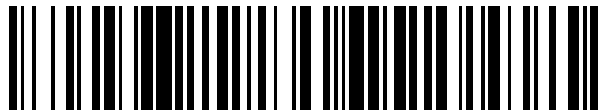


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 590**

51 Int. Cl.:

C07K 14/34 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.04.2014 PCT/KR2014/003570**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14175663**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2014 E 14788335 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2990475**

54 Título: **Microorganismo de *Corynebacterium* sp. que tiene una productividad mejorada de L-arginina y procedimiento de producción de L-arginina mediante el uso del mismo**

30 Prioridad:

23.04.2013 KR 20130044723

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

20.05.2020

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;
KANG, MIN GYEONG;
LEE, HAN HYOUNG;
KIM, HYE WON y
LEE, SUNG GUN**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 761 590 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 de *Corynebacterium* sp. que tiene una productividad mejorada de L-arginina y procedimiento de producción de L-arginina mediante el uso del mismo

5

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* con una capacidad mejorada para producir L-arginina, y un procedimiento para producir L-arginina mediante el uso del mismo.

Descripción del estado de la técnica

15 La L-arginina está contenida en el ajo o la semilla de las plantas como forma libre. La L-arginina se usa ampliamente en medicamentos, alimentos y similares y también se usa como un suplemento dietético fortificado con aminoácidos.

20 Los microorganismos del género *Corynebacterium* biosintetizan L-arginina a través de una vía cíclica. La L-arginina se sintetiza a partir del L-glutamato a través de N-acetilglutamato, N-acetilglutamil fosfato, N-acetilglutamato semialdehído, N-acetilornitina, ornitina, citrulina y argininosuccinato.

25 Además, se conoce que *Corynebacterium glutamicum* está regulado por la inhibición por retroalimentación debido a la arginina intracelular (Vehary Sakanyan, y otros, *Microbiology*, 142:9-108, 1996), lo que sugiere que la producción de L-arginina con alto rendimiento es limitada.

Ikeda y otros informaron que la citrulina se acumula en un medio de fermentación durante la fermentación de arginina (*Appl Environ Microbiol.* Marzo de 2009; 75(6):1635-41. Epub 9 de enero de 2009).

30 En el proceso de biosíntesis, la citrulina se une al aspartato para generar argininosuccinato, que después libera fumarato para generar arginina. En este proceso, la aspartato amoníaco-liasa (AspA) es una enzima que sintetiza aspartato a partir de fumarato y amoníaco (Figura 1), y la aspartato aminotransferasa (AspB) es una enzima que cataliza la síntesis de varios L-aminoácidos mediante la transferencia del grupo amino de varios L-aminoácidos tales como el aspartato, glutamato y aminobutirato hacia los cetoácidos tales como el ácido α -cetoglutárico y el ácido α -cetoisovalérico.

35 Menkel y otros informaron que cuando se introdujo la aspA de *E. coli* en microorganismos del género *Corynebacterium*, los microorganismos de *Corynebacterium* aumentaron la disponibilidad de aspartato y después aumentaron la producción de lisina (*APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Mar. 1989, p. 684-688).

40 En consecuencia, se divulga en la presente memoria que un microorganismo del género *Corynebacterium* tiene una capacidad mejorada para producir L-arginina al aumentar el influjo de aspartato que se une a la citrulina a través de la mejora de la expresión de la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa.

Sumario de la invención

45

Es un objeto de la presente invención proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad mejorada para producir L-arginina.

50 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir L-arginina mediante el uso del microorganismo anterior del género *Corynebacterium*.

55 Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* con la capacidad mejorada para producir L-arginina, que tiene una actividad mejorada de la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:

60 (a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y

(b) un procedimiento para reemplazar los promotores de los genes de la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa con promotores fuertes en dicho microorganismo.

65 La presente invención también proporciona un procedimiento para producir L-arginina que comprende las etapas de:

cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* con capacidad mejorada para producir L-arginina, el cual tiene una actividad mejorada de la aspartato amoniaco-liasa en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:

(a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoniaco-liasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato amoniaco-liasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y

(b) un procedimiento para reemplazar el promotor del gen de la aspartato amoniaco-liasa con un promotor fuerte en dicho microorganismo, en un medio de cultivo; y

recuperar la L-arginina del medio de cultivo.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra una vía para sintetizar arginina a partir de citrulina y una vía para sintetizar aspartato a partir de fumarato.

Descripción detallada de la invención

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en detalle.

La presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad mejorada para producir L-arginina, el cual tiene una actividad mejorada de la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:

(a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y

(b) un procedimiento para reemplazar los promotores de los genes de la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa con promotores fuertes en dicho microorganismo.

Como se usa en la presente memoria, el término "una capacidad para producir L-arginina (productividad de L-arginina)" se refiere a la capacidad de acumular L-arginina en un medio para el cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium* durante el cultivo. Tal capacidad para producir L-arginina puede ser propiedad de un tipo silvestre, o la propiedad impartida o mejorada por una mutación artificial, de los microorganismos del género *Corynebacterium*.

Por ejemplo, para impartir la capacidad para producir L-arginina, un microorganismo del género *Corynebacterium* puede reproducirse como una variante que tiene resistencia al hidroxamato de arginina; una variante que tiene auxotrofia para ácido succínico o que tiene resistencia a un análogo de base de ácido nucleico; una variante deficiente en la capacidad de metabolizar arginina y que tiene resistencia a un antagonista de arginina y canavanina y auxotrofia para lisina; variante que tiene resistencia a arginina, hidroxamato de arginina, homoarginina, D-arginina y canavanina, o resistencia a hidroxamato de arginina y 6-azauracilo; o una variante que tiene resistencia a canavanina.

Además, la capacidad para producir L-arginina puede impartirse al modificar un microorganismo del género *Corynebacterium* a fin de aumentar el nivel de expresión de los genes que codifican las enzimas para biosintetizar L-arginina. Los ejemplos de enzimas para biosintetizar L-arginina pueden incluir N-acetilglutamil fosfato reductasa (ArgC), ornitina acetil transferasa (ArgJ), N-acetilglutamato quinasa (ArgB), acetilornitina transaminasa (ArgD), ornitina carbamoil transferasa (ArgF), ácido argininosuccínico sintetasa (ArgG), ácido argininosuccínico liasa (ArgH), y carbomil fosfato sintetasa. Estas enzimas se colocan en el operón Arg (argCJBDFRGH) y están reguladas por un represor de arginina codificado por *argR* (J Bacteriol. Diciembre de 2002; 184(23):6602-14.). Por lo tanto, puede impartirse una capacidad para producir L-arginina al atenuar el represor de arginina (Documento US2002-0045223) o al sobreexpresar al menos uno de los genes relacionados con la biosíntesis.

En la presente invención, el microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina no está específicamente limitado siempre que este pueda producir L-arginina. Específicamente, este puede ser *Corynebacterium glutamicum* que tiene la capacidad para producir L-arginina. Más específicamente, puede ser *Corynebacterium glutamicum* KCCM10741 (Patente Coreana núm. de Registro 10-0791659) o *Corynebacterium glutamicum* ATCC21831), pero no se limita a estos.

En un aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad mejorada para producir L-arginina, el cual tiene una actividad mejorada de la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:

(a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y

(b) un procedimiento para reemplazar los promotores de los genes de la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa con promotores fuertes en dicho microorganismo.

Como se usa en la presente memoria, el término "aspartato amoníaco-liasa (AspA)" se refiere a una enzima que funciona para sintetizar aspartato a partir de fumarato y amoníaco, y la síntesis de aspartato puede aumentarse al mejorar la expresión de la aspartato amoníaco-liasa, y de este modo puede aumentarse la productividad de la L-arginina por el aumento de aspartato.

En la presente invención, la aspartato amoníaco-liasa puede ser una enzima derivada de cualquier microorganismo, siempre que tenga la actividad de aspartato amoníaco-liasa. Específicamente, la aspartato amoníaco-liasa puede ser una enzima derivada de un microorganismo del género *Escherichia* o del género *Corynebacterium*. Más específicamente, puede ser una enzima derivada de *E. coli* o *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, la aspartato amoníaco-liasa puede tener una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 o 22. La aspartato amoníaco-liasa derivada de *Corynebacterium* que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 está codificada por *aspA* (NCgl1446) que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 23, y la aspartato amoníaco-liasa derivada de *Escherichia* que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 22 está codificada por *aspA* (NCBI GENE ID: 12933698) que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 24.

Una proteína que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente al menos 95 %, e incluso más específicamente al menos 97 % de los aminoácidos puede usarse en el microorganismo o en el procedimiento de la presente invención, siempre que tenga la actividad de aspartato amoníaco-liasa descrita anteriormente.

Como se usa en la presente memoria, el término "homología" se refiere a la identidad entre dos secuencias de aminoácidos y puede determinarse mediante el procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica, mediante el uso del algoritmo BLAST (véase Karlin y Altschul, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)) o FASTA (véase Pearson, Methods Enzymol., 183, 63 (1990)) para calcular el parámetro tal como puntuación, identidad y similitud. Basado en el algoritmo BLAST, se ha desarrollado un programa llamado BLASTN o BLASTX (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Como se usa en la presente memoria, el término "aspartato aminotransferasa" puede derivarse de un microorganismo del género *Corynebacterium*, tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25 y está codificada por *aspB* (NCgl0237) que tiene una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 26, pero no se limita a esta.

Una proteína que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente al menos 95 %, e incluso más específicamente al menos 97 % con la secuencia de aminoácidos de la aspartato aminotransferasa descrita anteriormente, puede usarse en el microorganismo o en el procedimiento de la presente invención, siempre que tenga la actividad de aspartato aminotransferasa descrita anteriormente. La homología con la secuencia de aminoácidos puede determinarse mediante, por ejemplo, el algoritmo BLAST (véase Karlin y Altschul, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)) o FASTA (véase Pearson, Methods Enzymol., 183, 63 (1990)). Basado en este algoritmo, se ha desarrollado un programa llamado BLASTN o BLASTX (véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El microorganismo de la invención del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina se caracteriza por ser modificado al mejorar (o aumentar) la actividad de la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa, en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:

(a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato amoníaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y

(b) un procedimiento para reemplazar los promotores de los genes de la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa con promotores fuertes en dicho microorganismo.

Como se usa en la presente memoria, el término "actividad endógena" se refiere a la actividad de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina que no experimentó ninguna manipulación o modificación genética para regular las actividades de las enzimas descritas anteriormente. Además, el término "mejorada" o "aumentada" significa que la productividad de L-arginina se mejoró en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina.

La mejora (o aumento) de la actividad de las enzimas descritas en la presente memoria puede realizarse mediante el uso de diversos procedimientos de transformación bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de estos procedimientos incluyen un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa mediante la introducción de un polinucleótido que codifica la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en un sistema de vector, un procedimiento para reemplazar el promotor con un promotor fuerte, un procedimiento para introducir una mutación en el promotor, y un procedimiento basado en mutación genética.

En una realización específica de la presente invención, para mejorar la actividad de la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en el microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, puede usarse un procedimiento en el cual un número de copias del gen que codifica la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa se aumenta al introducir el gen que codifica la aspartato amoniaco-liasa y un gen que codifica la aspartato aminotransferasa en un vector y transformar el microorganismo del género *Corynebacterium* con el vector.

Como se usa en la presente memoria, el término "transformar" significa introducir un vector que contiene un polinucleótido que codifica una proteína diana en una célula huésped para que la proteína diana pueda expresarse en la célula huésped. El polinucleótido introducido puede localizarse dentro o fuera del cromosoma de la célula huésped, siempre que pueda expresarse en la célula huésped. El polinucleótido puede introducirse en cualquier forma, siempre que pueda expresarse en la célula huésped.

En una realización de la presente invención, el microorganismo transformado se preparó al introducir el vector recombinante que contenía los genes descritos anteriormente, y después al aislar la cepa productora de L-arginina que contenía 2 copias de cada uno de los genes anteriores en el cromosoma a través de un segundo cruce.

Como se usa en la presente memoria, el término "vector" se refiere a un constructo de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido que codifica la proteína diana que está operativamente unida a una secuencia reguladora adecuada para poder expresar la proteína diana en un huésped adecuado. La secuencia reguladora incluye un promotor para iniciar la transcripción, cualquier secuencia operadora para regular tal transcripción, una secuencia que codifica los sitios adecuados de unión al ribosoma del ARNm, y secuencias que regulan la terminación de la transcripción y la traducción. Después de transformarse en un huésped adecuado, el vector puede replicarse o realizar su función independientemente del genoma del huésped, o puede integrarse en el genoma mismo.

El vector que se usa en la presente invención no está específicamente limitado, siempre que pueda replicarse en un huésped. El vector puede ser cualquier vector conocido en la técnica. Los ejemplos de vectores que se usan comúnmente pueden incluir plásmidos naturales o recombinantes, cósmidos, virus y bacteriófagos.

La cepa de *Corynebacterium glutamicum* (KCCM11351P) transformada mediante el procedimiento descrito en la presente memoria se produce obteniendo mediante PCR *aspA* que codifica la aspartato amoniaco-liasa a partir del cromosoma de la cepa ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-arginina, insertando el *aspA* obtenido en un vector, y después introduciendo el vector en la cepa KCCM10741P de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-arginina y después es un microorganismo transformado que tiene una mayor expresión de *aspA*. Se descubrió que la cepa KCCM11351P puede producir L-arginina con alto rendimiento por la sobreexpresión de *aspA*.

En otro aspecto más, la presente invención también proporciona un procedimiento para producir L-arginina, que comprende las etapas de:

cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* con capacidad mejorada para producir L-arginina, el cual tiene una actividad mejorada de la aspartato amoniaco-liasa en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:

(a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoniaco-liasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato amoniaco-liasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y

(b) un procedimiento para reemplazar el promotor del gen de la aspartato amoníaco-liasa con un promotor fuerte en dicho microorganismo, en un medio de cultivo; y

5 recuperar la L-arginina del medio de cultivo.

En el procedimiento de la invención para producir L-arginina, el proceso de cultivo del microorganismo transformado que sobreexpresa L-arginina puede realizarse en medios adecuados y condiciones de cultivo conocidas en la técnica. Este proceso de cultivo puede ser ajustado fácilmente por cualquier persona experta en la técnica dependiendo de una cepa seleccionada. Los ejemplos del proceso de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cultivo por lotes, cultivo continuo y cultivo alimentado por lotes. Tales procesos de cultivo se divulgan, por ejemplo, en "Biochemical Engineering" (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp138-176, 1991).

15 El medio que puede usarse en el procedimiento de la presente invención contiene azúcar cruda o glucosa como fuente principal de carbono. Además, la melaza que contiene una gran cantidad de azúcar cruda también puede usarse como fuente de carbono. Además, pueden usarse cantidades adecuadas de diversas fuentes de carbono, y puede usarse específicamente glucosa purificada. Los ejemplos de una fuente de nitrógeno que puede usarse en el procedimiento de la presente invención incluyen fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, caldo de carne, extracto de malta, licor de maíz y harina de soja; y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Específicamente, puede usarse peptona. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación. El medio puede contener, como fuente de fósforo, dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno difosfato de dipotasio y las correspondientes sales que contienen sodio. Además, el medio puede contener una sal metálica tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, el medio puede contener aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Estos medios o precursores pueden añadirse de manera continua o por lotes en el cultivo. Sin embargo, los ejemplos de una composición de un medio de cultivo no se limitan a estos.

Un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico puede añadirse a un medio de cultivo durante el cultivo de manera adecuada para ajustar el pH del medio de cultivo. Además, puede añadirse un agente antiespumante tal como éster poliglicólico de ácido graso durante el cultivo para inhibir el burbujeo. Además, para mantener una condición aeróbica del medio de cultivo, puede inyectarse oxígeno o gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) al medio de cultivo. La temperatura del medio de cultivo puede estar generalmente entre 20 °C y 45 °C, y específicamente entre 25 °C y 40 °C. El cultivo puede realizarse hasta que se produzca la cantidad deseada de L-arginina. Específicamente, el tiempo de cultivo puede ser de 10-160 horas.

La separación de L-arginina del medio de cultivo se puede realizar mediante un procedimiento convencional conocido en la técnica. El procedimiento puede incluir centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio iónico, y cristalización. Por ejemplo, la L-arginina puede separarse al centrifugar el medio de cultivo a baja velocidad para eliminar la biomasa, y después separar el sobrenadante restante mediante cromatografía de intercambio iónico.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá en mayor detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Examen del efecto de aspA en la producción de L-arginina

Para examinar si *aspA* es un gen significativo en la producción de L-arginina, se construyó un vector con *aspA* deletado y se transformó en la cepa KCCM10741P de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-arginina (Número de Registro de Patente Coreana 0791659), y después se evaluó la productividad de L-arginina de la cepa transformada.

(1) Construcción del vector con *aspA* deficiente

Para eliminar el gen *aspA* que codifica la aspartato amoníaco-liasa (Ncgl1446) del cromosoma, el cromosoma de la cepa ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum* adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés) se extrajo mediante el uso de un sistema Genomic-tip (QIAGEN), y se realizó una PCR cruzada mediante el uso del cromosoma como un molde.

Específicamente, un fragmento de aproximadamente 798 pb que tenía un sitio de la enzima de restricción *Xma*I en la región 5' se amplificó mediante PCR con la polimerasa *Pfu* mediante el uso de cebadores de las SEQ ID NO: 1 y 2 durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 60 segundos. Después, un fragmento de aproximadamente 829 pb que tenía un sitio de la enzima de restricción *Xba*I en la región 3' se amplificó mediante PCR mediante el uso de cebadores de las SEQ ID NO: 3 y 4 de la misma manera que la descrita anteriormente. Los fragmentos de ADN resultantes se aislaron mediante el uso del kit GeneAII^R ExpinTM GEL SV (Seúl, Corea) y después se usaron como molde para la PCR cruzada.

Para obtener un fragmento de ADN que contiene *aspA* deletado, se realizó una PCR cruzada mediante el uso de los dos fragmentos de ADN preparados anteriormente como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 1 y 4. Específicamente, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.583 pb mediante el procedimiento de PCR descrito anteriormente. El fragmento amplificado se trató con las enzimas de restricción *Xma*I y *Xba*I, y después se ligó con un vector pD tratado con las mismas enzimas, construyendo de este modo el vector pDKO1446.

(2) Preparación de la cepa recombinante

El vector pDKO1446 construido como se describió anteriormente se transformó en la cepa KCCM10741P de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-arginina y se sometió a un segundo cruce, obteniendo de este modo una cepa productora de L-arginina que contenía un *aspA* deletado en el cromosoma. La cepa obtenida se denominó "KCCM10741 Δ *aspA*".

(3) Examen de la productividad de L-arginina de la cepa recombinante

Para examinar el efecto de una deleción de *aspA* en la productividad de L-arginina, el recombinante producido anteriormente *Corynebacterium glutamicum* KCCM10741 Δ *aspA* que es una cepa productora de L-arginina se cultivó de la siguiente manera.

Como un grupo control, se usó la célula huésped, KCCM10741P de *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, se inoculó un asa de la cepa en un matraz con deflectores de 250 ml que contenía 25 ml del siguiente medio de producción, y se cultivó a 30 °C durante 48 horas a 200 rpm. Después de la finalización del cultivo, la producción de L-arginina se midió mediante HPLC, y los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Medio de producción

6 % de glucosa, 3 % de sulfato de amonio, 0,1 % de dihidrógeno fosfato de potasio, 0,2 % de sulfato de magnesio heptahidratado, 1,5 % de licor de maíz (CSL, por sus siglas en inglés), 1 % de NaCl, 0,5 % de extracto de levadura, 100 mg/L de biotina, pH 7,2.

Tabla 1: Comparación de la productividad de L-arginina

Cepa	DO	Concentración de arginina (g/L)
KCCM10741P	91	3,0
KCCM10741P Δ <i>aspA</i>	101	2,4

Como puede observarse en la Tabla 1 anterior, la cepa que contenía *aspA* deletado tenía una capacidad reducida para producir L-arginina, y *aspA* fue un gen significativo en la producción de L-arginina.

Ejemplo 2: Construcción de vector para introducir *aspA* derivado de *Corynebacterium*

Para construir un vector que contenga dos copias de *aspA* (Ncgl1446 que codifica la aspartato amoniaco-lias derivada de *Corynebacterium*, la PCR se realizó mediante el uso del cromosoma de la cepa ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum* como molde y cada uno de un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 6 y un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 8, obteniendo de este modo fragmentos de ADN, cada uno que contiene *aspA*.

Específicamente, un fragmento de aproximadamente 1.893 pb que tiene un sitio de la enzima de restricción *Xma*I en la región 5' y un sitio de la enzima de restricción *Bam*HI en la región 3' se amplificó mediante PCR con la polimerasa *Pfu* mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 5 y 6. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 2 minutos. Mientras tanto, un fragmento de aproximadamente 1.885 pb que tenía un sitio de la enzima de restricción *Bam*HI en la región 5' y un sitio de la enzima de restricción *Xba*I en la región 3' se amplificó mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 7 y 8 de la misma manera que la descrita anteriormente.

Los fragmentos de ADN obtenidos se separaron mediante el uso del kit GeneAll^R ExpinTM GEL SV (Seúl, Corea). Después, el primer fragmento de los dos fragmentos anteriores se trató con *Xma*I y *Bam*HI, y el segundo fragmento se trató con *Bam*HI y *Xba*I. Además, un vector pD se trató con *Xma*I y *Xba*I. Los dos fragmentos de ADN y el vector pD, tratados con las enzimas de restricción, se ligaron y, de este modo se construyó un vector pD1446-2X.

Ejemplo 3: Preparación de cepas recombinantes que tengan una mayor expresión de *aspA*

El vector pD1446-2X construido en el Ejemplo 2 se transformó en cada una de las cepas productoras de L-arginina, KCCM10741P y ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum*, y después estas se sometieron a un segundo cruce,

obteniendo de este modo cepas productoras de L-arginina que contenían 2 copias de *aspA* en el cromosoma. Las cepas obtenidas se denominaron "KCCM10741P::*aspA_2X*" y "ATCC21831::*aspA_2X*", respectivamente.

Ejemplo 4: Construcción del vector para introducir *aspB* derivado de *Corynebacterium*

Para construir un vector que contenga 2 copias de *aspB* (Ncgl0237) que codifican la aspartato aminotransferasa, la PCR se realizó mediante el uso del cromosoma de ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum* como molde y cada uno de un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 9 y 10 y un conjunto de cebadores de las SEQ ID NO: 11 y 12, obteniendo de este modo fragmentos de ADN, cada uno de los cuales contenía *aspB*.

Específicamente, un fragmento de aproximadamente 1.692 pb que tiene un sitio de la enzima de restricción *XmaI* en la región 5' y un sitio de la enzima de restricción *NdeI* en la región 3' se amplificó mediante PCR con la polimerasa *Pfu* mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 9 y 10. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 2 minutos. Mientras tanto, un segundo fragmento de aproximadamente 1.643 pb que tenía un sitio de la enzima de restricción *NdeI* en la región 5' y un sitio de la enzima de restricción *SpeI* en la región 3' se amplificó mediante el mismo procedimiento de PCR descrito anteriormente.

Los fragmentos de ADN obtenidos se aislaron mediante el uso del kit GeneAll[®] Expin[™] GEL SV (Seúl, Corea). Después, el primer fragmento de los dos fragmentos anteriores se trató con *XmaI* y *NdeI*, y el segundo fragmento se trató con *NdeI* y *SpeI*. Además, un vector pD se trató con *XmaI* y *XbaI*. El vector pD y los dos fragmentos de ADN, que se trataron con las enzimas de restricción, se sometieron a ligazón de 3 piezas, construyendo de este modo un vector pD0237-2X.

Ejemplo 5: Preparación de cepas que tengan una mayor expresión de *aspB*

El vector pD0237-2X construido en el Ejemplo 4 se transformó en cada una de las cepas productoras de L-arginina, KCCM10741P y ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum*, y después estas se sometieron a un segundo cruce, obteniendo de este modo cepas productoras de L-arginina que contenían 2 copias de *aspB* en el cromosoma. Las cepas obtenidas se denominaron "KCCM10741P::*aspB_2X*" y "ATCC21831::*aspB_2X*", respectivamente.

Ejemplo 6: Preparación de cepas que tienen una mayor expresión de *aspA* y *aspB*

El vector pD0237-2X construido en el Ejemplo 4 se transformó en cada una de las cepas recombinantes (KCCM10741P::*aspA_2X* y ATCC21831::*aspA_2X*) preparadas en el Ejemplo 3, y después estas se sometieron a un segundo cruce, obteniendo de este modo cepas productoras de L-arginina que contenían 2 copias de *aspA* y *aspB* en el cromosoma. Las cepas obtenidas se denominaron "KCCM10741P::*aspA_2X::aspB_2X*" y "ATCC21831::*aspA_2X::aspB_2X*".

Ejemplo 7: Evaluación de la productividad de L-arginina

Para examinar el efecto de un aumento en *aspA*, *aspB* o ambos *aspA* y *aspB* en la productividad de L-arginina, cada una de las cepas productoras de L-arginina, *Corynebacterium glutamicum* KCCM10741P::*aspA_2X*, ATCC21831::*aspA_2X*, KCCM10741P::*aspB_2X*, ATCC21831::*aspB_2X*, KCCM10741P::*aspA_2X::aspB_2X* y ATCC21831::*aspA_2X::aspB_2X*, preparadas en los Ejemplos 3, 5 y 6, se cultivaron de la siguiente manera.

Como grupo control, se usaron las células huésped de cada una de KCCM10741P y ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, se inoculó un asa de cada una de las cepas en un matraz con deflectores de 250 ml que contenía 25 ml del medio de producción descrito en el Ejemplo 1, y las cepas inoculadas se cultivaron a 30 °C durante 48 horas a 200 rpm. Después de la finalización del cultivo, se midió la producción de L-arginina, y los resultados de la mediciones se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Comparación de la productividad de arginina entre cepas

Cepa	DO	Concentración de arginina (g/L)
KCCM10741P	91	3,0
KCCM10741P:: <i>aspA_2X</i>	90	3,9
KCCM10741P:: <i>aspB_2X</i>	93	3,4
KCCM10741P:: <i>aspA_2X::aspB_2X</i>	93	3,7
ATCC21831	102	4,2
ATCC21831:: <i>aspA_2X</i>	102	5,0

Cepa	DO	Concentración de arginina (g/L)
ATCC21831:: <i>aspB_2X</i>	105	4,7
ATCC21831:: <i>aspA_2X</i> :: <i>aspB_2X</i>	104	5,1

Como puede observarse en la Tabla 2 anterior, la producción de L-arginina se aumentó en los dos tipos de cepas de *Corynebacterium glutamicum* cuando se introdujeron 2 copias de *aspA* en las cepas. Particularmente, la productividad de L-arginina de KCCM10741P::*aspA_2X* se aumentó notablemente en un 30 % en comparación con la del grupo control. KCCM10741P::*aspA_2X* se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM, por sus siglas en inglés), una autoridad depositaria internacional ubicada en 361-221, Hongje 1-dong Seodaemun-gu, Seúl, Corea, el 21 de enero de 2013 bajo el número de acceso KCCM11351P.

Ejemplo 8: Construcción de vector para introducir *aspA* derivado del género *E. coli*

Para introducir *aspA* (NCBI-GeneID: 12933698), se usó un gen que codifica la aspartato amoníaco-liasa derivada del género *E. coli*, en el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum* con una capacidad para producir L-arginina, un sitio Ncgl1221 conocido como un exportador de glutamato (yggB: Appl Environ Microbiol. julio de 2007; 73(14):4491-8).

Para construir un vector que tenga un *aspA* de *E. coli* introducido en sitio Ncgl1221, se construyó un vector pDKO1221 que contenía una alteración génica específica de sitio de Ncgl1221.

Para obtener un fragmento de ADN que contenga una alteración génica específica de sitio de Ncgl1221, se extrajo el cromosoma de ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum*, y se realizó una PCR cruzada mediante el uso del cromosoma como un molde. Específicamente, un fragmento de aproximadamente 789 pb que tiene un sitio de la enzima de restricción EcoRI en la región 5' se amplificó mediante PCR con la polimerasa *Pfu* mediante el uso de cebadores de las SEQ ID NO: 13 y 14. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 60 segundos. Mientras tanto, un fragmento de aproximadamente 835 pb que tenía un sitio de la enzima de restricción *PstI* en la región 3' se amplificó mediante PCR mediante el uso de los cebadores de las SEQ ID NO: 15 y 16 de la misma manera que la descrita anteriormente. Los fragmentos de ADN obtenidos se aislaron mediante el uso del kit GeneAII^R ExpinTM GEL SV (Seúl, Corea) y después se usaron como moldes para la PCR cruzada.

Para obtener un fragmento de ADN que contenga una alteración génica específica de sitio de Ncgl1221, se realizó una PCR cruzada mediante el uso de los dos fragmentos de ADN obtenidos anteriormente como moldes y los cebadores de las SEQ ID NO: 13 y 16. Específicamente, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.602 pb mediante el procedimiento de PCR descrito anteriormente. El fragmento amplificado se trató con las enzimas de restricción EcoRI y *PstI*, y después se ligó con un vector pD tratado con las mismas enzimas de restricción, construyendo de este modo un vector pDKO1221.

Mediante el uso del vector pDKO1221 construido, se construyó un vector que tenía un *aspA* de *E. coli* introducido en este. Para obtener un promotor *cj7* (patente coreana número 10-0620092) que opere en *Corynebacterium glutamicum*, un fragmento de aproximadamente 524 pb que tenía un sitio de la enzima de restricción BamHI en la región 5' se amplificó mediante PCR con la polimerasa *Pfu* mediante el uso de p117 *pcj7-gfp* como molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 17 y 18. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 58 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 30 segundos. El *aspA* derivado de *E. coli* se extrajo del cromosoma de W3110 de *E. coli* mediante el uso de un sistema Genomic-tip (QIAGEN) y se amplificó un fragmento de aproximadamente 1.607 pb que tenía un sitio de la enzima de restricción *XbaI* en la región 3' mediante el uso del cromosoma como un molde y los cebadores de las SEQ ID NO: 19 y 20. Los fragmentos de ADN obtenidos se aislaron mediante el uso del kit GeneAII^R ExpinTM GEL SV (Seúl, Corea) y después se usaron como moldes para la PCR cruzada.

Para obtener un fragmento de ADN de *aspA* derivado de *E. coli*, se realizó la PCR cruzada mediante el uso de los dos fragmentos de ADN obtenidos anteriormente como moldes y los cebadores de las SEQ ID NO: 17 y 20. Específicamente, se amplificó un fragmento de aproximadamente 2.095 pb mediante el procedimiento de PCR descrito anteriormente. El fragmento amplificado se trató con las enzimas de restricción BamHI y *XbaI*, y después se ligó con un vector pDKO1221 tratado con las mismas enzimas de restricción, construyendo de este modo un vector pDKO1221-EC_*aspA*.

Ejemplo 9: Preparación de la cepa recombinante que tenga una mayor expresión de *aspA* de *E. coli*

El vector pDKO1221-EC_*aspA* construido como se describió anteriormente se transformó en cada una de las cepas KCCM10741P y ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum* productoras de L-arginina y estas se sometieron a un segundo cruce, obteniendo de este modo cepas productoras de L-arginina, cada una de las cuales contenía un gen *aspA* derivado de *E. coli* en el cromosoma. Las cepas obtenidas se denominaron "KCCM10741PΔNcgl1221-EC_*aspA*" y "ATCC21831ΔNcgl1221-EC_*aspA*", respectivamente. Además, el vector pDKO1221 construido como se describió

anteriormente se transformó en cada una de las cepas KCCM10741P y ATCC21831 de *Corynebacterium glutamicum* productoras de L-arginina y estas se sometieron a un segundo cruce, obteniendo de este modo las cepas KCCM10741PΔNcgl1221 y ATCC21831ΔNcgl1221, cada una de las cuales contenía un NCgl1221 deletado en el cromosoma.

5

Ejemplo 10: Evaluación de la productividad de L-arginina de cepas recombinantes que tienen una mayor expresión de aspA de E. coli

Para evaluar el efecto de la introducción de *aspA* de *E. coli* en la productividad de L-arginina, las cepas productoras de L-arginina KCCM10741PΔNcgl1221-EC_espA y ATCC21831ΔNcgl1221-EC_espA preparadas en el Ejemplo 9 se cultivaron de la siguiente manera.

10

15

Como grupo control, se cultivaron las células huésped de cada una de KCCM10741P, ATCC21831, KCCM10741PΔNcgl1221 y ATCC21831ΔNcgl1221 de *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, se inoculó un asa de cada cepa en un matraz con deflectores de 250 ml que contenía 25 ml del medio de producción descrito anteriormente y se cultivaron a 30 °C durante 48 horas a 200 rpm. Después de la finalización del cultivo, se midió la producción de L-arginina, y los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Comparación de la productividad de L-arginina

20

Cepa	DO	Concentración de L-Arginina (g/L)
KCCM10741P	91	3,0
KCCM10741PΔNcgl1221	90	3,0
KCCM10741PΔNcgl1221-EC_espA	94	3,6
ATCC21831	102	4,2
ATCC21831ΔNcgl1221	103	4,1
ATCC21831ΔNcgl1221-EC_espA	107	4,7

Como puede observarse en la Tabla 3 anterior, la producción de L-arginina se aumentó en los dos tipos de *Corynebacterium glutamicum* cuando se introdujo *aspA* de *E. coli* en las cepas.

25

Como se describió anteriormente, se divulga en la presente memoria un microorganismo recombinante del género *Corynebacterium*, que tiene una actividad mejorada de la aspartato amoniaco-liasa y/o actividad mejorada de la aspartato aminotransferasa, y por lo tanto tiene una capacidad mejorada para producir L-arginina. El microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* puede producir L-arginina con alto rendimiento y, por lo tanto, es industrialmente útil.

30

Número de Acceso

Autoridad depositaria: Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos

Número de acceso: KCCM11351P

35

Fecha de deposición: 21 de enero de 2013

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> MICROORGANISMO DEL GÉNERO CORYNEBACTERIUM CON PRODUCTIVIDAD MEJORADA DE L-ARGININA Y PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE L-ARGININA MEDIANTE EL USO DEL MISMO

40

<130> PP13-0149

<160> 26

45

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 38

50

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador para la delección de aspA

55

<400> 1
 cgagctcggg acccgggggtg tgcagatgc catcgccg 38

 5 <210> 2
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <223> cebador para la delección de aspA

 <400> 2
 cgccaatgac tggctccatg accgcacgaa ggggtgac cccg 44
 15 <210> 3
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> cebador para la delección de aspA

 <400> 3
 cgggggtgac acccttcgtg cggatcagga gccagtcatt ggcg 44
 25 <210> 4
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> cebador para la delección de aspA

 <400> 4
 tgcaggtcga ctctagagtt cttgcgggtga ccgccacg 38
 35 <210> 5
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <223> cebador para la copia de aspA 2

 <400> 5
 cgagctcggg acccggggtt taactacccc cg 32
 45 <210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador para la copia de aspA 2

 55 <400> 6
 gtcgactcta gaggatccgg ccatatagtc tgctcc 36

 60 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <223> cebador para la copia de aspA 2

 <400> 7

ES 2 761 590 T3

ttttgatcc ttttaactac cccc 24
 <210> 8
 <211> 32
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador para la copia de aspA 2
 10 <400> 8
 gcaggtcgac tctagacggc catatagtct gc 32
 <210> 9
 15 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> cebador para la copia de aspB 2
 <400> 9
 ccagtgaatt cgagctcggg acccgggagc tagaacggct gc 42
 25 <210> 10
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador para la copia de aspB 2
 <400> 10
 ctagctcata tgataaaacg aaaggcccag tctttcgcact gaggcctttcg ttttatgtat 60
 35 tcactctagc tagcg 75
 <210> 11
 <211> 38
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador para la copia de aspB 2
 45 <400> 11
 cgttttatca tatgagctag aacggctgca acacatgg 38
 <210> 12
 <211> 38
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador para la copia de aspB 2
 55 <400> 12
 gcctgcaggc cgacactagt gtattcactc tagctagc 38
 <210> 13
 <211> 30
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> cebador para la delección de yggB
 <400> 13
 5 cggaattcga ggaatagagc gggcataca 30
 <210> 14
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador para la delección de yggB
 <400> 14
 15 gttctagag cgggatcct tgataatagc catggccag 39
 <210> 15
 <211> 41
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador para la delección de yggB
 <400> 15
 25 caaggatccc ggctctagaa acgatggaat ctagcgtcga a 41
 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador para la delección de yggB
 <400> 16
 35 aaaactgcag ctttctggtt ggttgatt ccc 33
 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador para yggB::Pcj7-aspA_EC
 <400> 17
 45 gcgtattatc aaggatcctt ccttcaggct aatctt 36
 <210> 18
 <211> 36
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador para yggB::Pcj7-aspA_EC
 <400> 18
 55 acgaatggtg tttgacatat ggtttcctt tcggtg 36
 <210> 19
 <211> 36
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

ES 2 761 590 T3

<223> cebador para yggB::Pcj7-aspA_EC

<400> 19

caacgaaagg aaacacatat gtcaaacaac attcgt 36

5

<210> 20

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> cebador para yggB::Pcj7-aspA_EC

<400> 20

cgacgctaga ttccatcggt tctagaaact agcata 36

15

<210> 21

<211> 526

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<400> 21

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

25

ES 2 761 590 T3

Gln Ser Thr Asn Asp Ser Tyr Pro Thr Gly Phe Arg Leu Gly Ile Tyr
 195 200 205

Ala Gly Leu Gln Thr Leu Ile Ala Glu Ile Asp Glu Leu Gln Val Ala
 210 215 220

Phe Arg His Lys Gly Asn Glu Phe Val Asp Ile Ile Lys Met Gly Arg
 225 230 235 240

Thr Gln Leu Gln Asp Ala Val Pro Met Ser Leu Gly Glu Glu Phe Arg
 245 250 255

Ala Phe Ala His Asn Leu Ala Glu Glu Gln Thr Val Leu Arg Glu Ala
 260 265 270

Ala Asn Arg Leu Leu Glu Val Asn Leu Gly Ala Thr Ala Ile Gly Thr
 275 280 285

Gly Val Asn Thr Pro Ala Gly Tyr Arg His Gln Val Val Ala Ala Leu
 290 295 300

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

Ala Thr Ser Asp Thr Gly Ala Tyr Val His Ala His Ser Ala Ile Lys
 325 330 335

Arg Ala Ala Met Lys Leu Ser Lys Ile Cys Asn Asp Leu Arg Leu Leu
 340 345 350

Ser Ser Gly Pro Arg Ala Gly Leu Asn Glu Ile Asn Leu Pro Pro Arg
 355 360 365

Gln Ala Gly Ser Ser Ile Met Pro Ala Lys Val Asn Pro Val Ile Pro
 370 375 380

Glu Val Val Asn Gln Val Cys Phe Lys Val Phe Gly Asn Asp Leu Thr
 385 390 395 400

Val Thr Met Ala Ala Glu Ala Gly Gln Leu Gln Leu Asn Val Met Glu
 405 410 415

Pro Val Ile Gly Glu Ser Leu Phe Gln Ser Leu Arg Ile Leu Gly Asn
 420 425 430

Ala Ala Lys Thr Leu Arg Glu Lys Cys Val Val Gly Ile Thr Ala Asn
 435 440 445

Ala Asp Val Cys Arg Ala Tyr Val Asp Asn Ser Ile Gly Ile Ile Thr
 450 455 460

Tyr Leu Asn Pro Phe Leu Gly His Asp Ile Gly Asp Gln Ile Gly Lys
 465 470 475 480

Glu Ala Ala Glu Thr Gly Arg Pro Val Arg Glu Leu Ile Leu Glu Lys
 485 490 495

Lys Leu Met Asp Glu Lys Thr Leu Glu Ala Val Leu Ser Lys Glu Asn
 500 505 510

Leu Met His Pro Met Phe Arg Gly Arg Leu Tyr Leu Glu Asn
 515 520 525

<210> 22
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

5

<400> 22

ES 2 761 590 T3

Met Ser Asn Asn Ile Arg Ile Glu Glu Asp Leu Leu Gly Thr Arg Glu
1 5 10 15

Val Pro Ala Asp Ala Tyr Tyr Gly Val His Thr Leu Arg Ala Ile Glu
20 25 30

Asn Phe Tyr Ile Ser Asn Asn Lys Ile Ser Asp Ile Pro Glu Phe Val
35 40 45

Arg Gly Met Val Met Val Lys Lys Ala Ala Ala Met Ala Asn Lys Glu
50 55 60

Leu Gln Thr Ile Pro Lys Ser Val Ala Asn Ala Ile Ile Ala Ala Cys
65 70 75 80

Asp Glu Val Leu Asn Asn Gly Lys Cys Met Asp Gln Phe Pro Val Asp
85 90 95

Val Tyr Gln Gly Gly Ala Gly Thr Ser Val Asn Met Asn Thr Asn Glu
100 105 110

Val Leu Ala Asn Ile Gly Leu Glu Leu Met Gly His Gln Lys Gly Glu
115 120 125

Tyr Gln Tyr Leu Asn Pro Asn Asp His Val Asn Lys Cys Gln Ser Thr
130 135 140

Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Gly Phe Arg Ile Ala Val Tyr Ser Ser Leu
145 150 155 160

Ile Lys Leu Val Asp Ala Ile Asn Gln Leu Arg Glu Gly Phe Glu Arg
165 170 175

Lys Ala Val Glu Phe Gln Asp Ile Leu Lys Met Gly Arg Thr Gln Leu
180 185 190

Gln Asp Ala Val Pro Met Thr Leu Gly Gln Glu Phe Arg Ala Phe Ser
195 200 205

Ile Leu Leu Lys Glu Glu Val Lys Asn Ile Gln Arg Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Leu Leu Glu Val Asn Leu Gly Ala Thr Ala Ile Gly Thr Gly Leu Asn
225 230 235 240

Thr Pro Lys Glu Tyr Ser Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu Ala Glu Val
245 250 255

Thr Gly Phe Pro Cys Val Pro Ala Glu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Ser
260 265 270

Asp Cys Gly Ala Tyr Val Met Val His Gly Ala Leu Lys Arg Leu Ala
275 280 285

ES 2 761 590 T3

Val Lys Met Ser Lys Ile Cys Asn Asp Leu Arg Leu Leu Ser Ser Gly
 290 295 300

Pro Arg Ala Gly Leu Asn Glu Ile Asn Leu Pro Glu Leu Gln Ala Gly
 305 310 315 320

Ser Ser Ile Met Pro Ala Lys Val Asn Pro Val Val Pro Glu Val Val
 325 330 335

Asn Gln Val Cys Phe Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Thr Val Thr Met
 340 345 350

Ala Ala Glu Ala Gly Gln Leu Gln Leu Asn Val Met Glu Pro Val Ile
 355 360 365

Gly Gln Ala Met Phe Glu Ser Val His Ile Leu Thr Asn Ala Cys Tyr
 370 375 380

Asn Leu Leu Glu Lys Cys Ile Asn Gly Ile Thr Ala Asn Lys Glu Val
 385 390 395 400

Cys Glu Gly Tyr Val Tyr Asn Ser Ile Gly Ile Val Thr Tyr Leu Asn
 405 410 415

Pro Phe Ile Gly His His Asn Gly Asp Ile Val Gly Lys Ile Cys Ala
 420 425 430

Glu Thr Gly Lys Ser Val Arg Glu Val Val Leu Glu Arg Gly Leu Leu
 435 440 445

Thr Glu Ala Glu Leu Asp Asp Ile Phe Ser Val Gln Asn Leu Met His
 450 455 460

Pro Ala Tyr Lys Ala Lys Arg Tyr Thr Asp Glu Ser Glu Gln
 465 470 475

<210> 23
 <211> 1581
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 23

atgtctaaga cgagcaacaa gtcttcagca gactcaaaga atgacgcaaa agccgaagac 60
 attgtgaacg gcgagaacca aatcgccacg aatgagtcgc agtcttcaga cagcgctgca 120
 gtttcggaac gtgtcgtcga accaaaaacc acggttcaga aaaagttccg aatcgaatcg 180
 gatctgcttg gtgaacttca gatcccatcc cacgcatatt acggggtgca cacccttcgt 240
 gcggtggaca acttccaaat ctcacgaacc accatcaacc acgtcccaga ttctattcgc 300
 ggcatggtcc aggtgaaaaa ggccgcagct ttagcaaaacc gccgactgca cacacttcca 360
 gcacaaaaag cagaagcaat tgtctgggct tgtgatcaga tcctcattga ggaacgctgt 420
 atggatcagt tcccacatga tgtgttccag ggtggcgcag gtacctcact gaacatgaac 480
 accaacgagg ttgttgcaa ccttgcaact gagttcttag gccatgaaaa ggcgagtagc 540
 cacatcctgc accccatgga tgatgtgaac atgtcccagt ccaccaacga ttcctaccca 600

ES 2 761 590 T3

actggtttcc gcctgggcat ttacgctgga ctgcagacc tcatoctga aattgatgag 660
cttcaggttg cgttccgcca caagggcaat gaggttgtcg acatcatcaa gatgggcccg 720
accagttgc aggatgctgt tcccatgagc ttgggcgaag agttccgagc attcgcgcac 780
aacctgcgag aagagcagac cgtgctgctg gaagctgcc accgtctcct cgaggtaaat 840
cttggtgcaa ccgcaatcgg tactggtgtg aacctccag caggctaccg ccaccagggt 900
gtcgtgctc tgtctgaggt caccggactg gaactaaagt ccgcacgtga tctcatcgag 960
gctacctctg acaccggtgc atatgttcat gcgcactccg caatcaagcg tgcagccatg 1020
aaactgtcca agatctgtaa cgatctacgt ctgctgtctt ctggctctog tgctggcttg 1080
aacgaaatca acctgccacc acgccaggct ggttcctcca tcatgccagc caaggtcaac 1140
ccagtgatcc cagaagtgt caaccaggtc tgcttcaag tcttcggtaa cgatctcacc 1200
gtcaccatgg ctgcccgaagc tggccagttg cagctcaacg tcatggagcc agtcattggc 1260
gaatccctct tccagtcact gcgcatcctg ggcaatgcag ccaagacttt gcgtgagaag 1320
tgcgtcgtag gaatcaccgc caacgctgat gtttgccgtg cttacgttga taactccatc 1380
gggattatca cttacctgaa cccattcctg ggccacgaca ttggagatca gatcggtaag 1440
gaagcagccg aaactggtcg accagtgcgt gaactcatcc tggaaaagaa gctcatggat 1500
gaaaagacgc tcgaggcagt cctgtccaag gagaacctca tgcaccaat gttccgcgga 1560
aggctctact tggagaacta a 1581

<210> 24
<211> 1437
<212> ADN
<213> Escherichia coli

5

<400> 24

atgtcaaaca acattcgtat cgaagaagat ctggtgggta ccagggaagt tccagctgat 60
gcctactatg gtgttcacac tctgagagcg attgaaaact tctatatcag caacaacaaa 120
atcagtgata ttctgaatt tgttcgcggt atggtaatgg ttaaaaaagc cgcagctatg 180
gcaaacaaaag agctgcaaac cattcctaaa agtgtagcga atgccatcat tgcgcgatgt 240
gatgaagtcc tgaacaacgg aaaatgcatg gatcagttcc cggtagacgt ctaccagggc 300
ggcgcaggta cttccgtaaa catgaacacc aacgaagtgc tggccaatat cggctcggaa 360
ctgatgggtc accaaaaagg tgaatatcag tacctgaacc cgaacgacca tgtaacaaa 420
tgtcagtcca ctaacgacgc ctaccgacc ggtttccgta tcgcagttta ctcttcctg 480
attaagctgg tagatgcat taaccaactg cgtgaaggct ttgaacgtaa agctgtcgaa 540
ttccaggaca tcctgaaaat gggtcgtacc cagctgcagg acgcagtacc gatgaccctc 600
ggtcaggaat tccgcgcttt cagcatcctg ctgaaagaag aagtgaaaaa catccaacgt 660

10

ES 2 761 590 T3

```

accgctgaac tgctgctgga agttaacctt ggtgcaacag caatcggtac tggcttgaac      720
acgccgaaag agtactctcc gctggcagtg aaaaaactgg ctgaagttac tggcttccca      780
tgcgctaccgg ctgaagacct gatcgaagcg acctctgact gggcgctta tgttatggtt      840
cacggcgcgc tgaaacgcct ggctgtgaag atgtccaaaa tctgtaacga cctgcgcttg      900
ctctcttcag gccacagtgc cggcctgaac gagatcaacc tgccggaact gcaggcgggc      960
tcttccatca tgccagctaa agtaaaccgg gttgttccgg aagtggtaa ccaggtatgc     1020
ttcaaagtca tcggtaacga caccactggt accatggcag cagaagcagg tcagctgcag     1080
ttgaacgtta tggagccggt cattggccag gccatgttcg aatccgttca cattctgacc     1140
aacgcttgct acaacctgct ggaaaaatgc attaacggca tcaactgtaa caaagaagtg     1200
tgogaagggt acgtttacaa ctctatcggg atcgttactt acctgaacct gttcatcggg     1260
caccacaacg gtgacatcgt gggtaaaatc tgtgccgaaa ccggtaagag tgtacgtgaa     1320
gtcgttctgg aacgcggctc gttgactgaa gcggaacttg acgatatfff ctccgtacag     1380
aatctgatgc acccggctta caaagcaaaa cgctatactg atgaaagcga acagtaa      1437

```

<210> 25

<211> 426

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 25

```

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

```

5

10

ES 2 761 590 T3

Met Asn Glu Asp Gly Pro Asp Met Asp Ala Val Glu Glu Leu Val Lys
 165 170 175

Asn Pro Gln Val Lys Gly Met Trp Val Val Pro Val Phe Ser Asn Pro
 180 185 190

Thr Gly Phe Thr Val Thr Glu Asp Val Ala Lys Arg Leu Ser Ala Met
 195 200 205

Glu Thr Ala Ala Pro Asp Phe Arg Val Val Trp Asp Asn Ala Tyr Ala
 210 215 220

Val His Thr Leu Thr Asp Glu Phe Pro Glu Val Ile Asp Ile Val Gly
 225 230 235 240

Leu Gly Glu Ala Ala Gly Asn Pro Asn Arg Phe Trp Ala Phe Thr Ser
 245 250 255

Thr Ser Lys Ile Thr Leu Ala Gly Ala Gly Val Ser Phe Phe Leu Thr
 260 265 270

Ser Ala Glu Asn Arg Lys Trp Tyr Thr Gly His Ala Gly Ile Arg Gly
 275 280 285

Ile Gly Pro Asn Lys Val Asn Gln Leu Ala His Ala Arg Tyr Phe Gly
 290 295 300

Asp Ala Glu Gly Val Arg Ala Val Met Arg Lys His Ala Ala Ser Leu
 305 310 315 320

Ala Pro Lys Phe Asn Lys Val Leu Glu Ile Leu Asp Ser Arg Leu Ala
 325 330 335

Glu Tyr Gly Val Ala Gln Trp Thr Val Pro Ala Gly Gly Tyr Phe Ile
 340 345 350

Ser Leu Asp Val Val Pro Gly Thr Ala Ser Arg Val Ala Glu Leu Ala
 355 360 365

Lys Glu Ala Gly Ile Ala Leu Thr Gly Ala Gly Ser Ser Tyr Pro Leu
 370 375 380

Arg Gln Asp Pro Glu Asn Lys Asn Leu Arg Leu Ala Pro Ser Leu Pro
 385 390 395 400

Pro Val Glu Glu Leu Glu Val Ala Met Asp Gly Val Ala Thr Cys Val
 405 410 415

Leu Leu Ala Ala Ala Glu His Tyr Ala Asn
 420 425

<210> 26
 <211> 1281
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 26

atgagttcag tttcgctgca ggattttgat gcagagcgaa ttggtttggt ccacgaggac 60
 10 attaaagcgcga agtttgatga gctcaagtca aaaaatctga agctggatct tactcgcggg 120

ES 2 761 590 T3

aagccttcgt cggagcagtt ggatttcgct gatgagttgt tggcgttgcc tggtaagggt	180
gatttcaagg ctgcggatgg tactgatgtc cgtaactatg gcgggctgga tggcatcggt	240
gatattcgcc agatttgggc ggatttgctg ggtgttcctg tggagcaggt cttggcgggg	300
gatgcttcga gcttgaacat catgtttgat gtgatcagct ggtcgtacat ttcggtaac	360
aatgattcgg ttcagccttg gtcgaaggaa gaaaccgta agtggatttg ccctgttccg	420
ggctatgac gccatttctc catcacggag cgtttcggct ttgagatgat ttctgtgcca	480
atgaatgaag acggccctga tatggatgct gttgaggaat tggatgaaga tccgcagggt	540
aagggcatgt gggttgttcc ggtgttttct aaccgcactg gtttcacggg gacagaagac	600
gtcgaaaagc gtctaagcgc aatgaaacc gcagctccgg acttccgcgt tgtgtggat	660
aatgcctacg ccgttcatac gctgaccgat gaattccctg aggttatcga tatcgtcggg	720
cttggtgagg ccgctggcaa cccgaaccgt ttctgggctg tcaactctac ttcgaagac	780
actctcggg gtgcgggctg gtcgttctc ctcacctctg cggagaaccg caagtgttac	840
accggccatg cgggtatccg tggcattggc cctaacaagg tcaatcagtt ggctcatgcg	900
cgttactttg gcgatgctga gggagtgcgc gcggtgatgc gtaagcatgc tgcgtcgttg	960
gctccgaagt tcaacaagg tctggagatt ctggattctc gccttgctga gtacgggtgc	1020
gcgcagtgga ctgtccctgc gggcggttac ttcatttccc ttgatgtggt tcctggtagc	1080
gcgtctcgcg tggctgagtt ggctaaggaa gccggcatcg cgttgacggg tgcgggttct	1140
tcttaccgcg tgcgtcagga tccggagaac aaaaatctcc gtttggcacc gtcgctgcct	1200
ccagttgagg aacttgaggt tgccatggat ggcgtggcta cctgtgtgct gttggcagca	1260
gcggagcatt acgctaacta a	1281

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo del género *Corynebacterium* con capacidad mejorada para producir L-arginina, que tiene una actividad mejorada de la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:
- 5
- (a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y
- 10
- (b) un procedimiento para reemplazar los promotores de los genes de la aspartato amoniaco-liasa y la aspartato aminotransferasa con promotores fuertes en dicho microorganismo.
2. El microorganismo de la reivindicación 1, en el que la aspartato amoniaco-liasa se deriva de un microorganismo del género *Corynebacterium* o un microorganismo del género *Escherichia coli*.
- 15
3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la aspartato amoniaco-liasa tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 o 22.
4. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la aspartato aminotransferasa tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25.
- 20
5. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
- 25
6. Un procedimiento de producción de L-arginina, que comprende las etapas de:
- cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* con capacidad mejorada para producir L-arginina, el cual tiene una actividad mejorada de la aspartato amoniaco-liasa en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:
- 30
- (a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato amoniaco-liasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato amoniaco-liasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y
- (b) un procedimiento para reemplazar el promotor del gen de la aspartato amoniaco-liasa con un promotor fuerte en dicho microorganismo,
- 35
- en un medio de cultivo; y
recuperar la L-arginina del medio de cultivo.
7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la aspartato amoniaco-liasa se deriva de un microorganismo del género *Corynebacterium* o un microorganismo del género *Escherichia coli*.
- 40
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la aspartato amoniaco-liasa tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 21 o 22.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la actividad de la aspartato aminotransferasa se mejora en comparación con la actividad endógena de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una capacidad para producir L-arginina, en el que dicha actividad mejorada se obtiene mediante un procedimiento seleccionado de:
- 45
- (a) un procedimiento para aumentar el número de copias de una secuencia de nucleótidos que codifica la aspartato aminotransferasa en dicho microorganismo que comprende introducir un gen que codifica la aspartato aminotransferasa en un vector y transformar el microorganismo con el vector; y
- 50
- (b) un procedimiento para reemplazar el promotor del gen de la aspartato aminotransferasa con un promotor fuerte en dicho microorganismo.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la aspartato aminotransferasa tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 25.
- 55
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
- 60

Fig. 1

