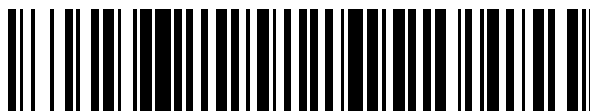


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 000**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01)

C12N 15/77 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2015 PCT/KR2015/010768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16060437**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2015 E 15850829 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 3153573**

54 Título: **Microorganismo del género *Corynebacterium* para producir L-arginina y método de producción de L-arginina utilizando el mismo**

30 Prioridad:

13.10.2014 KR 20140137794

29.05.2015 KR 20150076331

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

05.09.2019

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 04560, KR

72 Inventor/es:

BAE, HYUN AE;
LEE, HAN HYOUNG;
KANG, MIN GYEONG;
KIM, JONG HYUN y
KIM, HYE WON

74 Agente/Representante:

CAMPello ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 724 000 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismo del género *Corynebacterium* para producir L-arginina y método de producción de L-arginina utilizando el mismo

5

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene la capacidad de producir L-arginina y un método para producir L-arginina utilizando el mismo.

10

[Técnica antecedente]

La L-arginina es un aminoácido ampliamente utilizado en los complementos de aminoácidos, medicamentos farmacéuticos, alimentos, etc., y ha habido demanda para el desarrollo de una producción eficiente de L-arginina en las industrias relacionadas.

15

El método para producir L-arginina por un método de fermentación biológica convencional es un método para producir L-arginina directamente a partir de fuentes de carbono y nitrógeno, y se han indicado diversos métodos que incluyen un método que utiliza una cepa modificada inducida de un microorganismo del género *Brevibacterium* o *Corynebacterium*, un método que utiliza una línea celular bacteriana desarrollada para tener una capacidad mejorada de producción de aminoácidos por fusión celular, etc. Recientemente, se inactivó un método para usar una cepa genética recombinante, en la que se inactivó un gen que inhibe la expresión del operón de biosíntesis de arginina *argR* (Patente de Estados Unidos N.º 7.160.705), y un método para usar la sobreexpresión de *argF* en el operón de arginina (Patente coreana N.º 10-0854234), etc. En particular, la eliminación en *argR*, que controla el operón de arginina, se ha considerado como un factor importante en la producción de arginina.

20

25

De acuerdo con los hechos conocidos hasta ahora, en un microorganismo de *Corynebacterium*, el gen *argCJBDFR*, que está involucrado en la biosíntesis de arginina, se constituye en forma de un operón y se somete a una inhibición por retroalimentación por arginina intracelular (Vehary Sakanyan, et al., Microbiology, 142:9-108, 1996), lo que impone una limitación en su producción de L-arginina de alto rendimiento.

30

[Descripción]**[Problema técnico]**

35

Por consiguiente, los presentes inventores, mientras intentan aumentar el rendimiento de producción de L-arginina, descubrieron que la L-arginina puede producirse con un rendimiento mayor en comparación con la cepa parental productora de L-arginina, mejorando las actividades del operón de arginina y la ornitina carbamoiltransferasa, sin ninguna eliminación en el represor de arginina (*argR*), que se ha conocido convencionalmente como un factor importante, completando de este modo la presente invención.

40

[Solución técnica]

Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene la capacidad de producir L-arginina.

45

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir L-arginina usando el microorganismo del género *Corynebacterium*.

[Efectos ventajosos]

50

La L-arginina se puede producir con alto rendimiento usando un microorganismo productor de L-arginina del género *Corynebacterium* con actividades mejoradas de un operón de arginina y ornitina carbamoiltransferasa (*ArgF* o *ArgF2*) de acuerdo con la presente invención. Además, la L-arginina producida con alto rendimiento se puede utilizar eficazmente en las industrias farmacéutica y farmacológica humana.

55

[Mejor modo]

En un aspecto para lograr los objetos identificados anteriormente, la presente invención proporciona un

microorganismo del género *Corynebacterium* capaz de producir L-arginina con actividades mejoradas de un operón de arginina y ornitina carbamoiltransferasa.

En la presente invención, el operón de arginina es un operón que consiste en enzimas involucradas en el mecanismo de biosíntesis de L-arginina, y en particular, el operón de arginina consiste en enzimas que constituyen las etapas cíclicas de la biosíntesis de L-arginina. Específicamente, el operón de arginina consiste en N-acetilglutamato fosfato reductasa (*ArgC*), glutamato N-acetiltransferasa (*ArgJ*), N-acetilglutamato cinasa (*ArgB*), acetilornitina aminotransferasa (*ArgD*), ornitina carbamoiltransferasa (*ArgF*), y el represor de arginina (*ArgR*), y estas enzimas están involucradas en las reacciones enzimáticas continuas de la biosíntesis de L-arginina.

Estas enzimas que constituyen el operón de arginina están implicadas en la biosíntesis final de L-arginina utilizando L-glutamato como un precursor. La glutamato N-acetiltransferasa (*ArgJ*) sintetiza N-acetilglutamato utilizando L-glutamato como precursor, y puede ser uno codificado por el gen *argJ*. En particular, el grupo acetilo se obtiene descomponiendo N-acetilornitina en L-ornitina. Se sabe que la glutamato N-acetiltransferasa participa en una reacción de reciclaje para la biosíntesis de L-arginina en microorganismos que pertenecen al género *Corynebacterium*.

El N-acetilglutamato producido se sintetiza en N-acetilglutamato fosfato por N-acetilglutamato cinasa (*ArgB*), el ADP se produce al consumir ATP como coenzima, y puede ser uno codificado por el gen *argB*. Debido a que se sabe que está sujeto a inhibición por retroalimentación por parte del producto final, L-arginina, se conocen modificaciones que liberan la inhibición por retroalimentación por L-arginina, y había informes de que la productividad de L-arginina puede mejorarse utilizando la misma (Patente China N.º 102021154, y Amino Acids. 2012 Jul;43(1): 255-66. doi: 10.1007/s00726-011-1069-x. Epub 8 de sept. de 2011).

La N-acetilglutamato fosfato reductasa (*ArgC*) también se denomina acetilglutamato semialdehído deshidrogenasa en *E. coli* o levaduras, y puede estar codificada por el gen *argC*. El N-acetilglutamato fosfato se convierte en N-acetilglutamato 5-semialdehído por esta enzima. Se utiliza NADPH como una coenzima para suministrar energía. El 5-semialdehído N-acetilglutamato producido se convierte en N-acetilornitina usando L-glutamato como donante de aminoácidos, y esta reacción está mediada por la acetilornitina aminotransferasa (*ArgD*). La acetilornitina aminotransferasa puede estar codificada por el gen *argD*. La N-acetilornitina convertida administra su grupo acetilo a L-glutamato mediante la reacción de reciclaje de la glutamato N-acetiltransferasa (*ArgJ*), y reacciona como L-ornitina.

La ornitina carbamoiltransferasa (*ArgF*) se denomina generalmente ornitina carbamoilasa, y puede codificarse por los genes *argF* o *argF2*. La L-ornitina se une al fosfato de carbamoilo para formar L-citrulina, y se produce un fosfato como producto de reacción secundaria. La L-citrulina producida finalmente se sintetiza en L-arginina por las reacciones enzimáticas de ácido argininosuccínico sintasa (*ArgG*) y ácido argininosuccínico liasa (*ArgH*), que están presentes separadas del operón de arginina, mencionado anteriormente. La L-arginina se sintetiza mediante un total de 8 etapas biosintéticas, y en la presente invención, el aumento de la productividad de L-arginina se indujo mediante el fortalecimiento de la actividad del operón de arginina (*argCJBDFR*).

Las enzimas que constituyen el operón de arginina pueden incluirse dentro del alcance de la presente invención siempre que tengan las actividades descritas anteriormente, y específicamente, las enzimas pueden ser proteínas derivadas de un microorganismo del género *Corynebacterium*. Más específicamente, la glutamato N-acetiltransferasa (*ArgJ*) puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19, o una secuencia de aminoácidos que tenga una homología con la secuencia de al menos el 70%, específicamente el 80%, y más específicamente el 90% o más. La N-acetilglutamato cinasa (*ArgB*) puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21, o una secuencia de aminoácidos que tenga una homología de al menos el 70% con la secuencia, específicamente el 80%, y más específicamente el 90% o más. Además, en el caso de la enzima correspondiente, se pueden introducir modificaciones conocidas en la técnica para liberar la inhibición por retroalimentación mediante arginina. La N-acetilglutamato fosfato reductasa (*ArgC*) puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23, o una secuencia de aminoácidos que tenga una homología de al menos el 70% con la secuencia, específicamente el 80%, y más específicamente el 90% o más. La acetilornitina aminotransferasa (*ArgD*) puede incluir la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25, o una secuencia de aminoácidos que tenga una homología de al menos el 70% con la secuencia, específicamente el 80%, y más específicamente el 90% o más. La ornitina carbamoiltransferasa (*ArgF*) puede incluir una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3, o puede incluir una secuencia de aminoácidos que tenga una homología de al menos el 70% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. Específicamente, la ornitina carbamoiltransferasa (*ArgF*) puede incluir una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 75%, 80%, 85%, 90%,

95%, 96%, 97%, 98 %, o el 99% o superior a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. Además, es obvio que las secuencias de aminoácidos que incluyen una delección, modificación, sustitución o adición en uno o más residuos de aminoácidos, están dentro del alcance de la presente invención, siempre que tengan la homología con las proteínas anteriores y tengan sustancialmente la misma actividad biológica o la actividad correspondiente con respecto a las proteínas anteriores.

Como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere al grado de similitud entre dos secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos para comparación, y su homología se puede determinar por comparación a simple vista o utilizando un algoritmo bioinformático, que proporciona resultados de análisis de un grado de homología mediante el alineamiento de secuencias para la comparación. La homología entre las dos secuencias de aminoácidos se puede indicar en porcentajes. Los algoritmos automatizados útiles se pueden utilizar en los módulos de software informático GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA de Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, Madison, WI, EE. UU.). Otros algoritmos útiles y determinaciones de homología en alineamiento ya están automatizados en software tal como FASTP, BLAST, BLAST2, PSIBLAST y CLUSTALW.

En la presente invención, la mejora de la actividad del operón de arginina puede referirse a la mejora de la actividad en al menos una enzima entre las enzimas presentes en el operón de arginina, sin embargo, no incluye la mejora única del gen *argR* en solitario. Por ejemplo, la mejora de la actividad del operón de arginina puede referirse a la mejora de las actividades de todas las enzimas presentes en el operón a través de la mejora del promotor para una enzima presente en el operón de arginina, y específicamente, puede referirse a la mejora de la actividad de todo el operón por el aumento del promotor de la N-acetilglutamil fosfato reductasa. Además, en la presente invención, el aumento en la expresión de un gen que codifica al menos una enzima entre las enzimas que constituyen el operón de arginina también puede considerarse como el aumento de la actividad del operón de arginina.

Como se usa en el presente documento, el término "mejora" de actividad se refiere a la provisión de un microorganismo sin una actividad particular de una proteína con la actividad de la proteína, o el aumento de la actividad intracelular en el microorganismo que posee la actividad de la proteína, etc., y se refiere al aumento de la actividad intracelular de la proteína en comparación con la actividad intrínseca de la proteína. Como se usa en el presente documento, el término actividad intrínseca se refiere al estado activo de la enzima que se posee en estado natural o pre-modificado por el microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium*.

Para mejorar o aumentar la actividad de la enzima, pueden ser aplicables diversos métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos del método, aunque no están limitados al mismo, pueden incluir un método para aumentar el número de copias de secuencias de nucleótidos que codifican enzimas insertando adicionalmente un polinucleótido que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima correspondiente en un cromosoma o introduciendo el polinucleótido en un sistema vectorial, etc., un método para reemplazar promotores enzimáticos con promotores fuertes, y específicamente, puede incluir un método para introducir una modificación en los promotores, y un método para modificar la enzima en uno con actividad fuerte por modificación genética.

Los ejemplos específicos en la presente invención pueden incluir un método para modificar el promotor enzimático presente en el operón de arginina con respecto a un promotor que es fuerte en comparación con el promotor endógeno, a través de la modificación o sustitución del promotor. Se puede conectar un promotor mejorado o un promotor heterogéneo con una modificación de sustitución de nucleótidos en lugar del promotor para la enzima endógena, y los ejemplos de los promotores heterogéneos pueden incluir el promotor pcj7 (Patente coreana N.º 10-0620092), promotor lysCP1 (Patente coreana N.º 10-0930203), promotor EF-Tu, promotor groEL, promotor aceA, promotor aceB, etc., pero sin limitación a los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico no codificada aguas arriba de una región codificante, que incluye una región de unión a la polimerasa y tiene una actividad de inicio de la transcripción en ARNm de un gen aguas abajo del promotor, es decir, la región de ADN donde la polimerasa se une e inicia la transcripción del gen, y se encuentra en la región 5' de la región de inicio de la transcripción del ARNm.

En la presente invención, la mejora de la actividad de la ornitina carbamoiltransferasa se puede llevar a cabo utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica, y son los mismos que se describen anteriormente. Específicamente, la mejora se puede lograr mediante la transformación de un vector de expresión que incluye un polinucleótido que codifica la ornitina carbamoiltransferasa en una cepa bacteriana, pero no se limita a lo mismo.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a una introducción de ADN en un

huésped, haciendo así replicable el ADN insertado como un factor extracromosómico o por integración cromosómica. Específicamente, el transformante de la presente invención puede insertarse en un cromosoma mediante recombinación homóloga entre la secuencia de una molécula de ácido nucleico, que tiene la actividad promotora dentro de un vector después de la transformación del vector que incluye el ADN anterior en una célula huésped, y la secuencia en la región promotora del gen diana endógeno, o puede retenerse en forma de un plásmido.

El método de transformación de vectores de la presente invención puede incluir cualquier método que pueda introducir un ácido nucleico en una célula, y cualquier tecnología estándar apropiada conocida en la técnica puede seleccionarse y llevarse a cabo de acuerdo con cada célula huésped. Por ejemplo, puede usarse electroporación, precipitación con fosfato de calcio (CaPO_4), precipitación con cloruro de calcio (CaCl_2), microinyección, un método de polietilenglicol (PEG), un método de DEAE-dextrano, un método de liposomas catiónicos, un método de acetato de litio/DMSO, etc., pero el método no se limita a los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "un microorganismo del género *Corynebacterium* (*Corynebacterium* sp.)" puede referirse a todas las cepas que pertenecen al género *Corynebacterium* que tienen la capacidad de producir L-arginina, por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium fermentum*, etc., pero sin limitación a las mismas. Específicamente, se puede usar *Corynebacterium glutamicum*, pero el microorganismo no se limita a la misma.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir L-arginina que incluye el cultivo de un microorganismo productor de L-arginina del género *Corynebacterium* en medios de cultivo apropiados.

En la presente invención, el cultivo de microorganismos puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos ampliamente conocidos en la técnica, y las condiciones de temperatura de cultivo, horas de cultivo, pH del medio de cultivo, etc., pueden ajustarse de manera apropiada. Los métodos de cultivo conocidos se describen en detalle en las referencias (Chmiel; Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), y Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)). Adicionalmente, los métodos de cultivo pueden incluir cultivo discontinuo, cultivo continuo y cultivo alimentado por lotes, y específicamente, los cultivos pueden llevarse a cabo continuamente por un proceso discontinuo o alimentado por lotes o alimentado por lotes repetido, pero no se limitan a los mismos.

Los medios de cultivo a usar deben cumplir de manera apropiada las condiciones requeridas de una cepa particular. Los medios de cultivo utilizados para diversos microorganismos ya son conocidos (por ejemplo, "Manual of Methods for General Bacteriology" from American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981)). Las fuentes de carbono que deben estar contenidas en los medios pueden incluir sacáridos y carbohidratos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melaza, almidón y celulosa), aceites y grasas (por ejemplo, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de cacahuete y aceite de coco), ácidos grasos (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico), alcoholes (por ejemplo, glicerol y etanol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético), etc. Estos materiales se pueden usar individualmente o como una mezcla, pero sin limitación a los mismos. Las fuentes de nitrógeno a contener en el medio pueden incluir compuestos orgánicos que contienen nitrógeno (por ejemplo, peptona, extracto de levadura, salsa de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz, polvo de harina de soja y urea), y compuestos inorgánicos (por ejemplo, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio), y estos materiales también se pueden usar individualmente o como una mezcla, pero sin limitación a los mismos. Las fuentes de fósforo que deben estar contenidas en el medio pueden incluir dihidrógeno fosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico o una sal equivalente que contenga sodio del mismo, pero sin limitación a los mismos. Los medios de cultivo pueden contener sales metálicas esenciales para el crecimiento (por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro), y se pueden usar materiales esenciales que promueven el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas, además de los materiales descritos anteriormente. Además, se puede añadir un precursor apropiado a los medios de cultivo. Los materiales a suministrar descritos anteriormente se pueden añadir a los medios de una vez o de manera apropiada durante el cultivo.

El pH del medio de cultivo puede ajustarse de manera apropiada utilizando un compuesto básico (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoniaco) o un compuesto ácido (por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico).

La espumación se puede ajustar usando un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso. Una

condición aerobia se puede mantener introduciendo oxígeno o una mezcla de gases que contiene oxígeno, por ejemplo, aire, en un medio de cultivo. La temperatura de cultivo puede ser de 20°C a 45°C, y específicamente, de 25°C a 40°C. El cultivo puede continuarse hasta que se obtenga una cantidad máxima de la producción de L-aminoácido deseada, y específicamente de 10 horas a 160 horas. La L-arginina se puede liberar en el medio de cultivo o puede permanecer contenida en la célula.

Mientras tanto, el método para producir L-arginina de la presente invención, que incluye el cultivo del microorganismo descrito anteriormente, puede incluir además una etapa de recuperación de L-arginina durante el cultivo. Es decir, el método para producir L-arginina de la presente invención puede incluir cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* en medios de cultivo y recuperar la L-arginina del microorganismo y los medios de cultivo. La etapa de recuperación de arginina puede significar separar la arginina de las células o los medios de cultivo utilizando un método de recuperación de arginina ampliamente conocido en la técnica. Los métodos de recuperación de L-arginina pueden incluir centrifugación, filtración, extracción, pulverización, secado, evaporación, precipitación, cristalización, electroforesis, disolución fraccional, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofobicidad, exclusión por tamaño y cromatografía líquida de alto rendimiento), etc., pero sin limitación a los mismos.

[Modo de la invención]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y la invención no pretende limitarse por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Construcción de un vector con un operón de arginina mejorado

Con el fin de mejorar el operón de arginina en el cromosoma de un microorganismo, se construyó un vector en el que se eliminó el autopromotor de la N-acetilglutamil fosfato reductasa (*ArgC*) y se substituyó con un promotor diferente. Como promotor de sustitución, se utilizó *lysCP1* (SEQ ID NO: 18 divulgada en la Patente coreana N.º 10-0930203), que tiene una fuerte actividad inductora de la expresión.

Primero, los fragmentos de ADN se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa primaria (PCR) utilizando el ADN cromosómico de una cepa de tipo salvaje de *Corynebacterium glutamicum* (N.º de Acceso: ATCC13869) como plantilla, junto con un par de cebadores de SEQ ID NO: 13 (cebador de infusión SF_pargC_PR_pDC; 5'-CGAGCTCGGTACCCGGCAAAGAATACGGCTTCCTTGGC-3') y SEQ ID NO: 14 (cebador de infusión/enzima de restricción SR_pargC_PR_XbaI-XhoI-BamHI; 5'-CTGGATCCTCGAGTCTAGAGACGGGTTAGACATGCAAAA-3') y un par de cebadores de SEQ ID NO: 15 (cebador de infusión/enzima de restricción SF_pargC_PR_SpeI-ScaI-BamHI; 5'-GACTCGAGGATCCAGTACTAGTATGATAATCAAGGTTGCAAT-3') y SEQ ID NO: 16 (cebador de infusión SR_pargC_PR_pDC; 5'-TGCAGGTCGACTCTAGGGTAACGCCTTCTTCAAAG-3'). Las condiciones específicas para la reacción de PCR fueron las siguientes: la reacción de PCR se realizó mediante desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, y alargamiento a 72°C durante 1 minuto utilizando un dispositivo de PCR (termociclador Bio-rad C1000) y polimerasa Pfu (Macrogen), y se repite durante 28 ciclos.

Los fragmentos de PCR primarios obtenidos de este modo se purificaron usando el kit de purificación de ADN de fragmentos (GeneAll), y después se conectaron tres fragmentos de ADN mezclándolos con un vector pD, que ya se preparó mediante digestión con enzimas de restricción XmaI-XbaI. Los fragmentos de ADN conectados se sometieron a una reacción a 50°C durante 10 minutos utilizando el kit de clonación In-fusion (Clontech) y, por lo tanto, se construyó un vector pD-RargC_PR.

La inserción del promotor de sustitución se realizó de tal manera que el promotor *lysCP1* se amplificó usando el pDZ-*lysCP1* (Patente coreana 10-0930203) como plantilla junto con un par de cebadores de SEQ ID NO: 5 (cebador de infusión SF_PlysCP1_XhoI-XbaI; 5'-CCGTCTCTAGACTCGAGCCATCTTTTGGGGTGCGG-3') y SEQ ID NO: 6 (cebador de infusión SR_PlysCP1_SpeI; 5'-TTGATTATCATACTAGTCTTTGTGCACCTTTTCGAT-3'), y se conectó mezclándolos con un vector pD-PargC_PR, que ya se había preparado por digestión con enzimas de restricción XhoI-SpeI. Los métodos de PCR y clonación In-Fusion son los mismos que los descritos anteriormente, y finalmente se construyó un vector pD-PargC::lysCP1 a través de los métodos.

Ejemplo 2: Construcción de un vector con ornitina carbamoiltransferasa mejorada

Para mejorar la ornitina carbamoiltransferasa, una de las enzimas de biosíntesis de arginina, se construyó un vector de expresión recombinante. Se usó p117-cj7-GFP (Patente coreana N.º 10-0620092) como el vector de plantilla, y la secuencia de nucleótidos que codifica GFP en el vector de plantilla se eliminó mediante tratamiento con enzimas de restricción EcoRV-Xba I, y se insertó con *argF*, derivado de una cepa de tipo salvaje de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869, y *argF2* (Patente Coreana N.º 10-0830290).

Los fragmentos de ADN del gen *argF* se amplificaron mediante PCR utilizando el ADN cromosómico de una cepa de tipo salvaje de *Corynebacterium glutamicum* (N.º de acceso: ATCC13869) como plantilla, junto con un par de cebadores de SEQ ID NO: 7 (cebador de infusión SF_argF_EcoRV; 5'-ACGAAAGGAAACACTCGATATCATGACTTCACAACACAGGT-3') y SEQ ID NO: 8 (cebador de infusión SR_argF_XbaI; 5'-GCCAAAACAGCTCTAGATTACCTCGGCTGGTGGGCCA-3'). La reacción de PCR se realizó por desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, y alargamiento a 72°C durante 2 minutos utilizando polimerasa Pfu, y se repitió durante 28 ciclos. Los fragmentos de PCR obtenidos de este modo se purificaron y se mezclaron con p117-cj7-GFP, que ya se había tratado con enzimas de restricción EcoRV-XbaI, y se conectaron mediante el método de clonación In-Fusion, y por lo tanto, se construyó un vector de expresión recombinante, p117-Pcj7-*argF*.

El gen *argF* se amplificó a través de PCR utilizando el ADN cromosómico de una cepa de tipo salvaje de *Corynebacterium glutamicum* (N.º de acceso: ATCC13032) como plantilla, junto con un par de cebadores de SEQ ID NO: 9 (cebador de infusión SF_argF2_EcoRV; 5'-ACGAAAGGAAACACTCGATATCATGGCCAGAAAACATCTGCT-3') y SEQ ID NO: 10 (cebador de infusión SR_argF2_XbaI; 5'-GCCAAAACAGCTCTAGACTACGCATTGATCGACCGAG-3') y polimerasa Pfu (Macrogen), a través de PCR por desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, y alargamiento a 72°C durante 2 minutos usando polimerasa Pfu, que se repitió durante 28 ciclos. Los fragmentos de PCR obtenidos de este modo se purificaron y se mezclaron con p117-cj7-GFP, que ya se había tratado con enzimas de restricción EcoRV-XbaI, y se conectaron mediante el kit de clonación In-Fusion, y por lo tanto, se construyó un vector de expresión recombinante, p117-Pcj7-*argF2*.

Adicionalmente, se construyó un vector de expresión recombinante, que puede expresar simultáneamente los genes *argF* y *argF2*. El vector de expresión construido de este modo, p117-Pcj7-*argF*, se trató con NotI y después se insertó p117-Pcj7-*argF2* en el mismo. Específicamente, la reacción de PCR se realizó utilizando el plásmido recombinante, p117-Pcj7-*argF2*, como plantilla, junto con el cebador de SEQ ID NO: 11 (cebador de infusión SF_Pcj7_argF2_NotI; 5'-CCTTTTTCGCGCGCGCCGCGAGAAACATCCCAGCGCTACT-3') y la SEQ ID NO: 12 (cebador de infusión SR_argF2_NotI; 5'-CACCGCGGTGGCGCGCCGCGCAAAAAGGCCATCCGTCA-3') y polimerasa Pfu, por desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, hibridación a 55°C durante 30 segundos, y alargamiento a 72°C durante 2,5 minutos, y se repitió durante 28 ciclos. Los fragmentos de PCR obtenidos de este modo se purificaron y se mezclaron con p117-Pcj7-*argF*, que ya se había tratado con la enzima de restricción NotI, y se conectaron mediante el kit de clonación In-fusion, y finalmente se construyó un vector de expresión recombinante, p117-Pcj7-*argF*/Pcj7-*argF2*.

Ejemplo 3: Construcción de una cepa que tiene un vector recombinante insertado en la misma 3-1. Inserción de un vector con un operón de arginina mejorado

Para sustituir un autopromotor de un operón de arginina en el cromosoma de *Corynebacterium*, pD-PargC::lysCP1, el vector recombinante construido en el Ejemplo 1, se transformó en una cepa de *Corynebacterium* productora de arginina existente, y por lo tanto, se construyó una cepa de *Corynebacterium* insertada con un vector recombinante. Específicamente, la secuencia del promotor lysCP1 se insertó en el cromosoma al transformar pD-PargC::lysCP1, el vector recombinante construido en el Ejemplo 1, en las cepas existentes productoras de arginina de KCCM10741P (Patente Coreana N.º 10-07916590) y ATCC21831, sustituye de este modo la secuencia auto-promotora poseída por la cepa parental con la secuencia promotora del vector a través de recombinación homóloga.

Al llevar a cabo la transformación, el vector recombinante se insertó primero en KCCM10741P y ATCC21831 a través de un método de impulso eléctrico (Appl Microbiol Biotechnol. 1999 Oct; 52(4): 541-5), y las cepas con las inserciones en su cromosoma mediante la recombinación de secuencias homólogas se seleccionaron en medios que contenían 25 mg/l de kanamicina. Las cepas primarias seleccionadas se sometieron a cruzamiento, y de ese modo se seleccionaron aquellas cepas en las que los promotores se sustituyeron con el promotor lysCP1 y se eliminó el vector. La presencia de la sustitución del promotor en las cepas transformadas finales se confirmó mediante PCR utilizando un par de cebadores de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, y las cepas se denominaron KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1 y ATCC21831_ΔPargC::lysCP1.

3-2. Inserción de un vector con ornitina carbamoiltransferasa mejorada

Los vectores de expresión recombinante, p117-Pcj7-argF, p117-Pcj7-argF2, y p117-Pcj7-argF/Pcj7-argF2
 5 contruidos en el Ejemplo 2, se insertaron en la cepa KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1 y
 ATCC21831_ΔPargC::lysCP1 mediante un método de impulso eléctrico, se selección en medios que contenían 25
 mg/l de kanamicina, y las cepas que expresaban adicionalmente argF, argF2, y argF/argF2 se construyeron
 finalmente. Las cepas se denominaron KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF,
 KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF2, KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF/Pcj7-argF2,
 10 ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF, ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF2, y
 ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF/Pcj7-argF2, y entre ellas, KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF2 se
 renombraron como CA06-2044, y se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) bajo el
 Tratado de Budapest el 9 de diciembre de 2013, con el número de registro KCCM11498P.

15 Ejemplo 4: Evaluación de las cepas construidas

Con el fin de examinar el efecto de la mejora del operón de arginina y ornitina carbamoiltransferasa en la capacidad
 de producción de arginina usando *Corynebacterium glutamicum* KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1,
 KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF, KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF2,
 20 KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF/Pcj7-argF2, ATCC21831_ΔPargC::lysCP1,
 ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF, ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF2, y
 ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF/Pcj7-argF2, que son cepas productoras de arginina construidas en el
 Ejemplo 3, se cultivaron como se muestra a continuación. En particular, se usaron *Corynebacterium glutamicum*
 KCCM10741P y ATCC21831, que son las cepas parentales, como control, y un bucle de platino de las cepas se
 25 inoculó respectivamente en un matraz con deflectores en las esquinas de 250 ml que contenía 25 ml (6% de
 glucosa, 3% de sulfato de amonio, 0,1% de fosfato de potasio, 0,2% de sulfato de magnesio heptahidrato, 1,5% de
 licor macerado de maíz (CSL), 1% de NaCl, 0,5% de extracto de levadura y 100 µg/l de biotina, pH 7,2) de un medio
 de producción, y se incubaron a 30°C a 200 rpm durante 48 horas. Una vez completado el cultivo, la cantidad de
 producción de L-arginina se midió por HPLC, y los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

30

[Tabla 1]

Confirmación de las capacidades de producción de arginina por la cepa parental y las cepas recombinantes			
Cepa	DO	Conc. de arginina (g/l)	Conc. de ornitina (g/l)
KCCM10741P	91	3,0	0,2
KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1	72	2,2	1,9
KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF	69	4,3	0,2
KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF2	70	4,1	0,5
KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF/Pcj7-argF2	69	4,5	0,2
ATCC21831	102	4,2	0,3
ATCC21831_ΔPargC::lysCP1	86	3,2	2,9
ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF	86	5,5	0,3
ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF2	88	5,3	0,6
ATCC21831_ΔPargC::lysCP1_Pcj7-argF/Pcj7-argF2	85	5,6	0,3

Como se muestra en la Tabla 1 anterior, las cepas, donde los genes que codifican el operón de arginina y ornitina
 carbamoiltransferasa se mejoraron simultáneamente, mostraron un aumento máximo del 50% en la capacidad de
 35 producción de arginina en comparación con la del control. Además, el aumento en la concentración de arginina y la
 ornitina, que se muestra en la mejora del operón de arginina en solitario (KCCM10741P_ΔPargC::lysCP1 y
 ATCC21831_ΔPargC::lysCP1), se resolvieron introduciendo argF, argF2 o argF y argF2, y finalmente mostrando el
 resultado del aumento de la concentración de arginina.

40 <110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene la capacidad de producir L-arginina y un
 método para producir L-arginina utilizando la misma

45 <130> OPA15238-PCT

<150> KR10-2014-0137794

<151> 13/10/2014

<150> KR10-2015-0076331

<151> 29/05/2015

<160> 26

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 319

<212> PRT

<213> argF de Corynebacterium glutamicum

<400> 1

```
Met Thr Ser Gln Pro Gln Val Arg His Phe Leu Ala Asp Asp Asp Leu
  1          5          10          15

Thr Pro Ala Glu Gln Ala Glu Val Leu Thr Leu Ala Ala Lys Leu Lys
      20          25          30

Ala Ala Pro Phe Ser Glu Arg Pro Leu Glu Gly Pro Lys Ser Val Ala
      35          40          45

Val Leu Phe Asp Lys Thr Ser Thr Arg Thr Arg Phe Ser Phe Asp Ala
      50          55          60

Gly Ile Ala His Leu Gly Gly His Ala Ile Val Val Asp Ser Gly Ser
      65          70          75          80

Ser Gln Met Gly Lys Gly Glu Thr Leu Gln Asp Thr Ala Ala Val Leu
      85          90          95

Ser Arg Tyr Val Glu Ala Ile Val Trp Arg Thr Tyr Ala His Ser Asn
      100          105          110

Phe His Ala Met Ala Glu Thr Ser Thr Val Pro Leu Val Asn Ser Leu
      115          120          125

Ser Asp Asp Leu His Pro Cys Gln Ile Leu Ala Asp Leu Gln Thr Ile
      130          135          140

Val Glu Asn Leu Ser Pro Glu Glu Gly Pro Ala Gly Leu Lys Gly Lys
      145          150          155          160

Lys Ala Val Tyr Leu Gly Asp Gly Asp Asn Asn Met Ala Asn Ser Tyr
      165          170          175

Met Ile Gly Phe Ala Thr Ala Gly Met Asp Ile Ser Ile Ile Ala Pro
      180          185          190

Glu Gly Phe Gln Pro Arg Ala Glu Phe Val Glu Arg Ala Glu Lys Arg
      195          200          205
```

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

<210> 2
 <211> 960
 <212> ADN
 <213> argF de Corynebacterium glutamicum

<400> 2
 atgacttcac aaccacaggt tcgccatttc ctggctgatg atgatctcac ccctgcagag 60
 caggcagagg ttttgaccct agccgcaaag ctcaaggcag cgccgttttc ggagcgtcca 120
 ctcgagggac caaagtccgt tgcagttctt tttgataaga cttcaactcg tactcgcttc 180
 tccttcgacg cgggcatcgc tcatttgggt ggacatgcca tcgtcgtgga ttccggcagc 240
 tcacagatgg gtaagggcga gaccctgcag gacaccgcag ctgtattgtc ccgctacgtg 300
 gaagcaattg tgtggcgcac ctacgcacac agcaatttcc acgcatggc ggagacgtcc 360
 actgtgccac tggatgaactc cttgtccgat gatctgcacc catgccagat tctggctgat 420
 ctgcagacca tcgtggaaaa cctcagccct gaagaaggcc cagcaggcct taagggttaag 480
 aaggctgtgt acctgggcga tggcgacaac aacatggcca actcctacat gattggcttt 540
 gccaccgcgg gcatggatat ctccatcatc gctcctgaag gggtccagcc tcgtgcggaa 600
 ttcgtggagc gcgcggaaaa gcgtggccag gaaaccggcg cgaaggttgt tgtcaccgac 660
 agcctcgacg aggttgcccg cgccgatgtt gtcacaccg atacctgggt atccatgggt 720
 atggaacacg acggcatcga tcgcaccaca ctttctgttc cctaccaggt caacgatgag 780
 gtcattggca aagctaacga cggcgccatc ttcctgcact gccttcctgc ctaccgggc 840
 aaagaagtgg cagcctccgt gattgatgga ccagcgtcca aagttttcga tgaagcagaa 900
 aaccgcctcc acgctcagaa agcactgctg gtgtggctgc tggccacca gccgaggtaa 960

<210> 3
 <211> 274
 <212> PRT

<213> argF2 de Corynebacterium glutamicum

<400> 3

```

Met Ala Arg Lys His Leu Leu Ser Leu Ala Asp Trp Asn Arg Gly Glu
 1          5          10          15

Leu Glu Ala Leu Phe Glu Leu Ala Glu Gln Tyr Glu Ala Gly Gly Gly
      20          25          30

Pro Arg Phe Asp Gly Ala Ala Ala Met Phe Phe Pro Pro Thr Ser Leu
      35          40          45

Arg Thr Arg Leu Ser Phe Glu Arg Gly Ala Thr Ala Met Gly Leu Gln
      50          55          60

Pro Ile Thr Phe Pro Ser Asp Ser Leu Asp Lys Asp Glu Asp Leu Val
      65          70          75          80

Asp Val Val Gly Tyr Leu Ser Gln Trp Ala Asp Val Val Val Val Arg
      85          90          95

His Pro Gln Leu Thr Ala Leu Gln Arg Leu Ala Ser Ala Asp Ala Ala
      100          105          110

Pro Val Ile Asn Ala Met Thr Ser Glu Asn His Pro Cys Glu Val Leu
      115          120          125

Ser Asp Leu Tyr Ala Leu Ser Arg His His Asp Ile Ser Ala Leu Arg
      130          135          140

Tyr Leu Phe Val Gly Gly Asp Gly Asn Ile Ala Arg Ala Trp Trp Glu
      145          150          155          160

Ala Ala Gln Ala Phe Gly Leu Glu Met Arg Gln Ser Cys Pro Glu Glu
      165          170          175

Leu Arg Val Val Gly Met Pro Trp Glu Glu Asn Leu Pro His Ala Ile
      180          185          190

Ala Ser Ala Asp Val Val Leu Thr Asp Gly Pro Gly Arg His Ala Glu
      195          200          205

Leu Leu Glu Pro Tyr Arg Val Thr Ala Ala Leu Leu Asp Arg Ala Pro
      210          215          220

Arg Gly Val Arg Leu Ala Pro Cys Pro Pro Phe Ile Arg Gly Arg Glu
      225          230          235          240

Val Ser Ala Asp Ala Ile Glu His Pro Ala Phe Val Gly Tyr Ser Phe
      245          250          255

Lys Arg His Leu Met Pro Val Gln Gln Ala Ile Leu Ala Arg Ser Ile
      260          265          270

Asn Ala

```

5

<210> 4

<211> 825

<212> ADN

<213> argF2 de Corynebacterium glutamicum

10

<400> 4

ES 2 724 000 T3

```

atggccagaa aacatctgct ctccctggca gactggaaca gaggcgagct tgaggcatta      60
ttcgaactcg cggagcagta tgaagctggc ggtggggccac gattcgatgg tgccgcggcg      120
atgttcttcc cgccgacgag tttgctgaca cggtctctcat tcgagcgtgg ggcaacggca      180
atgggactcc agccgatcac gttcccgta gacagcctgg acaaggacga agatctcgtc      240
gacgtcgtcg gctatctctc gcagtgggct gatgtcggtt tcgtccgaca cccgcaattg      300
acggcgcttc agcggttggc gtcagcggat gcagcgcccg tgatcaacgc gatgacgagt      360
gagaaccatc cgtgcgaagt cctctcggac ttgtatgcgc tgtctcgta ccatgacatt      420
tcggccctgc ggtacctgtt tgtcgggtggc gatggcaaca tcgccagggc ctggtgggag      480
gcggcccaag cgctcggcct cgagatgcgg cagagttgtc ctgaagagct gcgtgtcgtc      540
gggatgccgt gggaggagaa cctgccgcat gcaattgcat cagcggatgt cgtgctgacg      600
gatgggccag gtagacatgc ggagttactc gagccgtatc gtgtgaccgc tgcgttggtg      660
gatcgcgcgc cccgtggagt gcggctcgcg ccctgccgcg cgttcatccg cgggcgcgaa      720
gtgagcgccg atcgatcga gcatccggcg ttcgtcgggt actcgttcaa gcgtcatctc      780
atgccggttc agcaggcgat tctggctcgg tcgatcaatg cgtag                        825

```

<210> 5
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador SF_PlysCP1_XhoI-XbaI

<400> 5
 ccgtctctag actcgagcca tctttgggg tgcgg 35

<210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador SR_PlysCP1_SpeI

<400> 6
 ttgattatca tactagtctt tgtgcacctt tcgat 35

<210> 7
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador SF_argF_EcoRV

<400> 7
 acgaaaggaa acactcgata tcatgacttc acaaccacag gt 42

5 <210> 8
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador SR_argF_XbaI
 10 <400> 8
 gccaaaacag ctctagatta cctcggctgg tgggccca 37
 <210> 9
 <211> 42
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador SF_argF2_EcoRV
 20 <400> 9
 acgaaaggaa acactcgata tcatggccag aaaacatctg ct 42
 <210> 10
 <211> 37
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador SR_argF2_XbaI
 30 <400> 10
 gccaaaacag ctctagacta cgcattgac gaccgag 37
 <210> 11
 <211> 38
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> cebador SF_Pcj7_argF2_NotI
 <400> 11
 cctttttgcg gcggccgcag aaacatccca gcgctact 38
 45 <210> 12
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> cebador SR_argF2_NotI
 <400> 12
 55 caccgcggtg gcggccgccg caaaaaggcc atccgtca 38
 <210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador SF_pargC_PR_pDC

5 <400> 13
 cgagctcggg acccgggcaa agaatacggc ttccttggc 39

<210> 14
 <211> 39
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador SR_pargC_PR_XbaI-XhoI-BamHI

15 <400> 14
 ctggatcctc gactctagag acgggttaga catgcaaaa 39

<210> 15
 <211> 42
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador SF_pargC_PR_SpeI-ScaI-BamHI

25 <400> 15
 gactcgagga tccagtacta gtatgataat caagggtgca at 42

30 <210> 16
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cebador SR_pargC_PR_pDC

<400> 16
 40 tgcaggtcga ctctagggtg acgccttctt tcaaag 36

<210> 17
 <211> 317
 <212> ADN
 <213> Promotor cj7 de Corynebacterium glutamicum

45 <400> 17
 agaaacatcc cagcgcctact aatagggagc gttgaccttc cttccacgga ccggtaatcg 60
 gagtgcctaa aaccgcatgc ggcttaggct ccaagatagg ttctgcgcgg ccgggtaatg 120
 catcttcttt agcaacaagt tgaggggtag gtgcaaataa gaacgacata gaaatcgtct 180
 cctttctggtt tttaatacaac atacaccacc acctaaaaat tccccgacca gcaagttcac 240
 agtattcggg cacaatatcg ttgcctaaaat attgtttcgg aatatcatgg gatacgtacc 300
 caacgaaagg aaacact 317

<210> 18
 50 <211> 353

<212> ADN

<213> Promotor lysCP1 de Corynebacterium glutamicum

<400> 18

```
ccatcttttg ggggtgcggag cgcgatccgg tgtctgacca cggtgcccca tgcgattgtt      60
aatgccgatg ctagggcgaa aagcacggcg agcagattgc tttgcacttg attcagggta      120
gttgactaaa gagttgctcg cgaagtagca cctgtcactt ttgtctcaaa tattaaatcg      180
aatatcaata tatggtctgt ttattggaac gcgtcccagt ggctgagacg catccgctaa      240
agccccagga accctgtgca gaaagaaaac actcctctgg ctaggtagac acagtttatt      300
gtggtagagt tgagcgggta actgtcagca cgtagatcga aaggtgcaca aag          353
```

<210> 19

<211> 388

<212> PRT

<213> argJ de Corynebacterium glutamicum

<400> 19

```
Met Ala Lys Lys Gly Ile Thr Ala Pro Lys Gly Phe Val Ala Ser Ala
  1              5              10              15

Thr Thr Ala Gly Ile Lys Ala Ser Gly Asn Pro Asp Met Ala Leu Val
      20              25              30

Val Asn Gln Gly Pro Glu Phe Ser Ala Ala Ala Val Phe Thr Arg Asn
      35              40              45

Arg Val Phe Ala Ala Pro Val Lys Val Ser Arg Glu Asn Val Ala Asp
      50              55              60

Gly Gln Ile Arg Ala Val Leu Tyr Asn Ala Gly Asn Ala Asn Ala Cys
      65              70              75              80

Asn Gly Leu Gln Gly Glu Lys Asp Ala Arg Glu Ser Val Ser His Leu
      85              90              95

Ala Gln Asn Leu Gly Leu Glu Asp Ser Asp Ile Gly Val Cys Ser Thr
```

ES 2 724 000 T3

100	105	110
Gly Leu Ile Gly Glu Leu Leu Pro Met Asp Lys Leu Asn Thr Gly Ile 115 120 125		
Asp Gln Leu Thr Ala Glu Gly Ala Leu Gly Asp Asn Gly Ala Ala Ala 130 135 140		
Ala Lys Ala Ile Met Thr Thr Asp Thr Val Asp Lys Glu Thr Val Val 145 150 155 160		
Phe Ala Asp Gly Trp Thr Val Gly Gly Met Gly Lys Gly Val Gly Met 165 170 175		
Met Ala Pro Ser Leu Ala Thr Met Leu Val Cys Leu Thr Thr Asp Ala 180 185 190		
Ser Val Thr Gln Glu Met Ala Gln Ile Ala Leu Ala Asn Ala Thr Ala 195 200 205		
Val Thr Phe Asp Thr Leu Asp Ile Asp Gly Ser Thr Ser Thr Asn Asp 210 215 220		
Thr Val Phe Leu Leu Ala Ser Gly Ala Ser Gly Ile Thr Pro Thr Gln 225 230 235 240		
Asp Glu Leu Asn Asp Ala Val Tyr Ala Ala Cys Ser Asp Ile Ala Ala 245 250 255		
Lys Leu Gln Ala Asp Ala Glu Gly Val Thr Lys Arg Val Ala Val Thr 260 265 270		
Val Val Gly Thr Thr Asn Asn Glu Gln Ala Ile Asn Ala Ala Arg Thr 275 280 285		
Val Ala Arg Asp Asn Leu Phe Lys Cys Ala Met Phe Gly Ser Asp Pro 290 295 300		
Asn Trp Gly Arg Val Leu Ala Ala Val Gly Met Ala Asp Ala Asp Met 305 310 315 320		
Glu Pro Glu Lys Ile Ser Val Phe Phe Asn Asp Gln Ala Val Cys Leu 325 330 335		
Asp Ser Thr Gly Ala Pro Gly Ala Arg Glu Val Asp Leu Ser Gly Ala 340 345 350		
Asp Ile Asp Val Arg Ile Asp Leu Gly Thr Ser Gly Glu Gly Gln Ala 355 360 365		
Thr Val Arg Thr Thr Asp Leu Ser Phe Ser Tyr Val Glu Ile Asn Ser 370 375 380		
Ala Tyr Ser Ser 385		

<210> 20
 <211> 1167
 <212> ADN
 <213> argJ de Corynebacterium glutamicum
 <400> 20

atggccaaaa aaggcattac cgcgccgaaa ggcttcggtg cttctgcaac gaccgcgggt 60
 attaaagctt ctggcaatcc tgacatggcg ttggtgggta accagggtcc agagttttcc 120
 gcagcggccg tgtttacacg caaccgagtt ttcgcagcgc ctgtgaaggt gagccgggag 180
 aacgttgctg atggccagat cagggctggt ttgtacaacg ctggtaatgc taatgcgtgt 240
 aatggtctgc aggggtgagaa ggatgctcgt gagtctgttt ctcatctagc tcaaaatttg 300
 ggcttgaggg attccgatat tgggtgtgtg tccactggtc ttattggtga gttgcttccg 360
 atggataagc tcaatacagg tattgatcag ctgaccgctg agggcgcttt gggtgacaat 420
 ggtgcagctg ctgccaaagg gatcatgacc actgacacgg tggataagga aaccgtcgtg 480
 tttgctgatg gttggactgt cggcgggaatg ggcaagggcg tgggcatgat ggcgccgtct 540
 cttgccacca tgctgggtctg cttgaccact gatgcatccg ttactcagga aatggctcag 600
 attgcgctgg ctaatgctac ggccgttacg tttgacaccc tggatattga tggatcaacc 660
 tccaccaatg acaccgtggt cctgctggca tctggcgcta gcggaatcac cccaactcag 720
 gatgaactca acgatgcggt gtacgcagct tgttctgata tcgcagcgaa gcttcaggct 780
 gatgcagagg gggtgaccaa gcgcgttgct gtgacagtgg tgggaaccac caacaacgag 840
 caggcgatca atgcggctcg cacggttgct cgtgacaatt tgttcaagtg cgcaatgttt 900
 ggatctgatc caaactgggg tcgcgtgttg gctgcagtcg gcattggctga tgctgatatg 960
 gaaccagaga agattttctgt gttcttcaat gatcaagcag tatgccttga ttccactggc 1020
 gctcctgggtg ctcgtagagt ggatctttcc ggcgctgaca ttgatgtccg aattgatttg 1080
 ggcaccagtg gggaaggcca ggcaacagtt cgaaccactg acctgagctt ctcctacgtg 1140
 gagatcaact ccgcgtacag ctcttaa 1167

<210> 21
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> argB de Corynebacterium glutamicum

<400> 21
 Met Asn Asp Leu Ile Lys Asp Leu Gly Ser Glu Val Arg Ala Asn Val
 1 5 10 15
 Leu Ala Glu Ala Leu Pro Trp Leu Gln His Phe Arg Asp Lys Ile Val
 20 25 30
 Val Val Lys Tyr Gly Gly Asn Ala Met Val Asp Asp Asp Leu Lys Ala
 35 40 45
 Ala Phe Ala Ala Asp Met Val Phe Leu Arg Thr Val Gly Ala Lys Pro
 50 55 60
 Val Val Val His Gly Gly Gly Pro Gln Ile Ser Glu Met Leu Asn Arg
 65 70 75 80
 Val Gly Leu Gln Gly Glu Phe Lys Gly Gly Phe Arg Val Thr Thr Pro

				85						90					95
Glu	Val	Met	Asp	Ile	Val	Arg	Met	Val	Leu	Phe	Gly	Gln	Val	Gly	Arg
			100						105					110	
Asp	Leu	Val	Gly	Leu	Ile	Asn	Ser	His	Gly	Pro	Tyr	Ala	Val	Gly	Thr
		115					120					125			
Ser	Gly	Glu	Asp	Ala	Gly	Leu	Phe	Thr	Ala	Gln	Lys	Arg	Met	Val	Asn
		130					135					140			
Ile	Asp	Gly	Val	Pro	Thr	Asp	Ile	Gly	Leu	Val	Gly	Asp	Ile	Ile	Asn
145					150					155					160
Val	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Met	Asp	Ile	Ile	Glu	Ala	Gly	Arg	Ile	Pro
				165					170					175	
Val	Val	Ser	Thr	Ile	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Gly	Gln	Ile	Tyr	Asn	Ile
			180					185					190		
Asn	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Ile	Gly	Ala	Glu
		195					200					205			
Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Thr	Asn	Val	Glu	Gly	Leu	Tyr	Thr	Asp	Trp	Pro
		210				215					220				
Asp	Lys	Ser	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Ile	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Glu	Ala
225					230					235					240
Ile	Leu	Pro	Gly	Leu	Asp	Ser	Gly	Met	Ile	Pro	Lys	Met	Glu	Ser	Cys
				245					250					255	
Leu	Asn	Ala	Val	Arg	Gly	Gly	Val	Ser	Ala	Ala	His	Val	Ile	Asp	Gly
			260					265					270		
Arg	Ile	Ala	His	Ser	Val	Leu	Leu	Glu	Leu	Leu	Thr	Met	Gly	Gly	Ile
		275					280					285			
Gly	Thr	Met	Val	Leu	Pro	Asp	Val	Phe	Asp	Arg	Glu	Asn	Tyr	Pro	Glu
		290				295					300				
Gly	Thr	Val	Phe	Arg	Lys	Asp	Asp	Lys	Asp	Gly	Glu	Leu			
305					310					315					

<210> 22

<211> 954

<212> ADN

<213> argB de Corynebacterium glutamicum

<400> 22

atgaatgact tgatcaaaga tttaggctct gaggtgcgcg caaatgtcct cgctgaggcg	60
ttgccatggt tgcagcattt ccgcgacaag attgttgtcg tgaaatatgg cggaacgcc	120
atggtggatg atgatctcaa ggctgctttt gctgccgaca tggctcttctt gcgcaccgtg	180
ggcgcaaac cagtgggtgt gcacgggtgt ggacctcaga tttctgagat gctaaaccgt	240
gtgggtctcc agggcgagtt caagggtgtt ttccgtgtga ccactcctga ggtcatggac	300
attgtgcgca tgggtgctctt tggtcaggtc ggtcgcgatt tagttggttt gatcaactct	360

catggccctt acgctgtggg aacctccggt gaggatgccg gcctgtttac cgcgcagaag 420
 cgcattggtca acatcgatgg cgtaccact gatattggtt tggtcggaga catcattaat 480
 gtcgatgcct ctctcttgat ggatatcatc gaggcgggtc gcattcctgt ggtctctacg 540
 attgctccag gcgaagacgg ccagatttac aacatcaacg ccgataaccg agcgggtgct 600
 ttggctgcag cgattggtgc agaacgcctg ctggttctca ccaatgtgga aggtctgtac 660
 accgattggc ctgataagag ctactggtg tccaagatca aggccaccga gctggaggcc 720
 attcttccgg gacttgattc cggcatgatt ccaaagatgg agtcttgctt gaatgcgggtg 780
 cgtgggggag taagcgtgc tcatgtcatt gacggccgca tcgcgcactc ggtgttgctg 840
 gagcttttga ccatgggtgg aattggcacg atggtgctgc cggatgtttt tgatcgggag 900
 aattatccgg aaggcaccgt ttttagaaaa gacgacaagg atggggaact gtaa 954

<210> 23

<211> 347

<212> PRT

<213> argC de Corynebacterium glutamicum

<400> 23

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

Leu Gly Ser Glu Thr Met Gly Ser Leu Lys Ala Tyr Asn Thr Ser Gly
195 200 205

Lys His Arg His Thr Pro Glu Ile Ala Gln Asn Leu Gly Glu Val Ser
210 215 220

Asp Lys Pro Val Lys Val Ser Phe Thr Pro Val Leu Ala Pro Leu Pro
225 230 235 240

Arg Gly Ile Leu Thr Thr Ala Thr Ala Pro Leu Lys Glu Gly Val Thr
245 250 255

Ala Glu Gln Ala Arg Ala Val Tyr Glu Glu Phe Tyr Ala Gln Glu Thr
260 265 270

Phe Val His Val Leu Pro Glu Gly Ala Gln Pro Gln Thr Gln Ala Val
275 280 285

Leu Gly Ser Asn Met Cys His Val Gln Val Glu Ile Asp Glu Glu Ala
290 295 300

Gly Lys Val Leu Val Thr Ser Ala Ile Asp Asn Leu Thr Lys Gly Thr
305 310 315 320

Ala Gly Ala Ala Val Gln Cys Met Asn Leu Ser Val Gly Phe Asp Glu
325 330 335

Ala Ala Gly Leu Pro Gln Val Gly Val Ala Pro
340 345

<210> 24
<211> 1044
<212> ADN
<213> argC de Corynebacterium glutamicum

<400> 24
atgacaatca aggttgcaat cgcaggagcc agtggatatg ccggcggaga aatccttcgt 60
ctccttttag gccatccagc ttatgcatct ggtgaactag aaatcggagc actcaccgcg 120
gcatcaaccg caggcagcac gctcggtgaa ttgatgccac acattccgca gttggcggat 180
cgtgttattc aagacaccac agctgaaact ctagccggtc atgatgtcgt atttctagga 240
cttccacacg gattctctgc agaaattgca cttcagctcg gaccagatgt cacagtgatt 300
gactgtgcag ctgactttcg tctgcaaaat gctgcagatt gggagaagtt ctacggctca 360
gagcaccagg gaacatggcc ttatggcatt ccagaaatac caggacaccg cgaggctcct 420
cgtggtgcta agcgtgtagc agtgccagga tgtttcccaa ccggtgcaac cttggctcct 480
cttcctgcgg ttcaagcggg acttatcgag ccagatgttt ccgtagtgtc catcaccggc 540
gtatcagggtg caggtaagaa agcatctgtt gcactacttg gctcggaaac catgggttca 600
ctcaaggcgt acaacacctc cggaaagcac cgccacaccc cggaaattgc ccagaacctc 660
ggcgaagtca gcgacaagcc agtcaagggt agcttcaccc cagtgcctgc accgttacct 720
cgcggaattc tcaccactgc aaccgcacct ttgaaagaag gcgttaccgc agagcaggct 780

cgcgagctat atgaagagtt ctatgcacag gaaaccttcg tgcattgttct tccagaaggt 840
gcacagccac aaaccaagc agttcttggc tccaacatgt gccacgtgca ggtagaaatt 900
gatgaggaag caggcaaagt ccttgttacc tccgcaatcg ataacctcac caagggaact 960
gccggcgccg ctgttcagt catgaactta agcgttggct ttgatgaggc agcaggcctg 1020
ccacaggtcg gcgtcgacc ttaa 1044

<210> 25
<211> 391
<212> PRT
<213> argD de Corynebacterium glutamicum

<400> 25
Met Ser Thr Leu Glu Thr Trp Pro Gln Val Ile Ile Asn Thr Tyr Gly
1 5 10 15
Thr Pro Pro Val Glu Leu Val Ser Gly Lys Gly Ala Thr Val Thr Asp
20 25 30
Asp Gln Gly Lys Val Tyr Ile Asp Leu Leu Ala Gly Ile Ala Val Asn
35 40 45
Ala Leu Gly His Ala His Pro Ala Ile Ile Glu Ala Val Thr Asn Gln
50 55 60
Ile Gly Gln Leu Gly His Val Ser Asn Leu Phe Ala Ser Arg Pro Val
65 70 75 80
Val Glu Val Ala Glu Glu Leu Ile Lys Arg Phe Ser Leu Asp Asp Ala
85 90 95
Thr Leu Ala Ala Gln Thr Arg Val Phe Phe Cys Asn Ser Gly Ala Glu
100 105 110
Ala Asn Glu Ala Ala Phe Lys Ile Ala Arg Leu Thr Gly Arg Ser Arg
115 120 125
Ile Leu Ala Ala Val His Gly Phe His Gly Arg Thr Met Gly Ser Leu
130 135 140
Ala Leu Thr Gly Gln Pro Asp Lys Arg Glu Ala Phe Leu Pro Met Pro
145 150 155 160
Ser Gly Val Glu Phe Tyr Pro Tyr Gly Asp Thr Asp Tyr Leu Arg Lys
165 170 175
Met Val Glu Thr Asn Pro Thr Asp Val Ala Ala Ile Phe Leu Glu Pro
180 185 190
Ile Gln Gly Glu Thr Gly Val Val Pro Ala Pro Glu Gly Phe Leu Lys
195 200 205
Ala Val Arg Glu Leu Cys Asp Glu Tyr Gly Ile Leu Met Ile Thr Asp
210 215 220
Glu Val Gln Thr Gly Val Gly Arg Thr Gly Asp Phe Phe Ala His Gln
225 230 235 240
His Asp Gly Val Val Pro Asp Val Val Thr Met Ala Lys Gly Leu Gly

245	250	255
Gly Gly Leu Pro Ile Gly Ala Cys Leu Ala Thr Gly Arg Ala Ala Glu 260 265 270		
Leu Met Thr Pro Gly Lys His Gly Thr Thr Phe Gly Gly Asn Pro Val 275 280 285		
Ala Cys Ala Ala Ala Lys Ala Val Leu Ser Val Val Asp Asp Ala Phe 290 295 300		
Cys Ala Glu Val Thr Arg Lys Gly Glu Leu Phe Lys Glu Leu Leu Ala 305 310 315 320		
Lys Val Asp Gly Val Val Asp Val Arg Gly Arg Gly Leu Met Leu Gly 325 330 335		
Val Val Leu Glu Arg Asp Val Ala Lys Gln Ala Val Leu Asp Gly Phe 340 345 350		
Lys His Gly Val Ile Leu Asn Ala Pro Ala Asp Asn Ile Ile Arg Leu 355 360 365		
Thr Pro Pro Leu Val Ile Thr Asp Glu Glu Ile Ala Asp Ala Val Lys 370 375 380		
Ala Ile Ala Glu Thr Ile Ala 385 390		

<210> 26

<211> 1176

<212> ADN

<213> argD de Corynebacterium glutamicum

<400> 26

atgagcacgc tggaaacttg gccacaggtc attattaata cgtacggcac cccaccagtt	60
gagctggtgt ccggcaagg cgcaaccgtc accgatgacc agggcaaagt ctacatcgac	120
ttgctcgagg gcatcgagct caacgcgttg ggccacgccc acccggcgat catcgaggcg	180
gtcaccaacc agatcggcca acttggtcac gtctcaaact tgttcgcatc caggcccgtc	240
gtcgagggtc ccgaggagct catcaagcgt ttttcgcttg acgacgccac cctcgccgcg	300
caaaccggg tttttctctg caactcgggc gccgaagcaa acgaggctgc tttcaagatt	360
gcacgcttga ctggctgttc ccggattctg gctgcagttc atggtttcca cggccgcacc	420
atgggttccc tcgcgctgac tggccagcca gacaagcgtg aagcattcct gccaatgcca	480
agcgggtgtg agttctaccc ttacggcgac accgattact tgcgcaaaat ggtagaaacc	540
aaccaacagg atgtgggtgc tatcttcttc gagccaatcc aggggtgaaac gggcgttgtt	600
ccagcacctg aaggattcct caaggcagtg cgcgagctgt gcgatgagta cggcatcttg	660
atgatcaccg atgaagtcca gactggcggt ggccgtaccg gcgatttctt tgcacatcag	720
cacgatggcg ttgttcccga tgtggtgacc atggccaagg gacttggcgg cggcttctcc	780
atcggtgctt gtttggccac tggccgtgca gctgaattga tgaccccagg caagcacggc	840

ES 2 724 000 T3

accactttcg gtggcaaccc agttgcttgt gcagctgcc aaggcagtgc gtctgttgct	900
gatgacgctt tctgcgcaga agttacccgc aagggcgagc tgttcaagga acttcttgcc	960
aaggttgacg gcgttgtaga cgtccgtggc aggggcttga tgttgggcgt ggtgctggag	1020
cgcgacgtcg caaagcaagc tgttcttgat ggttttaagc acggcgttat tttgaatgca	1080
ccggcggaca acattatccg tttgaccccg ccgctggtga tcaccgacga agaaatcgca	1140
gacgcagtca aggcatttgc cgagacaatc gcataa	1176

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene la capacidad de producir L-arginina con actividades mejoradas de un operón de arginina y ornitina carbamoiltransferasa en comparación con las actividades de cada uno en una cepa parental de producción de L-arginina de *Corynebacterium*, en el que el operón de arginina comprende un represor de arginina.
2. El microorganismo de la reivindicación 1, en el que la ornitina carbamoiltransferasa es la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3.
3. El microorganismo de la reivindicación 1, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
4. Un método para producir L-arginina, que comprende:
cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un medio de cultivo; y
recuperar la L-arginina del microorganismo o del medio.