.3.2.1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 120, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 10 i) una glutamato-deshidrogenasa (Gdh) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 124, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 15 j) una glutamina sintetasa (glutamina sintetasa 1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 126, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- k) una glutamina sintetasa (glutamina sintetasa 2) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 128, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 20 l) una glutamato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 130, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- m) una isocitrato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 132, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 25 n) una aconitato hidrasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 134, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- o) una citrato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 136, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 30 p) una aminopeptidasa C (PepC) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 138, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 35 q) una piruvato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 140, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- r) una piruvato quinasa (piruvato quinasa 1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 142, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 40 s) una piruvato quinasa (piruvato quinasa 2) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 144, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- t) una enolasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 146, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 45 u) una fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (GpmA) con una identidad secuencial de

ES 2 705 405 T3

- al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 148, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 5 v) una fosfoglicerato quinasa (Pkg) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 150, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- w) una glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (glicerín-3-fosfato deshidrogenasa 1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 152, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 10 x) una glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (glicerín-3-fosfato deshidrogenasa 2) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 154, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- y) una triosafosfato isomerasa (TpiA) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 156, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 15 z) una fructosa bisfosfatoaldolasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 158, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- aa) una 1-fosfofructoquinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 160, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 20 bb) una 6-fosfofructoquinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 162, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- cc) una homoserina quinasa (ThrB, EC 2.7.1.39) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 4, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 25 dd) una cisteína sintasa (CBS, CysK) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 22, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 30 ee) una cistationina betaliasa (AecD) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 26, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- ff) una aspartato semialdehído deshidrogenasa (Asd, EC 1.2.1.11) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 28, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 35 gg) la menor subunidad de un transportador para aminoácidos de cadena ramificada (BrnE) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 30, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- hh) la mayor subunidad de un transportador para aminoácidos de cadena ramificada (BrnF) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 32, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 40 ii) una serina acetiltransferasa (CysE) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 34, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 45 jj) una cisteína sintasa (CysK) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 36, así como polinucleótidos que codifican para ésta,

ES 2 705 405 T3

- preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 36, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 5 kk) una serina hidroximetiltransferasa (GlyA) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 44, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- ll) una homoserina deshidrogenasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (Hom, EC 1.2.1.11) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 46, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 10 mm) una aspartato quinasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (LysC, EC 2.7.2.4) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 54, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- nn) una cistationina gamma-sintasa (MetB) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 56, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 15 oo) una 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MetF) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 58, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 20 pp) una homoserina-O-acetiltransferasa (MetX) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 60, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- qq) una O-acetilhomoserina-liasa (MetY) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 62, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 25 rr) una piruvato carboxilasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (Pyc, EC 6.4.1.1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 64, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- ss) una D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (SerA) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 66, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 30 tt) una fosfoserina fosfatasa (SerB) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 68, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 35 uu) una fosfoserina aminotransferasa (SerC) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 70, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- vv) la subunidad de una sulfato adenililtransferasa (CysD) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 74, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 40 ww) una adenosina fosfosulfato reductasa (CysH) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 76, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 45 xx) una sulfito reductasa (CysI) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 78, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- yy) una cadena beta de glutamatosintasa dependiente de NADPH (CysJ) con una identidad secuencial de

ES 2 705 405 T3

- al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 80, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 5 zz) la subunidad grande de una sulfato adenililtransferasa (CysN) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 82, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- aaa) una cistationina beta-sintasa (CysY) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 84, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 10 bbb) un transportador de sulfato (CysZ) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 86, así como polinucleótidos que codifican para éste,
- ccc) una 5-metiltetrahydropteriloil-triglutamato homocisteína metiltransferasa (MetE) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 88, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 15 ddd) una peptidil-tARN hidrolasa 1 (Pth1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 90, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- eee) una peptidil-tARN hidrolasa 2 (Pth2) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 92, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 20 fff) una diaminopimelato deshidrogenasa (Ddh, EC 1.4.1.16) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 202, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- ggg) una diaminopimelato descarboxilasa (LysA, EC 4.1.1.20) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 164, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 25 hhh) una aspartato-aminotransferasa (AaT, EC 2.6.1.1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 166, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 30 iii) un exportador de L-lisina (LysE, lisina eflujo permeasa) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 168, así como polinucleótidos que codifican para éste,
- 35 jjj) una dihidropicolinato reductasa (DapB, EC 1.3.1.26) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 170, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- kkk) una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 172, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 40 lll) la subunidad Zwf de una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf, EC 1.1.1.49) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 186, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- mmm) la subunidad OpcA de una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (OpcA, EC 1.1.1.49) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 188, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 45 nnn) una ácido fosfogluconico-deshidrogenasa (Gnd, EC 1.1.1.44) con una identidad secuencial de al

menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 174, así como polinucleótidos que codifican para ésta.

5 Asimismo, son otro objeto de la presente invención vectores que contienen los polinucleótidos citados anteriormente, así como microorganismos recombinantes que contienen las enzimas y/o polinucleótidos y/o vectores citados anteriormente. En este caso, en una forma preferente de realización, el polipéptido y/o polinucleótido en cuestión se presenta en forma sobreexpresada en el microorganismo. En el caso de microorganismos recombinantes se trata preferentemente de bacterias corineformes, sobre todo de corinebacterias, en especial aquellas del tipo *C. humireducens* o *C. glutamicum*.

10 Por lo tanto, es otro objeto de la presente invención es también un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, preferentemente seleccionado a partir de L-alanina, L-valina, L-aminoácidos de la familia de glutamato, en especial L-glutamato, L-glutamina, L-prolina y L-arginina, así como L-aminoácidos de la familia de aspartato, en especial L-aspartato, L-asparagina, L-metionina, L-lisina, L-isoleucina y L-treonina, de modo especialmente preferente seleccionado a partir de L-alanina, L-valina, L-glutamato, L-metionina, L-lisina y L-treonina, sobre todo para la superproducción de L-metionina, en el que al menos uno, preferentemente al menos dos, tres o cuatro de los
15 citados polinucleótidos se presentan en forma sobreexpresada, llevándose a cabo el procedimiento preferentemente en corinebacterias, en especial aquellas de tipo *C. humireducens* o *C. glutamicum*.

También son otro objeto de la presente invención otros polinucleótidos de *C. humireducens*, así como los polipéptidos codificados a través de estos polinucleótidos. Mediante desactivación o debilitamiento de los correspondientes polinucleótidos, o bien polipéptidos, se puede influir positivamente sobre la producción de
20 aminoácidos de determinados L-aminoácidos.

Por lo tanto, son igualmente objeto de la presente invención polipéptidos seleccionados a partir de la siguiente lista:

- a) una treonina sintasa (ThrC, EC 4.2.3.1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 108, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 25 b) una isopropilmalato sintasa (LeuA, EC 2.3.3.13) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 110, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- c) una isopropilmalato deshidrogenasa (LeuB, EC 1.1.1.85) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 112, así como
30 polinucleótidos que codifican para ésta,
- d) las subunidades de una isopropilmalato-isomerasa (LeuCD, EC 4.2.1.33), que presentan identidades secuenciales de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a las secuencias según SEQ ID NO: 114, o bien SEQ ID NO: 116, así como polinucleótidos que codifican para ésta.
- 35 e) las subunidades de una succinil-CoA-ligasa (SucCD, EC 6.2.1.5) con identidades secuenciales respectivamente de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a las secuencias según SEQ ID NO: 198, o bien SEQ ID NO: 200, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- f) un dominio de enlace de ADN de tipo HTH tetR (McbR) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 2, así como
40 polinucleótidos que codifican para ésta,
- g) una homoserina quinasa (ThrB, EC 2.7.1.39) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 4, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 45 h) una glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi, EC 5.3.1.9) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 6, así como polinucleótidos que codifican para ésta,

- i) una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Pck, EC 4.1.1.32) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 8, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 5 j) una lipoproteína que enlaza D-metionina (MetQ) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 10, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- k) un transportador de metionina (MetP) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 12, así como polinucleótidos que codifican para éste,
- 10 l) un transportador de metionina dependiente de ATP (MetN) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 14, así como polinucleótidos que codifican para éste,
- 15 m) una S-adenosilmetionina sintasa (MetK) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 16, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- n) una metionina-sistema de importación-permeasa (MetI) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 18, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 20 o) una 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa (DapA, EC 4.3.3.7) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 20, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- p) una carboxilato-amina-ligasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 24, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 25 q) una malato-quinona-oxidoreductasa (Mqo, EC 1.1.99.16) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 176, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 30 r) la subunidad E1p de un complejo piruvato deshidrogenasa (AceE, EC 1.2.4.1) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 178, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- s) una citrato sintasa (GltA, EC 4.1.3.7) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 180, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- 35 t) una malato deshidrogenasa (Mdh, EC 1.1.1.37) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 182, así como polinucleótidos que codifican para ésta,
- u) una UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato-ligasa (MurE, EC 6.3.2.13) con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 184, así como polinucleótidos que codifican para ésta.
- 40 Son igualmente objeto de la presente invención vectores que contienen los polinucleótidos citados anteriormente, así como microorganismos recombinantes que contienen las enzimas y/o polinucleótidos y/o vectores citados anteriormente. En este caso, en una forma preferente de realización, el polipéptido y/o polinucleótido en cuestión se presenta en forma desactivada o debilitada en el microorganismo. En el caso de microorganismos recombinantes se trata preferentemente de bacterias corineformes, sobre todo de corinebacterias, en especial aquellas del tipo *C. humireducens* o *C. glutamicum*, sobre todo de tipo *C. humireducens*.
- 45

En otra forma preferente de realización según la invención, los microorganismos o bacterias según la invención, en especial corinebacterias según la invención, sobre todo corinebacterias según la invención de tipo *C. humireducens*

oder *C. glutamicum*, en especial cepas de superproducción de L-metionina según la invención, además de un sistema que disocia glicina según la invención, preferentemente sobreexpresado, o bien los polinucleótidos que codifican para éste, presentan al menos una, preferentemente al menos dos o tres, de modo especialmente preferente al menos cuatro o cinco de las siguientes características:

- 5 a) un polinucleótido debilitado (*mcbR*), que codifica para un dominio de enlace de ADN de tipo HTH tetR (*McbR*), preferentemente para un dominio de enlace de ADN con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 2,
- 10 b) un polinucleótido debilitado (*thrB-Gen*), que codifica para una homoserina quinasa (*ThrB*, EC 2.7.1.39), preferentemente para una homoserina quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 4,
- c) un polinucleótido debilitado (*pgi*), que codifica para una glucosa-6-fosfato isomerasa (*Pgi*, EC 5.3.1.9), preferentemente para una glucosa-6-fosfato isomerasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 6,
- 15 d) un polinucleótido debilitado (*pck*), que codifica para una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*Pck*, EC 4.1.1.32), preferentemente para una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 8,
- e) un polinucleótido debilitado (*metQ*), que codifica para una lipoproteína que enlaza D-metionina (*MetQ*), preferentemente para una lipoproteína que enlaza D-metionina con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 10,
- 20 f) un polinucleótido debilitado (*metP*), que codifica para un transportador de metionina (*MetP*), preferentemente para un transportador de metionina con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 12,
- 25 g) un polinucleótido debilitado (*metN*), que codifica para un transportador de metionina dependiente de ATP (*MetN*), preferentemente para un transportador de metionina dependiente de ATP con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 14,
- h) un polinucleótido debilitado (*metK*), que codifica para una S-adenosilmetionina sintasa (*MetK*), preferentemente para una S-adenosilmetionina sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 16,
- 30 i) un polinucleótido debilitado (*metI*), que codifica para una metionina-sistema de importación-permeasa (*MetI*), preferentemente para una metionina-sistema de importación-permeasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 18,
- 35 j) un polinucleótido debilitado (*dapA*), que codifica para una 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa (*DapA*), preferentemente para una 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 20,
- k) un polinucleótido sobreexpresado (*CBS*), que codifica para una cisteína sintasa (*CBS*), preferentemente para una cisteína sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 22,
- 40 l) un polinucleótido debilitado, que codifica para un homólogo de *cg3031*, preferentemente para un homólogo de *cg3031* con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 24,
- 45 m) un polinucleótido sobreexpresado (*aecD*), que codifica para una cistationina-betaliasa (*AecD*), preferentemente para una cistationina-betaliasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 26,
- n) un polinucleótido sobreexpresado (*asd*), que codifica para una aspartato semialdehído deshidrogenasa (*Asd*), preferentemente para una aspartato semialdehído deshidrogenasa con una identidad secuencial de

ES 2 705 405 T3

al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 28,

o) un polinucleótido sobreexpresado (meth), que codifica para una 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-transferasa (MetH, EC 2.1.1.13),

5 p) un polinucleótido sobreexpresado (brnE), que codifica para la menor subunidad de un transportador para aminoácidos de cadena ramificada (BrnE), preferentemente para una subunidad con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 30,

10 q) un polinucleótido sobreexpresado (brnF), que codifica para la mayor subunidad de un transportador para aminoácidos de cadena ramificada (BrnF), preferentemente para una subunidad con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 32,

15 r) un polinucleótido sobreexpresado (cysE), que codifica para una serina acetiltransferasa (CysE), preferentemente para una serina acetiltransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 34,

s) un polinucleótido sobreexpresado (cysK), que codifica para una cisteína sintasa (CysK), preferentemente para una cisteína sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 36,

20 t) un polinucleótido sobreexpresado (glyA), que codifica para una serina hidroximetiltransferasa (GlyA), preferentemente para una serina hidroximetiltransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 44,

25 u) un polinucleótido sobreexpresado (hom), que codifica para una homoserina deshidrogenasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (Hom), preferentemente para una homoserina deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 46,

v) un polinucleótido sobreexpresado (lysC), que codifica para una aspartato quinasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (LysC), preferentemente para una aspartato quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 54,

30 w) un polinucleótido sobreexpresado (metB), que codifica para una cistationina gamma-sintasa (MetB), preferentemente para una cistationina-gamma-sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 56,

35 x) un polinucleótido sobreexpresado (metF), que codifica para una 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MetF), preferentemente para una 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 58,

y) un polinucleótido sobreexpresado (metX), que codifica para una homoserina-O-acetiltransferasa (MetX), preferentemente para una homoserina-O-acetiltransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 60,

40 z) un polinucleótido sobreexpresado (metY), que codifica para una O-acetilhomoserina-liasa (MetY), preferentemente para una O-acetilhomoserina-liasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 62,

aa) un polinucleótido sobreexpresado (pyc), que codifica para una piruvato carboxilasa (Pyc), preferentemente para una piruvato carboxilasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 64,

45 bb) un polinucleótido sobreexpresado (serA), que codifica para una D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (SerA), preferentemente para una D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100

%, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 66,

cc) un polinucleótido sobreexpresado (serB), que codifica para una fosfoserina fosfatasa (SerB), preferentemente para una fosfoserina fosfatasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 68,

5 dd) un polinucleótido sobreexpresado (serC), que codifica para una fosfoserina aminotransferasa (SerC), preferentemente para una fosfoserina aminotransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 70,

10 ee) un polinucleótido sobreexpresado (ald), que codifica para una alanina deshidrogenasa (Ald), preferentemente para una alanina deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 72,

ff) un polinucleótido sobreexpresado (cysD), que codifica para la subunidad de una sulfato adeniltransferasa (CysD), preferentemente para una subunidad con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 74,

15 gg) un polinucleótido sobreexpresado (cysH), que codifica para una adenosina-fosfosulfato reductasa (CysH), preferentemente para una adenosina-fosfosulfato reductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 76,

hh) un polinucleótido sobreexpresado (cysI), que codifica para una sulfato reductasa (CysI), preferentemente para una sulfato reductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 78,

20 ii) un polinucleótido sobreexpresado (cysJ), que codifica para (CysJ), preferentemente para una con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 80,

25 jj) un polinucleótido sobreexpresado (cysN), que codifica para la subunidad de una sulfato adeniltransferasa (CysN), preferentemente para una subunidad con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 82,

kk) un polinucleótido sobreexpresado (cysY), que codifica para una cistationina beta-sintasa (CysY), preferentemente para una cistationina beta-sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 84,

30 ll) un polinucleótido sobreexpresado (cysZ), que codifica para un transportador de sulfato putativo (CysZ), preferentemente para un transportador de sulfato con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 86,

35 mm) un polinucleótido sobreexpresado (metE), que codifica para una 5-metiltetrahidropteril-triglutamato homocisteína metiltransferasa (MetE), preferentemente para una proteína con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 88,

nn) un polinucleótido sobreexpresado (ptH1), que codifica para una peptidil-tARN hidrolasa 1 (PtH1), preferentemente para una peptidil-tARN hidrolasa 1 con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 90,

40 oo) un polinucleótido sobreexpresado (ptH2), que codifica para una peptidil-tARN hidrolasa 2 (PtH2), preferentemente para una peptidil-tARN hidrolasa 2 con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 92.

Correspondientemente, también es otro objeto de la presente invención un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, en especial L-metionina, en el que se emplea tal microorganismo, o bien tal bacteria.

45 En otra forma preferente de realización según la invención, los microorganismos o bacterias según la invención, en especial corinebacterias según la invención, sobre todo corinebacterias según la invención de tipo *C. humireducens* o *C. glutamicum*, en especial cepas de superproducción de L-valina según la invención, además de un sistema que

disocia glicina según la invención, preferentemente sobreexpresado, o bien de polinucleótidos que codifican para éste, presentan al menos una, preferentemente al menos 2 o 3, de modo especialmente preferente 4 o 5 de las siguientes características:

- 5 a) un polinucleótido sobreexpresado (ilvA-Gen), que codifica para una treonina deshidratasa (IlvA, EC 4.3.1.19), preferentemente para una treonina deshidratasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 106,
- b) un polinucleótido sobreexpresado (ilvB-Gen), que codifica para la subunidad de una acetolactato sintasa (IlvB), preferentemente para la subunidad de una acetolactato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 98,
- 10 c) un polinucleótido sobreexpresado (ilvN-Gen), que codifica para la subunidad de una acetolactato sintasa, en caso dado resistente a retroalimentación (IlvN),
- d) un polinucleótido sobreexpresado (ilvC-Gen), que codifica para una isomeroreductasa (IlvC, EC 1.1.1.86), preferentemente para una isomeroreductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 100,
- 15 e) un polinucleótido sobreexpresado (ilvD-Gen), que codifica para una dihidroxiácido deshidratasa (IlvD, EC 4.2.1.9), preferentemente para una dihidroxiácido deshidratasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 102,
- f) un polinucleótido sobreexpresado (ilvE-Gen), que codifica para una transaminasa (IlvE, EC 2.6.1.42), preferentemente para una transaminasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 104,
- 20 g) un polinucleótido sobreexpresado (ilvH-Gen), que codifica para una acetolactato sintasa (IlvH, EC 2.2.1.6), preferentemente para una acetolactato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 122,
- h) un polinucleótido debilitado (thrB-Gen), que codifica para una homoserina quinasa (ThrB, EC 2.7.1.39), preferentemente para una homoserina quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 4,
- 25 i) un polinucleótido debilitado (thrC-Gen), que codifica para una treonina sintasa (ThrC, EC 4.2.3.1), preferentemente para una treonina sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 108,
- 30 j) un polinucleótido sobreexpresado (hom-Gen), que codifica para una homoserina deshidrogenasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (Hom, EC 1.2.1.11), preferentemente para una homoserina deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 46,
- 35 k) un polinucleótido debilitado (leuA-Gen), que codifica para una isopropilmalato sintasa, en caso dado resistente a retroalimentación (LeuA, EC 2.3.3.13), preferentemente para una isopropilmalato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 110,
- 40 l) un polinucleótido debilitado (leuB-Gen), que codifica para una isopropilmalato deshidrogenasa (LeuB, EC 1.1.1.85), preferentemente para una isopropilmalato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 112,
- 45 m) polinucleótidos debilitados (leuCD-Genes), que codifican para las subunidades de una isopropilmalato isomerasa (LeuCD, EC 4.2.1.33), preferentemente para las subunidades de una isopropilmalato isomerasa con identidades secuenciales de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a las secuencias según SEQ ID NO: 114 y SEQ ID NO: 116,
- n) un polinucleótido sobreexpresado (panB-Gen), que codifica para una 3-metil-2-oxibutanoato-hidroximetiltransferasa (PanB, EC 2.1.2.11), preferentemente para una 3-metil-2-oxibutanoato-

hidroximetiltransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 118,

- 5 o) un polinucleótido sobreexpresado (panC-Gen), que codifica para una pantotenato sintasa (PanC, EC 6.3.2.1), preferentemente para una pantotenato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 120.

Correspondientemente, también es otro objeto de la presente invención un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, en especial L-valina, en el que se emplea tal microorganismo, o bien tal bacteria.

10 En otra forma especialmente preferente de realización según la invención, los microorganismos o bacterias según la invención, los microorganismos o bacterias según la invención, en especial corinebacterias según la invención, sobre todo corinebacterias según la invención de tipo *C. humireducens* o *C. glutamicum*, en especial cepas de superproducción de L-glutamato según la invención, además de un sistema que disocia glicina según la invención, preferentemente sobreexpresado, o bien de polinucleótidos que codifican para éste, presentan al menos una, preferentemente al menos dos o tres, de modo especialmente preferente cuatro o cinco de las siguientes características:

15 a) un polinucleótido sobreexpresado (gdh), que codifica para una glutamato-deshidrogenasa (Gdh), preferentemente para una glutamato-deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 124,

20 b) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una glutamina sintetasa (glutamina sintetasa 1), preferentemente para una glutamina sintetasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 126,

c) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una glutamina sintetasa (glutamina sintetasa 2), preferentemente para una glutamina sintetasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 128,

25 d) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una glutamato sintasa, preferentemente para una glutamato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 130,

e) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una isocitrato deshidrogenasa, preferentemente para una isocitrato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 132,

30 f) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una aconitato hidrasa, preferentemente para una aconitato hidrasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 134,

35 g) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una citrato sintasa, preferentemente para una citrato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 136,

h) un polinucleótido sobreexpresado (pepC), que codifica para una aminopeptidasa C (PepC), preferentemente para una aminopeptidasa C con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 138,

40 i) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para eine Pyruvat-Dehydrogenase, preferentemente para una piruvato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 140,

j) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una piruvato quinasa (piruvato quinasa 1), preferentemente para una piruvato quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 142,

45 k) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una piruvato quinasa (piruvato quinasa 2), preferentemente para una piruvato quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 144,

- l) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una enolasa, preferentemente para una enolasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 146,
- 5 m) un polinucleótido sobreexpresado (gpmA), que codifica para una fosfoglicerato mutasa dependiente de 2,3-bisfosfoglicerato (GpmA), preferentemente para una fosfoglicerato mutasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 148,
- 10 n) un polinucleótido sobreexpresado (pgk), que codifica para una fosfoglicerato quinasa (Pkg), preferentemente para una fosfoglicerato quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 150,
- o) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (glicerín-3-fosfato deshidrogenasa 1), preferentemente para una glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 152,
- 15 p) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (glicerín-3-fosfato deshidrogenasa 2), preferentemente para una glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 154,
- 20 q) un polinucleótido sobreexpresado (tpiA), que codifica para una triosafosfato isomerasa (TpiA), preferentemente para una triosafosfato isomerasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 156,
- r) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una fructosa bisfosfato aldolasa, preferentemente para una fructosa bisfosfatoaldolasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 158,
- 25 s) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica 1-fosfofructoquinasa, preferentemente para una 1-fosfofructoquinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 160,
- t) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una 6-fosfofructoquinasa, preferentemente para una 6-fosfofructoquinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 162,
- 30 u) un polinucleótido sobreexpresado (pgi), que codifica para una glucosa-6-fosfato isomerasa, preferentemente para una glucosa-6-fosfato isomerasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 6,
- 35 v) polinucleótidos debilitados (sucCD), que codifican para las subunidades de una succinil-CoA-ligasa (SucCD, EC 6.2.1.5), preferentemente para las subunidades de una succinil-CoA-ligasa con identidades de secuencia de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a las secuencias según SEQ ID NO: 198, o bien SEQ ID NO: 200.

Correspondientemente, también es otro objeto de la presente invención un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, en especial L-glutamato, en el que se emplea tal microorganismo, o bien tal bacteria.

- 40 En otra forma especialmente preferente de realización según la invención, los microorganismos o bacterias según la invención, los microorganismos o bacterias según la invención, en especial corinebacterias según la invención, sobre todo corinebacterias según la invención de tipo *C. humireducens* o *C. glutamicum*, en especial cepas de superproducción de L-alanina según la invención, además de un sistema que disocia glicina según la invención, preferentemente sobreexpresado, o bien de polinucleótidos que codifican para éste, presentan al menos una,
- 45 preferentemente al menos dos o tres, de modo especialmente preferente cuatro o cinco de las siguientes características:

- a) un polinucleótido sobreexpresado (alaD), que codifica para una alanina deshidrogenasa (AlaD), preferentemente para una alanina deshidrogenasa de corinebacterias,

b) un polinucleótido sobreexpresado (gapA), que codifica para una gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GapA), preferentemente para una gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de corinebacterias,

5 c) un polinucleótido desactivado o debilitado (ldhA), que codifica para una L-lactato deshidrogenasa (LdhA), preferentemente para una L-lactato deshidrogenasa de corinebacterias,

d) un polinucleótido desactivado o debilitado (ppc), que codifica para una fosfoenolpiruvato carboxilasa (Ppc), preferentemente para una fosfoenolpiruvato carboxilasa de corinebacterias,

e) un polinucleótido desactivado o debilitado (alr), que codifica para una alanina racemasa (Alr), preferentemente para una alanina racemasa de corinebacterias.

10 Correspondientemente, también es otro objeto de la presente invención un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, en especial L-alanina, en el que se emplea tal microorganismo, o bien tal bacteria.

En otra forma especialmente preferente de realización según la invención, los microorganismos o bacterias según la invención, los microorganismos o bacterias según la invención, en especial corinebacterias según la invención, sobre todo corinebacterias según la invención de tipo *C. humireducens* o *C. glutamicum*, en especial cepas de superproducción de L-lisina según la invención, además de un sistema que disocia glicina según la invención, preferentemente sobreexpresado, o bien de polinucleótidos que codifican para éste, presentan al menos una, preferentemente al menos 2 o 3, de modo especialmente preferente 4 o 5 de las siguientes características:

20 a) un polinucleótido sobreexpresado (dapA-Gen), que codifica para una dihidrodipicolinato sintasa (DapA, EC 4.2.1.52), preferentemente para una dihidrodipicolinato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 20,

b) un polinucleótido sobreexpresado (lysC), que codifica para una aspartato quinasa, preferentemente resistente a retroalimentación (LysC, EC 2.7.2.4), preferentemente para una aspartato quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 54,

25 c) un polinucleótido sobreexpresado (ddh), que codifica para una diaminopimelato deshidrogenasa (Ddh, EC 1.4.1.16), preferentemente para una diaminopimelato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 202,

30 d) un polinucleótido sobreexpresado (asd-Gen), que codifica para una aspartato semialdehído deshidrogenasa (Asd, EC 1.2.1.11), preferentemente para una una aspartato semialdehído deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 28,

35 e) un polinucleótido sobreexpresado (lysA-Gen), que codifica para una diaminopimelato descarboxilasa (LysA, EC 4.1.1.20), preferentemente para una diaminopimelato descarboxilasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 164,

f) un polinucleótido sobreexpresado (aat-Gen), que codifica para una aspartato-aminotransferasa (AaT, EC 2.6.1.1), preferentemente para una aspartato-aminotransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 166,

40 g) un polinucleótido sobreexpresado (lysE-Gen), que codifica para un exportador de L-lisina (LysE, lisina eflujo permeasa), preferentemente para un exportador de L-lisina con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 168,

45 h) un polinucleótido sobreexpresado (pyc-Gen), que codifica para una piruvato carboxilasa (Pyc, EC 6.4.1.1), preferentemente para un piruvato carboxilasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 64,

i) un polinucleótido sobreexpresado (dapF-Gen), que codifica para una diaminopimelato epimerasa (DapF, EC 5.1.1.7),

- j) un polinucleótido sobreexpresado (dapB-Gen), que codifica para una dihidropicolinato reductasa (DapB, EC 1.3.1.26), preferentemente para una dihidropicolinato reductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 172,
- 5 k) un polinucleótido sobreexpresado, que codifica para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49), preferentemente para una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 174,
- 10 l) un polinucleótido sobreexpresado (zwf-Gen), que codifica para la subunidad Zwf de una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Zwf, EC 1.1.1.49), preferentemente para una subunidad Zwf con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 188,
- 15 m) un polinucleótido sobreexpresado (opcA-Gen), que codifica para la subunidad OpcA de una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (OpcA, EC 1.1.1.49), preferentemente para una subunidad OpcA con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 190,
- n) un polinucleótido sobreexpresado (gnd-Gen), que codifica para una ácido fosfogluconico-deshidrogenasa (Gnd, EC 1.1.1.44), preferentemente para una ácido fosfogluconico-deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 176,
- 20 o) un polinucleótido desactivado o debilitado (mqo), que codifica para una malato-quinona-oxidoreductasa (Mqo, EC 1.1.99.16), preferentemente para una malato-quinona-oxidoreductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 178,
- 25 p) un polinucleótido desactivado o debilitado (aceE), que codifica para la subunidad E1p de un complejo piruvato deshidrogenasa (AceE, EC 1.2.4.1), preferentemente para una subunidad E1p con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 180,
- 30 q) un polinucleótido desactivado o debilitado (glTA), que codifica para una citrato sintasa (GltA, EC 4.1.3.7), preferentemente para una citrato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 182,
- r) un polinucleótido desactivado o debilitado (mdh), que codifica para una malato deshidrogenasa (Mdh, EC 1.1.1.37), preferentemente para una malato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 184,
- 35 s) un polinucleótido desactivado o debilitado (murE), que codifica para una UDP-N-acetilmuramiloalanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligasa (MurE, EC 6.3.2.13), preferentemente para una enzima con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 186.

Correspondientemente, también es otro objeto de la presente invención un procedimiento para la superproducción de un L-aminoácido, en especial L-lisina, en el que se emplea tal microorganismo, o bien tal bacteria.

- 40 Los polinucleótidos y polipéptidos citados anteriormente, empleados, o bien a emplear en el procedimiento según la invención, proceden preferentemente de corinebacterias, en especial de *C. glutamicum* o *C. humireducens*, de modo especialmente preferente de *C. humireducens*.

45 Según la invención, generalmente se debe entender por "sobreexpresión" un aumento de la concentración o actividad intracelular de un ácido ribonucleico, de una proteína (polipéptido), o de una enzima, que se codifican mediante un correspondiente ADN, en un microorganismo en comparación con la cepa de partida (cepa madre) o la cepa de tipo salvaje. Se entiende por una cepa de partida (cepa madre) la cepa en la que se llevó a cabo la medida que conduce a la sobreexpresión.

El aumento de la concentración o actividad se puede conseguir, a modo de ejemplo, aumentándose el número de copias de los correspondientes polinucleótidos codificantes al menos en una copia por vía cromosómica o

extracromosómica.

5 Un método bastante extendido para el aumento del número de copias consiste en incorporar el correspondiente nucleótido codificante en un vector, preferentemente un plásmido, que se replica por un microorganismo, en especial una bacteria corineforme. Además, como vectores se pueden emplear transposones, elementos de inserción (elementos de IS) o fagos. En el estado de la técnica se describe una variedad de vectores apropiados.

Otro método extendido para la consecución de una sobreexpresión es el procedimiento de amplificación génica cromosómica. En este método se inserta al menos una copia adicional del polinucleótido interesante en el cromosoma de una bacteria corineforme. Tales procedimientos de amplificación se describen, a modo de ejemplo, en el documento WO 03/014330 o el documento WO 03/040373.

10 Otro método para la consecución de una sobreexpresión consiste en enlazar el correspondiente gen, o bien alelo, de modo funcional (unido de manera operativa) con un promotor, o bien un cassette de expresión. Se describen promotores apropiados para *Corynebacterium glutamicum*, a modo de ejemplo, en la Fig. 1 del artículo recopilatorio de Patek et al. (Journal of Biotechnology 104(1-3), 311-323 (2003)) y en descripciones resumidas, como el "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*" (Eds.: Lothar Eggeling y Michael Bott, CRC Press, Boca Raton, US
15 (2005)) o el libro "Corynebacteria, Genomics and Molecular Biology" (Ed.: Andreas Burkovski, Caister Academic Press, Norfolk, UK (2008)). Del mismo modo se pueden emplear las variantes de promotor *dapA*, a modo de ejemplo el promotor A25, descritas por Vasicova et al (Journal of Bacteriology 181, 6188-6191 (1999)). Además se puede emplear el promotor *gap* de *Corynebacterium glutamicum* (EP 06007373). Finalmente se pueden emplear los promotores T3, T7, SP6, M13, *lac*, *tac* y *trc*, bastante conocidos, descritos por Amann et al. (Gene 69(2), 301-315
20 (1988)) y Amann y Brosius (Gene 40(2-3), 183-190 (1985)). Tal promotor se puede insertar, a modo de ejemplo, en línea de entrada del gen en cuestión, típicamente a distancia de aproximadamente 1 – 500 nucleobases del codón de iniciación.

Mediante la medida de sobreexpresión, la actividad o la concentración del correspondiente polipéptido aumentan preferentemente en al menos un 10%, un 25%, un 50%, un 75%, un 100%, un 150%, un 200%, un 300%, un 400% o
25 un 500%, como máximo hasta preferentemente un 1000% o un 2000%, referido a la actividad o la concentración de polipéptido en la cepa antes de la medida que conduce a la sobreexpresión.

La concentración de una proteína se puede determinar mediante separación en gel proteico 1- y 2-dimensional y subsiguiente identificación óptica de la concentración de proteínas con un correspondiente software de valoración en el gel. Un método común para la preparación de geles proteicos en bacterias corineformes y para la identificación de
30 proteínas es el procedimiento descrito por Hermann et al. (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)). La concentración de proteínas se puede determinar igualmente mediante hibridación Western-Blot con un anticuerpo específico para la proteína a identificar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) y subsiguiente valoración óptica con un correspondiente software para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie
35 38: 2630-2647 (1999)). La actividad se puede determinar con ayuda de un test enzimático apropiado.

Según la invención, el concepto "debilitamiento" designa la reducción de la concentración o actividad intracelular de un ácido ribonucleico, de una proteína (polipéptido) o de una enzima, que se codifican mediante un ADN correspondiente, en un microorganismo, en comparación con la cepa de partida (cepa madre) o la cepa de tipo salvaje. Se denomina cepa de partida (cepa madre) la cepa en la que se llevó a cabo la medida de debilitamiento.

40 Se puede conseguir el debilitamiento reduciéndose la expresión de un polipéptido, a modo de ejemplo mediante empleo de un promotor débil, o empleándose un alelo que codifica para un polipéptido con una menor actividad, y combinándose estas medidas en caso dado. El debilitamiento también se puede conseguir suprimiéndose completamente la expresión del polipéptido, a modo de ejemplo desactivándose el gen codificante.

Mediante la medida de debilitamiento se reduce la actividad o la concentración del correspondiente polipéptido preferentemente en al menos un 10 %, un 25 %, un 50 % o un 75 %, como máximo en un 100 %, referido a la actividad o la concentración de polipéptido en la cepa antes de la medida que conduce al debilitamiento. En una forma de realización preferente, el debilitamiento consiste en la desactivación completa de la expresión del polipéptido en cuestión.

En relación con la producción de aminoácidos, generalmente se entiende por enzimas resistentes a retroalimentación enzimas que presentan una menor sensibilidad frente a la inhibición debida al L-aminoácido producido y/o análogos en comparación con la forma salvaje.

De este modo, en especial por una aspartato quinasa resistente a retroalimentación (LysC^{FBR}) una aspartato quinasa que presenta, en comparación con la forma salvaje, una menor sensibilidad frente a la inhibición debida a mezclas de lisina y treonina, o mezclas de AEC (aminoetilcisteína) y treonina o lisina por separado, o AEC por separado.

Para la producción de lisina se emplean preferentemente correspondientes cepas que contienen tales aspartato quininas resistentes a retroalimentación, o bien desensibilizadas.

5 Por la literatura son conocidas, a modo de ejemplo, las siguientes aspartato quininas de *C. glutamicum* resistentes a retroalimentación: A279T, A279V, S301F, S301Y, T308I, T311I, R320G, G345D, S381F. Respecto a aspartato quininas de *C. glutamicum* resistentes a retroalimentación se remite además a las siguientes publicaciones: JP1993184366-A, JP1994062866-A, JP1994261766-A, JP1997070291-A, JP1997322774-A, JP1998165180-A, JP1998215883-A, US5688671-A, EP0387527, WO00/63388, US3732144, JP6261766, Jetten et al. (1995; Applied Microbiology Biotechnology 43: 76-82). En el banco génico NCBI se depositan aspartato quininas de *C. glutamicum* resistentes a retroalimentación bajo los siguientes números de acceso: E05108, E06825, E06826, E06827, E08177, 10 E08178, E08179, E08180, E08181, E08182, E12770, E14514, E16352, E16745, E16746, I74588, I74589, I74590, I74591, I74592, I74593, I74594, I74595, I74596, I74597, X57226, L16848, L27125.

Según la invención se emplean preferentemente las siguientes aspartato quininas de *C. humireducens* resistentes a retroalimentación: D274Y, A279E, S301Y, T308I, T311I, G359D.

15 Del mismo modo, en la producción de treonina se emplean preferentemente cepas que contienen correspondientemente una homoserina deshidrogenasa resistente a retroalimentación (Hom^{FBR}).

Del mismo modo, en la producción de isoleucina y en la producción de valina se emplean preferentemente cepas que contienen correspondientemente una acetolactato sintasa resistente a retroalimentación.

20 Del mismo modo, en la producción de leucina se emplean preferentemente cepas que contienen correspondientemente una isopropilmalato sintasa resistente a retroalimentación (LeuA^{FBR}).

Del mismo modo, en la producción de prolina se emplean preferentemente cepas que contienen correspondientemente una glutamato 5-quinasa resistente a retroalimentación (ProB^{FBR}).

Del mismo modo, en la producción de arginina se emplean preferentemente cepas que contienen correspondientemente una ornitina carbamoiltransferasa resistente a retroalimentación (ArgF^{FBR}).

25 Del mismo modo, en la producción de serina se emplean preferentemente cepas que contienen correspondientemente una D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa resistente a retroalimentación (SerA^{FBR}).

Del mismo modo, en la producción de metionina se emplean preferentemente cepas que contienen correspondientemente una D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa resistente a retroalimentación (SerA^{FBR}) y/o piruvato carboxilasas resistentes a retroalimentación (Pyc^{FBR}).

30 Del mismo modo, en la producción de triptófanos se emplean preferentemente cepas que contienen correspondientemente una fosfo-2-deshidro-3-Deoxiheptonato aldolasa resistente a retroalimentación (AroG^{FBR} o AroH^{FBR}).

35 Respecto a otras propiedades preferentes de la cepa *C. humireducens* que sobreproduce L-aminoácidos a emplear según la invención se remite a la publicación citada anteriormente de Wu et al. (2011), así como a las demás publicaciones citadas anteriormente.

40 Los microorganismos según la invención, en especial bacterias de la especie *Corynebacterium*, se pueden cultivar continuamente – como se describe, a modo de ejemplo, en el documento WO 05/021772 – o discontinuamente en procedimiento discontinuo (cultivo de carga, o bien procedimiento de carga) o en el procedimientos de carga de alimentación (procedimiento de alimentación) o de carga de alimentación repetida (procedimiento de alimentación repetitivo) con el fin de producir de L-lisina. Se encuentra disponible un resumen de tipo general sobre métodos de cultivo conocidos en el manual de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el manual de Storhas (biorreactores y dispositivos periféricos (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

45 El medio de cultivo, o bien el medio de fermentación a emplear debe satisfacer de modo apropiado los requisitos de las respectivas cepas. En el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) están incluidas descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos. Los conceptos medio de cultivo y medio de fermentación, o bien medio, son sustituibles entre sí.

50 Como fuente de carbono se pueden emplear azúcares e hidratos de carbono, como por ejemplo glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melasa, disoluciones que contienen sacarosa de la producción de remolacha azucarera y caña de azúcar, almidón, hidrolizado de almidón y celulosa, aceites y grasas, como por ejemplo aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, como por ejemplo ácido palmítico, ácido

esteárico y ácido linoléico, alcoholes, como por ejemplo glicerina, metanol y etanol, y ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido acético o ácido láctico.

5 Como fuente de nitrógeno se pueden emplear compuestos orgánicos nitrogenados, como peptonas, extracto de levadura, extracto de pescado, extracto de malta, agua de remojo de maíz, harina de habas de soja y urea, o compuestos inorgánicos, como sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico. Las fuentes de nitrógeno se pueden emplear por separado o como mezcla.

Como fuente de fósforo se pueden emplear ácido fosfórico, dihidrogenofosfato potásico o hidrogenofosfato dipotásico, o las correspondientes sales que contienen sodio.

10 El medio de cultivo debe contener además sales, a modo de ejemplo en forma de cloruros o sulfatos de metales, como por ejemplo sodio, potasio, magnesio, calcio y hierro, como por ejemplo sulfato amónico o sulfato de hierro, que son necesarios para el crecimientos. Finalmente se pueden emplear sustancias de crecimiento esenciales, como aminoácidos, a modo de ejemplo homoserina y vitaminas, a modo de ejemplo tiamina, biotina o ácido pantoténico, de manera adicional a las sustancias citadas anteriormente.

15 Las citadas sustancias de empleo se pueden añadir al cultivo en forma de una única carga, o alimentar de modo apropiado durante el cultivo.

20 Para el control de pH del cultivo se emplean compuestos básicos, como hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco, o bien agua amoniacal, o compuestos ácidos, como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, de modo apropiado. El pH se ajusta en general a un valor de 6,0 a 9,0, preferentemente 6,5 a 8. Para el control del espumado se pueden emplear agentes antiespumantes, como por ejemplo poliglicolésteres de ácidos grasos. Para el mantenimiento de la estabilidad de plásmidos se pueden añadir al medio sustancias de acción selectiva apropiadas, como por ejemplo antibióticos. Para mantener condiciones aerobias se introducen oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, como por ejemplo aire, en el cultivo. El empleo de líquidos, que están enriquecidos con peróxido de hidrógeno, es igualmente posible. En caso dado, la fermentación se realiza en sobrepresión, a modo de ejemplo a una presión de 0,03 a 0,2 MPa. La temperatura del cultivo se sitúa normalmente en 20°C a 45°C, y preferentemente en 25°C a 40°C. En el procedimiento discontinuo, se prosigue el cultivo hasta que se ha formado un máximo del L-aminoácido deseado. Este objetivo se consigue normalmente en el intervalo de 10 horas hasta 160 horas. En el procedimiento continuo son posibles tiempos de cultivo más largo. Mediante la actividad de las bacterias se produce una concentración (acumulación) de L-aminoácido en el medio de fermentación y/o en las células bacterianas.

30 Se encuentran ejemplos de medios de fermentación apropiados, entre otros, en los documentos de patente 5,770,409, US 5,840,551 y US 5,990,350 o US 5,275,940.

35 El análisis de L-aminoácidos para la determinación de la concentración en uno o varios momentos en el transcurso de la fermentación se puede efectuar también mediante separación de L-aminoácidos por medio de cromatografía de intercambio iónico, preferentemente cromatografía de intercambio catiónico, con subsiguiente derivatización en columna adicional, bajo empleo de ninhidrina, como se describe en Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)). En lugar de ninhidrina, también se puede emplear orto-ftaldialdehído para la derivatización en columna adicional. Se encuentra un artículo recopilatorio sobre cromatografía de intercambio iónico en Pickering (LC-GC (Magazine of Chromatographic Science) 7(6), 484-487 (1989)).

40 Es igualmente posible efectuar una derivatización en columna previa, a modo de ejemplo bajo empleo de orto-ftaldialdehído o isocianato de fenilo, y separar los derivados de aminoácido producidos mediante cromatografía en fase inversa (RP), preferentemente en forma de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Tal método se describe, a modo de ejemplo, en Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)).

La detección se efectúa mediante fotometría (absorción, fluorescencia).

Se encuentra una descripción resumida del análisis de aminoácidos, entre otros, en el manual "Bioanalytik" de Lottspeich y Zorbas (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania 1998).

45 Por consiguiente, también es objeto de la invención un procedimiento para la producción de un L-aminoácido, caracterizado por que se lleva a cabo los siguientes pasos:

a) fermentación de microorganismos según la invención, en especial bacterias corineformes, preferentemente de la especie *Corynebacterium*, de modo especialmente preferente de tipo *Corynebacterium glutamicum* o *Corynebacterium humireducens*, en un medio nutriente apropiado, y

50 b) acumulación de L-aminoácido en el medio nutriente y/o en las células de las citadas bacterias.

ES 2 705 405 T3

A continuación se efectúa la puesta a disposición, o bien la producción u obtención de un producto que contiene L-aminoácido en forma líquida o sólida.

Mediante las medidas de fermentación se obtiene un caldo de fermentación que contiene el L-aminoácido en cuestión.

- 5 Se entiende por un caldo de fermentación un medio de fermentación, o bien medio nutriente, en el que se cultivó un microorganismo durante un cierto tiempo y a una cierta temperatura. El medio de fermentación, o bien los medios empleados durante la fermentación, contiene/contienen todas las sustancias, o bien componentes que aseguran una propagación del microorganismo y una formación del L-aminoácido deseado.

Una vez concluida la fermentación, el caldo de fermentación producido contiene correspondientemente

- 10 a) la biomasa (masa celular) de microorganismo producida debido a la propagación de las células de microorganismo,
- b) el L-aminoácido formado en el transcurso de la fermentación,
- c) los productos secundarios orgánicos formados en el transcurso de la fermentación, y
- 15 d) los componentes del medio de fermentación empleado, o bien de las sustancias de empleo, no consumidos por medio de la fermentación, como por ejemplo vitaminas, como biotina, o sales, como sulfato de magnesio.

A los productos secundarios orgánicos pertenecen sustancias que se generan, y en caso dado se excretan por los microorganismos empleados en la fermentación, además del L-aminoácido deseado. A éstos pertenecen también azúcares, como por ejemplo trehalosa.

- 20 El caldo de fermentación se extrae del recipiente de cultivo, o bien del depósito de fermentación, en caso dado se recoge y se emplea para poner a disposición un producto que contiene L-aminoácido en forma líquida o sólida. A tal efecto se emplea también la expresión "obtención del producto que contiene L-aminoácido". En el más sencillo de los casos, el caldo de fermentación que contiene L-aminoácido en sí mismo constituye el producto obtenido.

Mediante una o varias de las medidas seleccionadas a partir del grupo

- 25 a) eliminación parcial ($> 0\%$ a $< 80\%$) a completa (100%) o casi completa ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$) de agua,
- b) eliminación parcial ($> 0\%$ a $< 80\%$) a completa (100%) o casi completa ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$) de la biomasa, desactivándose la misma, en caso dado, antes de la eliminación,
- 30 c) eliminación parcial ($> 0\%$ a $< 80\%$) a completa (100%) o casi completa ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$, $\geq 99,7\%$) de productos secundarios orgánicos formados en el transcurso de la fermentación, y
- d) eliminación parcial ($> 0\%$) a completa (100%) o casi completa ($\geq 80\%$, $\geq 90\%$, $\geq 95\%$, $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$, $\geq 99\%$, $\geq 99,3\%$, $\geq 99,7\%$) de componentes del medio de fermentación empleado, o bien de las sustancias de empleo, no consumidos mediante la fermentación,
- 35

a partir del caldo de fermentación se obtiene una concentración, o bien purificación de L-aminoácido. De este modo se aíslan productos que presentan un contenido deseado en L-aminoácido.

La eliminación parcial ($> 0\%$ a $< 80\%$) a completa (100%) o casi completa ($\geq 80\%$ a $< 100\%$) de agua (medida a)) se denomina también secado.

- 40 Mediante eliminación completa o casi completa de agua, de biomasa, de productos secundarios orgánicos y de componentes no consumidos del medio de fermentación empleado se llega a formas de producto puras ($\geq 80\%$ en peso, $\geq 90\%$ en peso) o altamente puras ($\geq 95\%$ en peso, $\geq 97\%$ en peso, $\geq 99\%$ en peso) de L-aminoácido. Para las medidas según a), b), c) o d), en el estado de la técnica se encuentran disponibles un gran número de instrucciones técnicas.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: producción de alanina y valina mediante *C. humireducens*

5 Para la revisión de la producción de alanina y valina se cultivó la cepa del tipo de *C. humireducens* (DSM 45392) en la carga del matraz de agitación. A tal efecto se incubó la cepa *C. humireducens* en 10 ml de medio líquido BHI (infusión cerebro-corazón; Merck) (37 g/l de H₂O) como cultivo previo a 37°C con 200 rpm durante 24 h. A continuación se inocularon 10 ml de medio del matraz de agitación a una OD₆₆₀ de 0,2, y se cultivó a 37°C con 200 rpm, durante 48 h. Para la producción de este medio se disolvieron 20 g de sulfato amónico, 0,4 g de MgSO₄*7H₂O, 0,6 g KH₂PO₄ y 10 g de extracto de levadura en 750 ml de H₂O. El valor de pH de la disolución se ajustó a 7,8 con un 20 % de NH₄OH, y a continuación se trató la disolución en autoclave. A continuación se añadieron 4 ml de una disolución de vitaminas (pH 7 con NH₄OH), constituida por 0,25 g/l de tiamina, 50 mg/l de cianocobalamina, 25 mg/l de biotina y 1,25 g/l de piridoxina. Por lo demás se añadieron 140 ml de una disolución de glucosa al 50 % filtrada en medio estéril y 50 g de CaCO₃ tratado en autoclave en seco, y a continuación se completó el medio a un litro.

Tras el cultivo, del sobrenadante de cuatro cultivos paralelos se llevó a cabo respectivamente un análisis por HPLC para la determinación del contenido en alanina, glicina y valina con un límite de identificación de ≥0,01 g/l.

15 Después de 48 h de cultivo en medio de matraz de agitación a 37°C, 200 rpm, la cepa del tipo de *C. humireducens* produce en la medida del matraz de agitación alrededor de 0,81 g/l de alanina (rendimiento neto: 0,011 gAlanina/gGlucosa) y 1,6 g/l de valina (rendimiento neto: 0,022 gValina/gGlucosa) (Tab. 1). Se forma glicina como producto secundario apenas en cantidad reducida.

20 Tab. 1: valores analíticos de un ensayo en matraz de agitación con la cepa tipo de *C. humireducens*. Se indican los valores medidos tras el cultivo con células y los del medio vacío.

	Alanina (g/l)	Valina (g/l)
<i>C. humireducens</i>	1,27	1,9
Medio vacío sin células	0,46	0,3

Ejemplo 3: ensayo de rendimiento de glutamato

25 Para el ensayo de rendimiento de L-glutamato se cultivó la cepa del tipo de *C. humireducens* (DSM 45392) en la carga del matraz de agitación. A tal efecto se incubó la cepa *C. humireducens* en 10 ml de medio líquido BHI (infusión cerebro-corazón; Merck) (37 g/l H₂O) como cultivo previo a 37°C con 200 rpm durante 24 h. A continuación se inocularon 10 ml de medio del matraz de agitación a una OD₆₆₀ de 0,2, y se cultivaron a 37°C con 200 rpm, durante 48 h. Para la producción de este medio se disolvieron 20 g de sulfato amónico, 0,4 g de MgSO₄*7H₂O, 0,6 g de KH₂PO₄ y 10 g de extracto de levadura en 750 ml de H₂O. El valor de pH de la disolución se ajustó a 7,8 con un 20 % de NH₄OH, y a continuación se trató la disolución en autoclave. A continuación se añadieron 4 ml de una disolución de vitaminas (pH 7 con NH₄OH), constituida por 0,25 g/l de tiamina, 50 mg/l de cianocobalamina, 25 mg/l de biotina y 1,25 g/l de piridoxina. Por lo demás se añadieron 140 ml de una disolución de glucosa al 50 % filtrada en medio estéril y 50 g de CaCO₃ tratado en autoclave en seco. A continuación se añadieron otros 5 ml de una disolución madre de treonina 400 mM filtrada en medio estéril, y a continuación se completó el medio a un litro.

35 Tras el cultivo, del sobrenadante de cuatro cultivos paralelos respectivamente se llevó a cabo un análisis por HPLC para la determinación del contenido en glutamato con un límite de identificación de ≥0,01 g/l.

Después de 48 h de cultivo en medio de matraz de agitación a 37°C, 200 rpm en la medida del matraz de agitación, la cepa del tipo de *C. humireducens* produjo 1,8 (+/-0,6) g/l de L-glutamato. La concentración inicial de L-glutamato en el medio se situaba en 0,78 (+/-0,1) g/l. Se forma glicina como producto secundario apenas en cantidad reducida.

REIVINDICACIONES

1.- Sistema que disocia glicina que comprende las enzimas GcvP, GcvT y GcvH, caracterizado por que comprende al menos uno de los siguientes polipéptidos:

- 5
- a) una enzima GcvP con una identidad secuencial de al menos un 80 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 40,
 - b) una enzima GcvT con una identidad secuencial de al menos un 80 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 42,
 - c) una enzima GcvH con una identidad secuencial de al menos un 80 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 38.

10 2.- Sistema que disocia glicina según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende al menos dos, preferentemente los tres polipéptidos citados anteriormente.

3.- Sistema que disocia glicina según la reivindicación 2, caracterizado por que comprende los siguientes polipéptidos:

- 15
- a) una enzima GcvP con una identidad secuencial de al menos un 95 o un 98 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 40,
 - b) una enzima GcvT con una identidad secuencial de al menos un 95 o un 98 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 42,
 - c) una enzima GcvH con una identidad secuencial de al menos un 95 o un 98 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 38.

20 4.- Sistema que disocia glicina según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que comprende al menos un polipéptido ulterior, seleccionado a partir del grupo constituido por:

- a) una enzima LipA con una identidad secuencial de al menos un 80 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 48,
- 25 b) una enzima LipB con una identidad secuencial de al menos un 80 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 50,
- c) una enzima Lpd con una identidad secuencial de al menos un 80 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 52,
- d) una enzima LplA con una identidad secuencial de al menos un 80 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 94,
- 30 e) una enzima GcvL con una identidad secuencial de al menos un 80 % respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 96.

5.- Polipéptidos que representan las enzimas de un sistema que disocia glicina, seleccionado a partir del grupo constituido por:

- 35
- a) una enzima GcvP con una identidad secuencial de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, un 94, un 96 o un 98 %, sobre todo un 100%, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 40,
 - b) una enzima GcvT con una identidad secuencial de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 o un 90 %, en especial al menos un 92, un 94, un 96 o un 98 %, sobre todo un 100%, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 42,
 - 40 c) una enzima GcvH con una identidad secuencial de al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 o

un 90 %, en especial al menos un 92, un 94, un 96 o un 98 %, sobre todo un 100%, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 38.

6.- Polinucleótidos que codifican para enzimas de un sistema que disocia glicina, seleccionado a partir del grupo constituido por:

- 5 a) un polinucleótido (gcvP), que codifica para la enzima GcvP y presenta una identidad secuencial de al menos un 70 o un 75 %, preferentemente al menos un 80 o un 85 %, en especial al menos un 90 a un 95 %, sobre todo al menos un 98 o un 100 %, respecto a la secuencia de posición 301 a 3162 según SEQ ID NO: 39, y/o se hibrida bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido, cuya secuencia es complementaria a la secuencia de posición 301 a 3162 según SEQ ID NO: 39;
- 10 b) un polinucleótido (gcvT), que codifica para la enzima GcvT y presenta una identidad secuencial de al menos un 70 o un 75 %, preferentemente al menos un 80 o un 85 %, en especial al menos un 90 o un 95 %, sobre todo al menos un 98 o un 100 %, respecto a la secuencia de posición 301 a 1404 según SEQ ID NO: 41, y/o se hibrida bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido, cuya secuencia es complementaria a la secuencia de posición 301 a 1404 según SEQ ID NO: 41;
- 15 c) un polinucleótido (gcvH), que codifica para la enzima GcvH y presenta una identidad secuencial de al menos un 70 o un 75 %, preferentemente al menos un 80 o un 85 %, en especial al menos un 90 o un 95 %, sobre todo al menos un 98 o un 100 %, respecto a la secuencia de posición 301 a 699 según SEQ ID NO: 37, y/o se hibrida bajo condiciones restrictivas con un polinucleótido, cuya secuencia es complementaria a la secuencia de posición 301 a 699 según SEQ ID NO: 37.

20 7.- Vector, caracterizado por que comprende al menos un polinucleótido, preferentemente al menos dos o tres polinucleótidos, según la reivindicación 6.

25 8.- Microorganismo recombinante, caracterizado por que comprende al menos un sistema que disocia glicina según una de las reivindicaciones 1 a 4, y/o polinucleótidos codificantes para tal sistema que disocia glicina y/o al menos un polipéptido según la reivindicación 5 y/o un polinucleótido que codifica para tal polipéptido, o bien polinucleótidos que codifican para tales polipéptidos y/o al menos un polinucleótido según la reivindicación 6 y/o un vector según la reivindicación 7.

9.- Microorganismo recombinante según la reivindicación 8, caracterizado por que el sistema que disocia glicina y/o los polinucleótidos que codifican para éste se presentan en forma sobreexpresada.

30 10.- Microorganismo recombinante según la reivindicación 8 o 9, caracterizado por que se trata de una cepa de superproducción de L-metionina y por que presenta preferentemente al menos dos o tres, de modo especialmente preferente al menos cuatro o cinco de las siguientes características:

- a) un polinucleótido debilitado (mcbR), que codifica para un dominio de enlace de ADN de tipo HTH tetR (McbR), preferentemente para un dominio de enlace de ADN con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 2,
- 35 b) un polinucleótido debilitado (thrB-Gen), que codifica para una homoserina quinasa (ThrB, EC 2.7.1.39), preferentemente para una homoserina quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 4,
- 40 c) un polinucleótido debilitado (pgi), que codifica para una Glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi, EC 5.3.1.9), preferentemente para una glucosa-6-fosfato isomerasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 6,
- d) un polinucleótido debilitado (pck), que codifica para una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Pck, EC 4.1.1.32), preferentemente para una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 8,
- 45 e) un polinucleótido debilitado (metQ), que codifica para una lipoproteína que enlaza D-metionina (MetQ), preferentemente para una lipoproteína que enlaza D-metionina con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 10,
- f) un polinucleótido debilitado (metP), que codifica para un transportador de metionina (MetP),

preferentemente para un transportador de metionina con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 12,

5 g) un polinucleótido debilitado (metN), que codifica para un transportador de metionina dependiente de ATP (MetN), preferentemente para un transportador de metionina dependiente de ATP con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 14,

h) un polinucleótido debilitado (metK), que codifica para una S-adenosilmetionina sintasa (MetK), preferentemente para una S-adenosilmetionina sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 16,

10 i) un polinucleótido debilitado (metI), que codifica para una metionina-sistema de importación-permeasa (MetI), preferentemente para una metionina-sistema de importación-permeasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 18,

15 j) un polinucleótido debilitado (dapA), que codifica para una 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa (DapA), preferentemente para una 4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 20,

k) un polinucleótido sobreexpresado (CBS), que codifica para una cisteína sintasa (CBS), preferentemente para una cisteína sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 22,

20 l) un polinucleótido debilitado, que codifica para un homólogo de cg3031, preferentemente para un homólogo de cg3031 con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 24,

25 m) un polinucleótido sobreexpresado (aecD), que codifica para una cistationina betaliasa (AecD), preferentemente para una cistationina betaliasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 26,

n) un polinucleótido sobreexpresado (asd), que codifica para una aspartato semialdehído deshidrogenasa (Asd), preferentemente para una aspartato semialdehído deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 28,

30 o) un polinucleótido sobreexpresado (metH), que codifica para eine 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína-transferasa (MetH, EC 2.1.1.13),

35 p) un polinucleótido sobreexpresado (brnE), que codifica para la menor subunidad de un transportador para aminoácidos de cadena ramificada (BrnE), preferentemente para una subunidad con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 30,

q) un polinucleótido sobreexpresado (brnF), que codifica para la mayor subunidad de un transportador para aminoácidos de cadena ramificada (BrnF), preferentemente para una subunidad con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 32,

40 r) un polinucleótido sobreexpresado (cysE), que codifica para una serina acetiltransferasa (CysE), preferentemente para una serina acetiltransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 34,

45 s) un polinucleótido sobreexpresado (cysK), que codifica para una cisteína sintasa (CysK), preferentemente para una cisteína sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 36,

t) un polinucleótido sobreexpresado (glyA), que codifica para una serina hidroximetiltransferasa (GlyA), preferentemente para una serina hidroximetiltransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90,

un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 44,

5 u) un polinucleótido sobreexpresado (hom), que codifica para una homoserina deshidrogenasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (Hom), preferentemente para una homoserina deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 46,

v) un polinucleótido sobreexpresado (lysC), que codifica para una aspartato quinasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (LysC), preferentemente para una aspartato quinasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 54,

10 w) un polinucleótido sobreexpresado (metB), que codifica para una cistationina gamma-sintasa (MetB), preferentemente para una cistationina-gamma-sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 56,

15 x) un polinucleótido sobreexpresado (metF), que codifica para una 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MetF), preferentemente para una 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 58,

y) un polinucleótido sobreexpresado (metX), que codifica para una homoserina-O-acetiltransferasa (MetX), preferentemente para una homoserina-O-acetiltransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 60,

20 z) un polinucleótido sobreexpresado (metY), que codifica para una O-acetilhomoserina-liasa (MetY), preferentemente para una O-acetilhomoserina-liasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 62,

aa) un polinucleótido sobreexpresado (pyc), que codifica para una piruvato carboxilasa (Pyc), preferentemente para una piruvato carboxilasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 64,

25 bb) un polinucleótido sobreexpresado (serA), que codifica para una D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa, en caso dado resistente a retroalimentación, (SerA), preferentemente para una D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 66,

30 cc) un polinucleótido sobreexpresado (serB), que codifica para una fosfoserina fosfatasa (SerB), preferentemente para una fosfoserina fosfatasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 68,

dd) un polinucleótido sobreexpresado (serC), que codifica para una fosfoserina aminotransferasa (SerC), preferentemente para una fosfoserina aminotransferasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 70,

35 ee) un polinucleótido sobreexpresado (ald), que codifica para una alanina deshidrogenasa (Ald), preferentemente para una alanina deshidrogenasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 72,

40 ff) un polinucleótido sobreexpresado (cysD), que codifica para la subunidad de una sulfato adeniltransferasa (CysD), preferentemente para una subunidad con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 74,

gg) un polinucleótido sobreexpresado (cysH), que codifica para una adenosina fosfosulfato reductasa (CysH), preferentemente para una adenosina fosfosulfato reductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 76,

45 hh) un polinucleótido sobreexpresado (cysI), que codifica para una sulfito reductasa (CysI), preferentemente para una sulfito reductasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 78,

- ii) un polinucleótido sobreexpresado (*cysJ*), que codifica para (*CysJ*), preferentemente para una con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 80,
- 5 jj) un polinucleótido sobreexpresado (*cysN*), que codifica para la subunidad de una sulfato adenililtransferasa (*CysN*), preferentemente para una subunidad con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 82,
- kk) un polinucleótido sobreexpresado (*cysY*), que codifica para una cistationina beta-sintasa (*CysY*), preferentemente para una cistationina beta-sintasa con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 84,
- 10 ll) un polinucleótido sobreexpresado (*cysZ*), que codifica para un transportador de sulfato putativo (*CysZ*), preferentemente para un transportador de sulfato con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 86,
- 15 mm) un polinucleótido sobreexpresado (*metE*), que codifica para una 5-metiltetrahidropteril-triglutamato homocisteína metiltransferasa (*MetE*), preferentemente para una proteína con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 88,
- nn) un polinucleótido sobreexpresado (*ptH1*), que codifica para una peptidil-tARN hidrolasa 1 (*PtH1*), preferentemente para una peptidil-tARN hidrolasa 1 con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 90,
- 20 oo) un polinucleótido sobreexpresado (*ptH2*), que codifica para una peptidil-tARN hidrolasa 2 (*PtH2*), preferentemente para una peptidil-tARN hidrolasa 2 con una identidad secuencial de al menos un 90, un 95 o un 98 %, preferentemente un 100 %, respecto a la secuencia según SEQ ID NO: 92.
- 11.- Microorganismo recombinante según una de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizado por que se trata de una bacteria corineforme, en especial de un *Corynebacterium*, preferentemente de *C. glutamicum* o *C. humireducens*.
- 25 12.- Procedimiento para la sobreproducción de un L-aminoácido, caracterizado por que, en este procedimiento, se emplea un sistema que disocia glicina según una de las reivindicaciones 1 a 4 y/o al menos un polipéptido según la reivindicación 5 y/o al menos un polinucleótido según la reivindicación 6 y/o un vector según la reivindicación 7 y/o un microorganismo recombinante según una de las reivindicaciones 8 a 11.
- 30 13.- Procedimiento según la reivindicación precedente, caracterizado por que el L-aminoácido sobreproducido se selecciona a partir de de L-alanina, L-valina, L-aminoácidos de la familia de glutamato, en especial L-glutamato, L-glutamina, L-prolina y L-arginina, así como L-aminoácidos de la familia de aspartato, en especial L-aspartato, L-asparagina, L-metionina, L-lisina, L-isoleucina y L-treonina.
- 14.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que, en el caso del L-aminoácido sobreproducido, se trata de L-metionina.
- 35 15.- Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que se forman cantidades apenas reducidas de glicina como producto secundario.