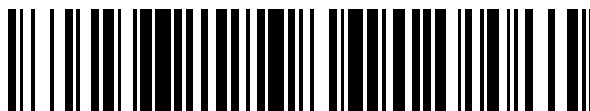


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 661**

51 Int. Cl.:

C12P 13/04 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.02.2012 PCT/JP2012/052947**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12108493**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2012 E 12744294 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 2674499**

54 Título: **Método para producir una sustancia diana mediante un procedimiento de fermentación**

30 Prioridad:

09.02.2011 JP 2011025750

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

28.10.2020

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO BIO CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi, Chiyoda-ku
Tokyo, 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**UJIHARA, TETSURO;
ABE, TETSUYA y
YAGASAKI, MAKOTO**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 2 790 661 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

Método para producir una sustancia diana mediante un procedimiento de fermentación

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una sustancia diana mediante la utilización de una bacteria corineforme, en la que la actividad de una proteína PTS relacionada con la asimilación de la fructosa se ha perdido en comparación con la cepa madre, y que puede producir la sustancia diana.

10

Antecedentes de la técnica

15

Uno de los métodos para mejorar la productividad en un método para producir una sustancia mediante un procedimiento de fermentación incluye un método para modificar la capacidad de incorporación de un azúcar que es un material de partida.

20

Se ha avanzado en la investigación sobre el mecanismo de asimilación de carbohidratos, tales como azúcares, por un microorganismo, y es conocida la clasificación de los mecanismos en varios tipos. Entre ellos se incluye, en particular, un sistema de fosfoenolpiruvato:sacárido fosfotransferasa (en adelante en la presente memoria asimismo denominado PTS, o sistema de fosfotransferasa), que es un transportador que fosforila y, de esta manera, asimila un azúcar importante (documento no de patente nº 1).

25

El sistema PTS está compuesto por un sistema común independiente del sustrato EI (codificado por *ptsI*), Hpr (codificado por *ptsH*) y un componente específico de sustrato EII (documentos no de patente nº 2 a nº 4).

30

El componente específico de sustrato EII varía en tipo según el organismo; sin embargo, con respecto a las bacterias entéricas y las bacterias corineformes, con las que ha avanzado la investigación, se están identificando enzimas EII importantes, y entre ellos, es conocido que un EII específico de fructosa está codificado por *FruA* (*PtsF*) (documento no de patente nº 5).

35

Es conocido que la asimilación de la fructosa por el sistema PTS requiere *FruA*, que externamente asimila la fructosa y la convierte en fructosa-1-fosfato, así como *FruK* (*PfkB*), que convierte la fructosa-1-fosfato en fructosa 1,6-bifosfato, sirviendo como un importante intermediario en la glucólisis (documentos no de patente nº 6 y nº 7).

40

Con respecto a la producción de una sustancia, se conocen varios informes en los que se mejora la productividad mediante la modificación del sistema PTS. Por ejemplo, se conoce un procedimiento para producir un aminoácido utilizando una bacteria del género *Escherichia* con un gen *ptsG* potenciado (documento de patente nº 1) y un procedimiento para producir un aminoácido utilizando una bacteria del género *Escherichia* con un gen *crr* potenciado que funciona de la misma manera que *ptsH*, *ptsI* y *ptsG* (documento de patente nº 2).

45

Además, se conoce un método para acelerar la asimilación y metabolismo de un azúcar que no pasa por el sistema PTS, tal como una pentosa o similar, mediante la disrupción del sistema PTS, que es el sistema de asimilación del azúcar principal, glucosa o similar (documento de patente nº 3).

50

Además, es conocido que la productividad de una sustancia diana puede incrementarse mediante disrupción del sistema PTS, que es el sistema de asimilación de la glucosa, que conduce a la asimilación mediante otra ruta, modificando de esta manera la ruta metabólica del azúcar (documento de patente nº 4). Asimismo es conocido que la productividad puede incrementarse mediante la disrupción del sistema de asimilación de la fructosa y la introducción de una fructocinasa foránea, modificando de esta manera la ruta metabólica del azúcar (documento no de patente nº 5).

55

Sin embargo, no es conocido que pueda producirse eficientemente una sustancia diana mediante la disrupción del sistema de asimilación PTS de un azúcar específico para mejorar la capacidad de la asimilación de otro azúcar mediante el sistema PTS. Además, no se conoce que la capacidad de asimilación de otro azúcar se incremente mediante disrupción simultánea del sistema de asimilación PTS y una ruta metabólica posterior a la asimilación. En particular, debido a que la glucosa desempeña una función central en el control de la asimilación de los azúcares, aunque el sistema de asimilación simplemente se potencie, aparece el problema de que la velocidad de asimilación se reduce a medida que se incrementa la concentración intracelular de glucosa y, por lo tanto, se predice que resultará difícil mejorar la tasa de consumo de la glucosa (documento no de patente nº 8).

60

Listado de referencias

Documentos de patente

65

Documento de patente nº 1: documento WO 03/ 04670

Documento de patente nº 2: documento WO 03/ 04674

Documento de patente nº 3: JP-A-5-49441

Documento de patente nº 4: solicitud publicada de patente US nº 2009/0142843

Documentos no de patente

5

Documento no de patente nº 1: Mol. Microbiol., 35, 699 (2000)

Documento no de patente nº 2: Microbiol. Rev., 57, 543 (1993)

Documento no de patente nº 3: J. Bacteriol., 174, 1433 (1992)

Documento no de patente nº 4: Biochem. Soc. Trans., 33, 220 (2005)

10 Documento no de patente nº 5: FEMS Microbiol. Lett., 244, 259 (2005)

Documento no de patente nº 6: Advan. Enzyme Regul. 42, 349 (2002)

Documento no de patente nº 7: Eur. J. Biochem., 254, 96 (1998)

Documento no de patente nº 8: FEMS Microbiol. Rev., 32, 891 (2008)

15 Sumario de la invención

Problemas que debe resolver la invención

20 Un objetivo de la invención es mejorar la tasa de consumo de azúcares mediante la producción de una sustancia útil mediante un procedimiento de fermentación utilizando una bacteria corineforme.

Medios para resolver los problemas

25 La presente invención se refiere a (1) a (6) a continuación.

(1) Un procedimiento para producir una sustancia diana, que comprende: cultivar, en un medio, una bacteria corineforme en la que la actividad de la proteína FruK y la proteína FruA implicada en el sistema de fosfotransferasa (PTS) relacionado con la asimilación de la fructosa se ha perdido en comparación con la cepa madre, y la bacteria puede producir la sustancia diana, permitiendo que la sustancia diana se forme y se acumule en un cultivo, y recoger la sustancia diana a partir del cultivo.

(2) El procedimiento descrito en (1), anteriormente, en el que la bacteria corineforme en la que se ha perdido la actividad de la proteína FruK y de la proteína FruA, se compara con una cepa madre y la bacteria que puede producir la sustancia diana es una bacteria corineforme en la que la actividad de la proteína FruK y la proteína FruA se ha perdido en comparación con la cepa madre mediante la introducción de una eliminación, una sustitución o una adición de una base en un gen codificante de la proteína en el ADN cromosómico de la cadena parental.

(3) El procedimiento descrito en (1) o (2), anteriormente, en el que la bacteria corineforme es *Corynebacterium glutamicum*.

(4) El procedimiento descrito en cualquiera de (1) a (3), anteriormente, en el que la sustancia diana es un aminoácido, un péptido o una proteína.

(5) El procedimiento descrito en cualquiera de (1) a (4), anteriormente, en el que el aminoácido es un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en L-lisina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-treonina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano, L-cisteína, ácido L-glutámico, L-citrulina, L-glutamina, L-prolina, L-serina, L-ornitina, L-metionina, ácido L-aspártico, L-asparagina y glicina.

50 Efectos de la invención

Según la presente invención, puede producirse eficientemente una sustancia diana mediante la utilización de un procedimiento de fermentación.

55 Formas de realización para poner en práctica la invención

1. Bacteria corineforme para la utilización en la invención

60 La bacteria corineforme para la utilización en la invención es una bacteria corineforme en la que la actividad de la proteína FruK y la proteína FruA implicadas en el sistema de fosfotransferasa (PTS) relacionada con la asimilación de la fructosa se ha perdido en comparación con una cepa madre y la bacteria puede producir una sustancia diana.

65 Se obtiene una bacteria en la que la actividad de una proteína de PTS relacionada con la asimilación de la fructosa está reducida o se ha perdido en comparación con una cepa madre mediante la introducción de una eliminación, una sustitución o una adición de una base a una secuencia de bases de un gen codificante de la proteína PTS de tipo salvaje relacionada con la asimilación de la fructosa, que se encuentra presente en el ADN cromosómico y no

5 presenta ninguna mutación, y entre los ejemplos del mismo pueden incluirse: (a) una bacteria corineforme en la que la actividad de la proteína de PTS relacionada con la asimilación de la fructosa se ha reducido a 80% o menos, preferentemente a 50% o menos, más preferentemente a 30% o menos, todavía más preferentemente a 20% o menos, particularmente preferentemente a 10% o menos, y todavía más preferentemente a 0%, en comparación con una cepa madre, y (b) una bacteria corineforme en la que la cantidad de transcripción del gen o la cantidad producida de la proteína del PTS relacionada con la asimilación de la fructosa se reduce a 80% o menos, preferentemente a 50% o menos, más preferentemente a 30% o menos, todavía más preferentemente a 20% o menos, particularmente preferentemente a 10% o menos, y todavía más preferentemente, a 0% en comparación con la cepa madre. Entre los ejemplos más preferidos de los mismos pueden incluirse una bacteria corineforme en la que el gen codificante de la proteína Fruk o proteína FruA se encuentra parcial o completamente eliminado.

15 El gen codificante de la proteína FruA puede ser cualquier gen con la condición de que codifique un polipéptido con actividad de FruA implicada en la asimilación de la fructosa y una reacción de conversión de la fructosa en fructosa 1-fosfato. El gen codificante de la proteína FruK puede ser cualquier gen con la condición de que un ADN codificante de un polipéptido con actividad de FruK implicado en una reacción de conversión de fructosa 1-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato. Entre los ejemplos específicos pueden incluirse los genes siguientes:

20 [1] un gen codificante de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 1;

[2] un gen codificante de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 2;

25 [3] un gen codificante de una proteína con una identidad de 80% o más, preferentemente de 90% o más, más preferentemente de 95% o más, todavía más preferentemente de 97% o más, particularmente preferentemente de 98% o más, y todavía más preferentemente de 99% o más respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 1 y muestra actividad de asimilación de la fructosa junto con una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 2;

30 [4] un gen codificante de una proteína con una identidad de 80% o más, preferentemente de 90% o más, más preferentemente de 95% o más, todavía más preferentemente de 97% o más, particularmente preferentemente de 98% o más, y todavía más preferentemente de 99% o más respecto a la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 2 y muestra actividad de asimilación de la fructosa junto con una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC ID nº 1;

35 [5] un gen que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID nº 3;

[6] un gen que comprende la secuencia de bases representada por SEC ID nº 4;

40 [7] un gen que se hibrida con un ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 3 bajo condiciones restrictivas, y codifica una proteína que muestra actividad de asimilación de la fructosa junto con una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 2, y

45 [8] un gen que se hibrida con un ADN que consiste en una secuencia de bases complementaria a la secuencia de bases representada por la SEC ID nº 2 bajo condiciones restrictivas, y codifica una proteína que muestra actividad de asimilación de la fructosa junto con una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 1.

50 El gen tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ADN que puede contener una región reguladora de la transcripción, una región promotora y similar además de una región codificante de una proteína.

55 La región reguladora de la transcripción puede incluir un ADN que consiste en 100 bases, preferentemente 50 bases cadena arriba del extremo 5' de una región codificante en un ADN cromosómico. La región del promotor puede incluir una región que corresponde a la región -10 y -35.

60 En la introducción de una eliminación, una sustitución o una adición de una base a un gen codificante de una proteína de PTS relacionada con la asimilación de la fructosa, el tipo de base y el número de bases no se encuentran limitados con la condición de que la eliminación, sustitución o adición de una base cause la pérdida de la actividad en comparación con una cepa madre. La eliminación de una base puede incluir, en el caso de un promotor o una región reguladora de la transcripción, una eliminación de preferentemente 10 bases o más, más preferentemente de 20 bases o más, y todavía más preferentemente toda la región, y en el caso de una región codificante, una eliminación de preferentemente 10 bases o más, más preferentemente de 20 bases o más, todavía más preferentemente de 100 bases o más, particularmente preferentemente de 200 bases o más, y todavía más preferentemente la totalidad de la región codificante.

La sustitución de una base puede incluir una sustitución de una base dentro de las 150 bases, preferentemente una base dentro de las 100 bases, más preferentemente una base dentro de las 50 bases, particularmente preferentemente una base dentro de las 30 bases, y todavía más preferentemente una base dentro de las 20 bases desde el extremo 5' de una región codificante para introducir un codón sin sentido [An Introduction to Genetic Analysis, 7a edición, W. H. Freeman, 2000].

La adición de una base puede incluir una adición de un fragmento de ADN de 50 bases o más, preferentemente de 100 bases o más, más preferentemente de 200 bases o más, todavía más preferentemente de 500 bases o más, y particularmente preferentemente de 1 kb o más, a un sitio inmediatamente cadena abajo de una base dentro de las 150 bases, preferentemente una base dentro de las 100 bases, más preferentemente una base dentro de las 50 bases, particularmente preferentemente una base dentro de las 30 bases, y todavía más preferentemente una base dentro de las 20 bases desde el extremo 5' de una región codificante. Entre los ejemplos particularmente preferidos puede incluirse una inserción de un gen de resistencia al cloranfenicol, un gen de resistencia a la canamicina o similares.

La identidad de las secuencias de aminoácidos y de las secuencias de bases puede determinarse utilizando el algoritmo BLAST de Karlin y Altschul [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873, 1993] o FASTA [Methods Enzymol., 183, 63, 1990]. Basándose en el algoritmo BLAST, se han desarrollado los programas BLASTN y BLASTX [J. Mol. Biol., 215, 403, 1990]. En el caso de que se analice una secuencia de bases utilizando BLASTN basado en BLAST, los parámetros se fijan, por ejemplo, de la manera siguiente, puntuación=100 y longitud de palabra=12. En el caso de que se analice una secuencia de aminoácidos utilizando BLASTX basado en BLAST, los parámetros se fijan, por ejemplo, de la manera siguiente, puntuación=50 y longitud de palabra=3. En el caso de que se utilicen los programas BLAST y BLAST con huecos, se utilizan los parámetros por defecto para cada uno de los programas. Los métodos específicos para dichos métodos analíticos son bien conocidos.

Puede confirmarse si la bacteria es o no una bacteria corineforme en la que la actividad de una proteína del PTS relacionada con la asimilación de la fructosa se encuentra reducida o se ha perdido en comparación con la cepa madre mediante, por ejemplo, la comparación entre la bacteria y la cepa madre de la cantidad transcrita de un gen codificante de la proteína de PTS relacionada con la asimilación de la fructosa utilizando transferencia northern, o de la cantidad producida de la proteína del PTS relacionada con la asimilación de la fructosa utilizando transferencia western.

Además, puede confirmarse si la bacteria es o no una bacteria corineforme en la que la actividad de una proteína del PTS relacionada con la asimilación de la fructosa se encuentra reducida o se perdido en comparación con la cepa madre, observando si al cultivar la bacteria en un medio que contiene fructosa como única fuente de carbono, la bacteria no crece o crece poco en comparación con la cepa madre.

El término "hibridación" tal como se ha utilizado anteriormente se refiere a la hibridación de un ADN con un ADN que presenta una secuencia de bases específica o una parte del ADN. Por lo tanto, el ADN que comprende una secuencia de bases específica o una parte de la misma es un ADN que puede utilizarse como una sonda en un análisis de transferencia northern o southern, y asimismo puede utilizarse como un cebador oligonucleótido en un análisis de PCR. El ADN que debe utilizarse como una sonda puede incluir un ADN de por lo menos 100 bases o más, preferentemente de 200 bases o más, y más preferentemente de 500 bases o más. El ADN para la utilización como cebador puede incluir un ADN de por lo menos 10 bases o más, y preferentemente de 15 bases o más.

El método para el experimento de hibridación del ADN es bien conocido y, por ejemplo, según la descripción de la presente solicitud, el experto en la materia podrá determinar las condiciones de hibridación. Las condiciones de hibridación se describen en Molecular Cloning, 2a y 3a ed. (2001), Methods for General and Molecular Bacteriology, ASM Press (1994), o Immunology Methods Manual, Academic Press (1996), y asimismo la hibridación puede llevarse a cabo según cualquiera de entre varios otros libros de texto estándares.

Además, asimismo según el manual de instrucciones que acompaña a un kit de hibridación disponible comercialmente, puede obtenerse un ADN que se hibrida bajo condiciones restrictivas. El kit de hibridación disponible comercialmente puede incluir, por ejemplo, un kit con el que se produce una sonda mediante un método de cebado aleatorio y se lleva a cabo la hibridación bajo condiciones restrictivas.

Las condiciones restrictivas mencionadas anteriormente preferentemente son condiciones bajo las que un filtro sobre el que se ha inmovilizado un ADN y un ADN sonda se incuban durante la noche a 42°C en una solución que contiene formamida al 50%, 5x SSC (cloruro sódico 750 mM y citrato sódico 75 mmoles/l), fosfato sódico 50 mmoles/l (pH 7.6), 5x solución de Denhardt, dextrán sulfato al 10% y 20 µg/l de un ADN de esperma de salmón desnaturalizado y después se lava el filtro en, por ejemplo, una solución 0.2x SSC a aproximadamente 65°C; sin embargo, asimismo pueden utilizarse condiciones menos restrictivas. Las condiciones restrictivas pueden modificarse mediante el ajuste de la concentración de formamida (a medida que la concentración de formamida se reduce, se reduce la restrictividad) o mediante la modificación de la concentración salina y las condiciones de temperatura. Entre las condiciones de baja restrictividad pueden incluirse, por ejemplo, condiciones en las que la incubación se lleva a cabo durante la noche a 37°C en una solución que contiene 6x SSCE (20x SSCE contiene

3 moles/l de cloruro sódico, 0.2 moles/l de dihidrogenofosfato sódico y 0.02 moles/l de EDTA a pH 7.4), SDS al 0.5%, formamida al 30% y 100 µg/l de un ADN de esperma de salmón desnaturalizado y después se lleva a cabo el lavado utilizando una solución que contiene 1x SSC y SDS al 0.1% a 50°C. Además, las condiciones de menor restrictividad pueden incluir condiciones en las que, en las condiciones de baja restrictividad mencionadas anteriormente, se lleva a cabo la hibridación utilizando una solución con una elevada concentración salina (por ejemplo, 5x SSC) y después se lleva a cabo el lavado.

Las diversas condiciones mencionadas anteriormente asimismo pueden fijarse mediante adición o modificación de un reactivo de bloqueo que debe utilizarse para suprimir el fondo en el experimento de hibridación. La adición del reactivo de bloqueo puede acompañarse de un cambio en las condiciones de hibridación para adaptar las condiciones.

El ADN que puede hibridarse bajo las condiciones restrictivas mencionadas anteriormente puede incluir un ADN que presenta una identidad de por lo menos 90% o más, preferentemente 95% o más, más preferentemente 97% o más, todavía más preferentemente 98% o más, y particularmente preferentemente 99% o más respecto a un ADN que consiste en una secuencia de bases representada por SEC ID nº 3 o nº 4 al llevar a cabo el cálculo basándose en los parámetros mencionados anteriormente y similares utilizando, por ejemplo, BLAST FASTA o similares.

La expresión "puede producir una sustancia diana" se refiere a la capacidad de producir una sustancia diana en el caso de que una bacteria corineforme para la utilización en la invención se cultive en un medio en la medida en que la sustancia diana puede recogerse de las células o del medio.

La bacteria corineforme que puede producir una sustancia diana puede incluir, en el caso de que una cepa madre originalmente presente una propiedad capaz de producir una sustancia diana, una bacteria corineforme en la que se ha potenciado la propiedad, y en el caso de que una cepa madre no presente la propiedad, una bacteria corineforme a la que se ha proporcionado artificialmente la propiedad.

La bacteria corineforme para la utilización en la invención puede incluir una bacteria corineforme perteneciente al género *Corynebacterium*, el género *Brevibacterium* o el género *Microbacterium*.

Entre los ejemplos de un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* puede incluirse *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium melassecola*, *Corynebacterium thermoaminogenes* y similares, y entre los ejemplos específicos de los mismos puede incluirse *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13060, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13826 (nombre anterior: *Brevibacterium flavum*), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14020 (nombre anterior: *Brevibacterium divaricatum*), *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 (nombre anterior: *Brevibacterium lactofermentum*), *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium callunae* ATCC 15991, *Corynebacterium herculis* ATCC 13868, *Corynebacterium lilium* ATCC 15990, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium thermoaminogenes* ATCC 9244 y similares.

Entre los ejemplos de un microorganismo pertenecientes al género *Brevibacterium* puede incluirse *Brevibacterium saccharolyticum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium thiogenitalis* y similares, y entre los ejemplos específicos de los mismos puede incluirse *Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066, *Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068, *Brevibacterium roseum* ATCC 13825, *Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240 y similares.

Entre los ejemplos de un microorganismo pertenecientes al género *Microbacterium* puede incluirse *Microbacterium ammoniaphilum* y similares, y entre los ejemplos específicos de los mismos puede incluirse *Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354 y similares.

2. Procedimiento para producir la bacteria corineforme de la invención

La bacteria corineforme de la invención puede obtenerse mediante la utilización de una bacteria corineforme que puede producir una sustancia diana y presenta la actividad de la proteína FruK y la proteína FruA (en adelante en la presente memoria asimismo denominada actividad de FruKA) como cepa madre, y

eliminar la actividad de FruKA de la cepa madre mediante la utilización de un método capaz de introducir una mutación en una bacteria corineforme, tal como un método habitual de tratamiento de mutaciones, un método de sustitución génica mediante una técnica de ADN recombinante o similar, un método de fusión similar, o un método de transducción; un método capaz de suprimir la expresión de un gen codificante de la proteína FruK y de la proteína FruA, tal como un método antisentido o similar.

La cepa madre puede ser una cepa de tipo salvaje o una cepa reproductiva que ha sido artificialmente cruzada a

partir de la cepa de tipo salvaje, con la condición de que sea una bacteria corineforme que presente la capacidad de producir una sustancia diana y asimismo actividad de FruKA.

5 Entre los ejemplos del método para proporcionar artificialmente una capacidad de producir una sustancia diana a una bacteria corineforme puede incluirse:

- (a) un método para aliviar o cancelar por lo menos un mecanismo de control de la biosíntesis de la sustancia diana,
- 10 (b) un método para potenciar la expresión de por lo menos un enzima que participa en la biosíntesis de la sustancia diana,
- (c) un método para incrementar el número de copias de por lo menos un gen codificante de un enzima que participa en la biosíntesis de la sustancia diana,
- 15 (d) un método para atenuar o bloquear por lo menos una de las rutas metabólicas que se ramifican en la ruta de biosíntesis de la sustancia diana en un metabolito diferente de la sustancia diana, y
- 20 (e) un método para seleccionar una estirpe celular que presenta un grado más elevado de resistencia a un análogo de la sustancia diana que la cepa de tipo salvaje.

Los métodos mencionados anteriormente pueden utilizarse individualmente o en combinación de unos con otros.

25 Como método para preparar una bacteria corineforme que presenta la capacidad de producir una sustancia diana, en particular en el caso de que la sustancia diana sea un aminoácido, un método para preparar una bacteria corineforme que presenta la capacidad de producir el aminoácido, utilizando cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, (a) a (e), o un método de combinación de los mismos, se describe una gran cantidad de ejemplos en *Biotechnology* 2a ed., vol. 6, *Products of Primary Metabolism* (VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1996) sección 14a, 14b o *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 79, 1-35, 2003; *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2089-2094, 1987 y *Amino Acid Fermentation*, Gakkai Shuppan Center, Hiroshi Aida, et al., 1986. Además, además de las publicaciones mencionadas anteriormente, se ha informado de un método específico para preparar una bacteria corineforme que presenta la capacidad de producir un aminoácido en un gran número de publicaciones, tales como JP-A-2003-164297, *Agric. Biol. Chem.*, 39, 153-160, 1975; *Agric. Biol. Chem.*, 39, 1149-1153, 1975; JP-A-58-13599, *J. Gen. US Microbiol.*, 4, 272-283, 1958; JP-A-63-94985, *Agric. Biol. Chem.*, 37, 2013-2023 (1973); documentos WO 97/15673, JP-A-56-18596, JP-A-56-144092, JP-A-2003-511086 y WO 2006/001380, y una bacteria corineforme que presenta la capacidad de producir un aminoácido puede prepararse haciendo referencia a cualquiera de las publicaciones mencionadas anteriormente, etc.

40 Entre los ejemplos de la bacteria corineforme que presenta la capacidad de producir L-arginina preparada mediante el método mencionado anteriormente puede incluirse *Corynebacterium glutamicum* RB2631 (documento WO 2006/035831) y entre los ejemplos de la bacteria corineforme que presenta la capacidad de producir L-lisina preparada mediante el método mencionado anteriormente puede incluirse *Corynebacterium glutamicum* AHP-3 (FERM nº BP-7382).

45 Una bacteria corineforme que puede utilizarse para preparar la bacteria corineforme mencionada anteriormente con una capacidad de producir una sustancia diana puede ser cualquier bacteria con la condición de que sea una bacteria corineforme en la que puedan aplicarse los métodos mencionados anteriormente, (a) a (e), o una bacteria corineforme que presente las características genéticas mencionadas anteriormente, y entre los ejemplos preferidos de la misma puede incluirse la bacteria corineforme mencionada anteriormente perteneciente al género *Corynebacterium*, al género *Brevibacterium* o al género *Microbacterium*.

50 Entre los ejemplos del método de tratamiento de mutaciones puede incluirse un método utilizando N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) (*Microorganism Experiment Manual*, 1986, p. 131, Kodansha Scientific, Ltd.) y un método de irradiación UV y similares.

55 Entre los ejemplos de un método de sustitución génica mediante una técnica de ADN recombinante puede incluirse un método en el que se introduce una sustitución, una eliminación o una adición de una o más bases en un gen codificante de la proteína FruK y de la proteína FruA (en adelante en la presente memoria asimismo denominado gen *FruKA*) *in vitro*, el gen se integra en el cromosoma de una cepa madre mediante recombinación homóloga o similar, y además, el gen *FruKA* originalmente presente en el cromosoma se sustituye mediante recombinación homóloga o similar.

60 Entre los ejemplos del método para introducir una sustitución, una eliminación o una adición de una o más bases en el gen *FruKA* pueden incluirse un método según un método de mutagénesis específica de sitio descrita en, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 (en adelante en la presente memoria abreviadamente "Molecular Cloning 3a ed."), *Current Protocols in Molecular Biology*, John

Wiley & Sons (1987-1997) (en adelante en la presente memoria abreviadamente "Current Protocols in Molecular Biology"), Nucleic Acids Research, 10, 6487, 1982; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409, 1982; Gene, 34, 315, 1985; Nucleic Acids Research, 13, 4431, 1985; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488, 1985, o similares.

5 La sustitución génica mediante una técnica de ADN recombinante puede llevarse a cabo mediante la introducción de una mutación en el gen *FruKA* según el método descrito en J. Bacteriol. 182, 6884, 2000, o similares.

10 El gen *FruKA* puede obtenerse mediante el método de PCR o similares basado en la información conocida de la secuencia de bases del gen *FruKA* derivada de *Corynebacterium glutamicum* [por ejemplo, los números de acceso del National Center for Biotechnology Information (NCBI) NC_006958 REGION: 2012568 a 2013560, NC_006958 REGION: 2013557 a 2015623].

15 Mediante la inserción del gen *FruKA* en el que se ha introducido la mutación (en adelante en la presente memoria denominado 'gen mutante') en un vector plásmido apropiado o similar, se produce un plásmido recombinante.

Como vector plásmido puede utilizarse, por ejemplo, un plásmido que no puede replicarse autónomamente en la cepa madre, y presenta un gen marcador de resistencia a antibióticos y un gen de leván sucrasa *sacB* de *Bacillus subtilis* [Mol. Microbiol., 6, 1195, 1992].

20 Como método para introducir el plásmido recombinante que presenta el ADN mutante en la cepa madre, puede utilizarse cualquier método con la condición de que sea un método capaz de introducir un ADN en una bacteria corineforme, y entre los ejemplos de la misma pueden incluirse un método de electroporación [Appl. Microbiol. Biotech., 52, 541, 1999], un método de protoplasto [J. Bacteriol., 159, 306, 1984] y similares.

25 Debido a que el plásmido recombinante no puede replicarse autónomamente en la cepa madre, mediante la obtención de una cepa que muestra resistencia a un antibiótico correspondiente al marcador de resistencia a los antibióticos contenido en el plásmido recombinante, puede obtenerse una cepa transformante en la que se ha integrado el plásmido recombinante en el cromosoma.

30 Además, mediante un método de selección que utiliza el hecho de que la leván sucrasa de *Bacillus subtilis* integrada en el cromosoma junto con el gen mutante produce un sustrato suicida [J. Bacteriol. 174, 5462, 1992], puede obtenerse una cepa en la que el gen *FruKA* en el cromosoma de la cepa madre ha sido sustituido por el gen mutante.

35 Mediante el método anteriormente descrito, puede llevarse a cabo la sustitución de un gen en el cromosoma de una cepa madre; sin embargo, no se encuentra limitado al método anteriormente descrito y asimismo puede utilizarse otro método de sustitución génica con la condición de que sea un método capaz de sustituir un gen en el cromosoma de una bacteria corineforme.

40 Entre los ejemplos del método para introducir una sustitución, una eliminación o una adición en el gen *FruKA* en el cromosoma de la cepa madre puede incluirse un método de fusión y un método de transducción diferente de los métodos mencionados anteriormente, y por ejemplo, el método descrito en Amino Acid Fermentation, Gakkai Shuppan Center, editado por Hiroshi Aida, et al., 1986.

45 El número de bases para introducir una mutación no se encuentra limitado con la condición de que sea un número capaz de eliminar la actividad de *FruKA* mediante la introducción de una sustitución, una eliminación o una adición de bases en el gen *FruKA*. El sitio en que se introduce la mutación no se encuentra necesariamente limitado a un sitio en la secuencia de bases de una región codificante del gen *FruKA* con la condición de que sea un sitio capaz de eliminar la actividad de *FruKA* debido a la mutación, y puede encontrarse en una región reguladora de la transcripción/traducción del gen *FruKA*, aunque preferentemente es una región codificante del gen *FruKA*.

Entre los ejemplos del método de pérdida de la actividad de *FruKA* mediante la introducción de una sustitución de una base puede incluirse un método para introducir una mutación sin sentido.

55 Entre los métodos para introducir una mutación sin sentido puede incluirse, por ejemplo, un método en el que se lleva a cabo una PCR utilizando un cebador que contiene un codón de parada y el gen *FruKA*, y el gen *FruKA* en el cromosoma de una cepa madre se sustituye, utilizando el gen *FruKA* obtenido en el que se ha introducido una mutación sin sentido.

60 Entre los ejemplos del método para eliminar la actividad de *FruKA* mediante la introducción de una eliminación de una secuencia de bases puede incluirse un método en el que un gen *FruKA* mutante obtenido mediante escisión del gen *FruK* y del gen *FruA* con un enzima de restricción o similar, eliminación de una secuencia de bases compuesta por un número apropiado de bases y después ligación de los fragmentos resultantes nuevamente, se integra en el cromosoma.

65 Puede obtenerse una cepa en la que se ha perdido la actividad de *FruKA* mediante la utilización del hecho de que

- 5 la cepa en la que se ha perdido la actividad de FruKA crece lentamente o no puede crecer en un medio que contiene fructosa como única fuente de carbono, obteniendo por lo tanto una cepa que crece de la misma manera que la cepa madre en el caso de que se utilice glucosa como única fuente de carbono pero que no crece, o crece extremadamente mal, en comparación con la cepa madre en un medio en el que se utiliza fructosa como única fuente de carbono entre las bacterias corineformes en las que se ha introducido la mutación.
- 10 El método para seleccionar una bacteria corineforme en la que se ha perdido la actividad de FruKA asimismo puede utilizarse como un método para seleccionar una bacteria corineforme que presenta una tasa de consumo de azúcar mejorada en comparación con la cepa madre y, por lo tanto, resulta más adecuada para producir una sustancia útil.
- 15 Mediante el cultivo de la bacteria corineforme obtenida de esta manera, en la que la bacteria presenta la capacidad de producir una sustancia diana y se ha perdido la actividad de FruKA en comparación con la cepa madre, permitiendo la producción y acumulación en el cultivo de la sustancia diana y la recolección de la misma, puede producirse la sustancia diana. La bacteria corineforme para la utilización en la invención asimismo es una bacteria corineforme cuya tasa de consumo de azúcar se ha mejorado y, por lo tanto, la sustancia diana puede producirse eficientemente.
- 20 El cultivo de la bacteria corineforme puede llevarse a cabo mediante un método convencional de cultivo de bacterias con la capacidad de producir una sustancia diana.
- 25 Como medio, puede utilizarse un medio sintético o un medio natural, con la condición de que sea un medio que contenga cantidades apropiadas de una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y similares.
- 30 Como fuente de carbono, puede utilizarse principalmente glucosa. Asimismo puede utilizarse una azúcar que resulta asimilado mediante el sistema de PTS diferente de la glucosa; sin embargo, debido a que se ha perdido la actividad de FruKA, no resulta preferente utilizar sacarosa o fructosa.
- 35 Como fuente de nitrógeno, puede utilizarse amonio, cualquiera de entre una diversidad de sales inorgánicas y orgánicas de amonio, tales como cloruro amónico, sulfato amónico, carbonato amónico y acetato amónico, urea, otro compuesto nitrogenado o una sustancia orgánica nitrogenada, tal como extracto de carne, extracto de levadura, licor de maceración del maíz o hidrolizado de soja.
- 40 Como sal inorgánica, puede utilizarse fosfato monopotásico, fosfato secundario de potasio, sulfato amónico, cloruro sódico, sulfato de magnesio, carbonato de calcio o similares.
- 45 Además de los mencionados anteriormente, puede añadirse según resulte necesario una fuente menor de nutrientes, tal como biotina, tiamina, nicotinamida o ácido nicotínico. Dicha fuente menor de nutrientes asimismo puede sustituirse por un aditivo al medio, tal como extracto de carne, extracto de levadura, licor de maceración del maíz, casaminoácido o similares.
- 50 El cultivo se lleva a cabo bajo condiciones aeróbicas, tales como el cultivo de agitación o el cultivo de centrifuga sumergido bajo aireación. En general, la temperatura de cultivo es preferentemente de 20°C a 42°C, y más preferentemente de 30°C a 40°C. El pH del medio se mantiene preferentemente en torno a un pH neutro, en un intervalo de 5 a 9. El pH del medio se ajusta con un ácido inorgánico u orgánico, una solución alcalina, urea, carbonato cálcico, amonio, un amortiguador del pH o similar.
- 55 El periodo de cultivo es generalmente de 1 a 6 días.
- 60 La recolección de la sustancia diana a partir del cultivo después de completar el cultivo no requiere un método especial. Es decir, la sustancia diana acumulada extracelularmente puede recogerse mediante combinación de un método de resina de intercambio iónico convencionalmente conocida y otros métodos según el tipo de sustancia diana. Además, la sustancia diana acumulada intracelularmente puede recogerse mediante disrupción física o enzimática de las células bacterianas, y la recolección de la sustancia diana a partir del homogeneizado de células bacterianas o fracción de membranas según el tipo de sustancia diana. Incidentalmente, dependiendo de la sustancia diana, asimismo resulta posible utilizar la sustancia diana en un estado de presencia en las células bacterianas como catalizador microbiano o similar.
- 65 La sustancia útil que puede producirse según la invención no se encuentra particularmente limitada, aunque entre los ejemplos de la misma pueden incluirse aminoácidos, péptidos y proteínas.
- Entre los ejemplos del aminoácido pueden incluirse L-lisina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-treonina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano, L-cisteína, ácido L-glutámico, L-citrulina, L-glutamina, L-prolina, L-serina, L-ornitina, L-metionina, ácido L-aspártico, L-asparagina y glicina, y entre los ejemplos preferidos pueden incluirse ácido L-aspártico, ácido L-glutámico y L-aminoácidos obtenidos mediante biosíntesis pasando por ácido L-aspártico, ácido L-glutámico o ácido pirúvico en una ruta metabólica microbiana.

Entre los ejemplos de los L-aminoácidos obtenidos mediante biosíntesis pasando por ácido L-aspártico pueden incluirse L-metionina, L-lisina, L-treonina, L-asparagina y similares, y entre los ejemplos del L-aminoácido obtenido mediante biosíntesis pasando por ácido L-glutámico pueden incluirse L-glutamina, L-arginina, L-ornitina, L-prolina y similares. Entre los ejemplos del L-aminoácido obtenidos mediante biosíntesis pasando por ácido pirúvico pueden incluirse L-alanina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina y similares.

Entre los ejemplos del péptido pueden incluirse dipéptidos, tales como alanil-glutamina y carnosina, y tripéptidos, tales como glutatión y ejemplos de la proteína pueden incluirse polipéptidos biológicamente activos, tales como G-CSF, eritropoyetina y HGF.

A continuación en la presente memoria, se describen ejemplos de la invención; sin embargo, la presente invención no se encuentra limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1

(1) Construcción de plásmido para la disrupción génica

El plásmido pHSG299 [Gene 61, 63, 1987] con un gen que proporcionaba resistencia a la canamicina se trató con *Pst*I. A continuación, se ligó un fragmento de ADN de 2,6 pares de kilobases (en adelante en la presente memoria abreviadamente 'kb') que contenía un gen de leván sucraza *sacB* derivado de *Bacillus subtilis* [Mol. Microbiol., 6, 1195, 1992] se ligó con el plásmido en el sitio de corte, de manera que se obtuvo el plásmido pESB30.

(2) Construcción de plásmido para crear la cepa de disrupción del gen *fruKA*

Según el método de Saito et al. [Biochim. Biophys. Acta, 72, 619, 1963], se preparó el ADN cromosómico de la cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Mediante la utilización del ADN cromosómico como molde y asimismo utilizando cada uno de: una combinación de un ADN que consistía en una secuencia de bases representada por SEC ID nº 5 con un ADN que consistía en una secuencia de bases representada por la SEC ID nº 6, y una combinación de un ADN que consistía en una secuencia de bases representada por la SEC ID nº 7 con un ADN que consistía en una secuencia de bases representada por la SEC ID nº 8 como un conjunto de cebadores; se llevaron a cabo 2 tipos de reacciones de PCR utilizando la ADN polimerasa PrimeSTAR Max (fabricada por Takara Bio, Inc.) y un amortiguador acompañante. Se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa dos productos de PCR de aproximadamente 0,5 kb obtenidos mediante PCR, respectivamente, y se extrajeron utilizando gel Wizard(R) SV y un sistema PCR Clean-Up (fabricado por Promega Co., Ltd.) y se purificaron.

Además, mediante la utilización de cada uno de los dos productos purificados como molde, se llevó a cabo una PCR utilizando un ADN que consistía en una secuencia de bases representada por la SEC ID nº 5 y un ADN compuesto por una secuencia de bases representada por la SEC ID nº 8 como conjunto de cebadores. El producto de PCR obtenido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa y se extrajo utilizando gel Wizard(R) SV y el sistema PCR Clean-Up, y se purificó, de manera que se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 1,0 kb. El fragmento de ADN obtenido se trató con un enzima de restricción utilizando el enzima de restricción Sse8378I (fabricado por Takara Bio, Inc.) y un amortiguador acompañante. El fragmento obtenido tratado con el enzima de restricción se extrajo utilizando gel Wizard(R) SV y el sistema PCR Clean-Up, y se purificó.

Simultáneamente, el pESB30 creado anteriormente se trató con Sse8378I y se mezcló con el fragmento obtenido tratado con el enzima de restricción y después, se llevó a cabo una reacción de ligasa utilizando un kit de ligación Ver.1 (fabricado por Takara Bio, Inc.). Mediante la utilización del producto de reacción, se transformó la cepa *Escherichia coli* Dh5 α (preparada por Toyo Co., Ltd.) siguiendo un procedimiento común. La cepa se cultivó en un medio de agar LB [un medio que contenía 10 g de triptona Bacto (fabricada por Difco Co., Ltd.), 5 g de extracto de levadura (fabricado por Difco Co., Ltd.), 10 g de cloruro sódico y 16 g de agar Bacto (fabricado por Difco Co., Ltd.) en 1 l de agua y se ajustó a pH 7.0] que contenía 20 μ g/ml de canamicina y se seleccionó una cepa transformante. La cepa transformante se cultivó durante la noche con un medio LB que contenía 20 μ g/ml de canamicina y se preparó el plásmido mediante el método de álcali-SDS (Molecular Cloning 3a ed.) a partir del caldo de cultivo obtenido. El plásmido obtenido de esta manera se denominó pDfruKA.

(3) Creación de cepa de disrupción del gen *FruKA*

Mediante la utilización del plásmido pDfruKA preparado en (2), se transformó una cepa de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 mediante el método de electroporación según el método de Rest et al. [Appl. Microbiol. Biotech., 52, 541, 1999] y se seleccionaron las cepas resistentes a la canamicina. Se presume que, en las cepas resistentes a la canamicina, pDfruKA se ha integrado en el cromosoma de cada una de las cepas mediante recombinación homóloga de tipo Campbell. En dichas cepas, el ADN codificante de *fruKA* originalmente presente en el cromosoma y un ADN con una estructura en la que *fruKA* en pDfruKA se ha interrumpido, se encuentran presentes próximos entre sí, y la segunda recombinación homóloga resulta fácil que se produzca entre ellos.

Debido a que la leván sacarosa codificada por *sacB* convierte la sacarosa en un sustrato suicida, un microorganismo con *sacB* no puede crecer en un medio que contiene sacarosa. Sin embargo, una cepa en la que se ha producido la segunda recombinación homóloga entre un ADN en una región en torno al gen *fruKA* originalmente presente en el cromosoma y un ADN con una estructura en la que el gen *fruKA* en pDfruKA se ha interrumpido, se ha eliminado cualquiera de los ADN junto con *sacB* y, por lo tanto, la cepa puede crecer incluso en un medio que contiene sacarosa. De esta manera, puede obtenerse un microorganismo en el que el gen *fruKA* originalmente presente en el cromosoma de un microorganismo huésped se encuentra eliminado.

Mediante la utilización de lo anterior, la cepa transformante mencionada anteriormente se aplicó sobre un medio de agar Suc [un medio que contiene 100 g de sacarosa, 7 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 3 g de cloruro sódico, 5 g de extracto de levadura (fabricado por Difco Co., Ltd.) y 15 g de agar Bacto (fabricado por Difco Co., Ltd.) en 1 l de agua y se ajustó a pH 7.2] y se cultivó a 30°C durante 1 día y después se seleccionaron las colonias que crecieron.

Cada una de las colonias obtenidas de esta manera se inoculó en un medio que contenía fructosa como única fuente de carbono [un medio que contenía 4 g de cloruro amónico, 1 g de fosfato monopotásico, 3 g de fosfato dipotásico, 2 g de urea, 100 mg de biotina, 5 mg de hidrócloruro de tiamina, 5 mg de ácido nicotínico, 10 mg de heptahidrato de sulfato de hierro, 1 mg de heptahidrato de sulfato de cinc, 0,2 mg de pentahidrato de sulfato de cobre, 1 mg de pentahidrato de sulfato de manganeso, 10 mg de cloruro de calcio, 10 g de fructosa, 0,4 g de sulfato de magnesio y 15 g de agar Bacto (fabricado por Difco Co., Ltd.) en 1 l de agua y se ajustó a pH 7.2] y se obtuvo una colonia que crecía poco o no podía crecer y se denominó cepa WTΔfruKA.

(4) Creación de cepa de disrupción del gen *FruA*

Mediante la utilización del mismo método que en el caso de la disrupción del gen *FruKA*, asimismo se creó a modo de control una cepa en la que únicamente el gen *FruA* de la cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (en adelante en la presente memoria denominada cepa WT) se había interrumpido.

La creación de un plásmido para la disrupción del gen *FruA* se llevó a cabo de la misma manera que en el caso de la cepa de disrupción del gen *FruKA*, excepto en que se utilizaron los ADN que consistían en las secuencias de bases representadas por SEC ID nº 9 y SEC ID nº 10 como un conjunto de cebadores de los ADN que consistían en las secuencias de bases representadas por SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7.

La cepa creada de esta manera se inoculó en un medio que contenía fructosa como única fuente de carbono y una colonia que crecía mal o que no podía crecer se denominó cepa WTΔfruA.

(5) Evaluación de la cepa WTΔfruKA y de la cepa WTΔfruA

Cada una de las cepas WT obtenidas, cepa WTΔfruKA y cepa WTΔfruA, se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 2 l que contenía 6 g de carbonato cálcico en 300 ml de un medio de inoculación (un medio que contenía 60 g de glucosa, 5 g de licor de maceración del maíz, 80 g de sulfato amónico, 12 g de monohidrogenofosfato potásico, 4 g de heptahidrato de sulfato de magnesio, 40 mg de heptahidrato de sulfato de hierro, 20 mg de pentahidrato de sulfato de manganeso, 2 mg de sulfato de cobre, 2 mg de hexahidrato de cloruro de níquel, 2 mg de hexahidrato de cloruro de cobalto, 200 mg de dihidrato de cloruro de calcio, 40 mg de tetrahidrato de heptamolíbato de Hexa-amonio, 40 mg de β-alanina, 40 mg de ácido nicotínico, 40 mg de hidrócloruro de tiamina y 0.4 mg de biotina en 1 l de agua y se ajustó el pH a 7.2) y se cultivó a 28°C durante 24 horas. Se inocularon 100 ml de dicho cultivo inóculo en un fermentador de jarra que contenía 1150 ml de un medio de cultivo principal (un medio que contenía 60 g de glucosa, 5 g de licor de maceración del maíz, 80 g de sulfato amónico, 12 g de monohidrogenofosfato potásico, 4 g de heptahidrato de sulfato de magnesio, 40 mg de heptahidrato de sulfato de hierro, 20 mg de pentahidrato de sulfato de manganeso, 2 mg de sulfato de cobre, 2 mg de hexahidrato de cloruro de níquel, 2 mg de hexahidrato de cloruro de cobalto, 200 mg de dihidrato de cloruro de calcio, 40 mg de heptamolíbato de Hexa-amonio, 40 mg de β-alanina, 40 mg de ácido nicotínico, 40 mg de hidrócloruro de tiamina y 0.4 mg de biotina en 1 l de agua) y cada cepa se cultivó a 37°C. El cultivo se llevó a cabo ajustando simultáneamente el pH con una solución acuosa de amonio a fin de mantener el pH a 6.7. Se completó el cultivo en el momento en que se había consumido por completo la glucosa en el medio y se midió el tiempo de cultivo en ese momento.

En consecuencia, tal como se muestra en la tabla 1, la tasa de consumo de azúcar era elevada en el caso de la cepa WTΔfruKA, en la que se había interrumpido el gen *FruKA*.

[Tabla 1]

Tiempo requerido para consumir por completo la glucosa al 6% contenida al inicio y cantidad de células en ese tiempo		
Cepa	Tiempo requerido para el consumo (horas)	DO
WT	13.5	65.3
WTΔfruKA	11.5	64.2
WTΔfruA	13.5	64.4

Ejemplo 2

Producción de L-arginina

5

Tal como se muestra en la tabla 1, se obtuvo un efecto de mejora del consumo de azúcar mediante disrupción del gen *FruKA* de la cepa de tipo salvaje y, por lo tanto, con el fin de confirmar la aplicación de la misma a la producción de una sustancia útil, se creó un a cepa de eliminación del gen *FruKA* de una cepa RB2631, que es una cepa productora de L-arginina (documento nº WO 2006/035831) y se examinó la capacidad de producir arginina de la

10

Mediante el mismo método descrito en el ejemplo 1, se creó una cepa RB2631 Δ *fruKA*, que es una cepa de eliminación del gen *FruKA* de la cepa RB2631 y una cepa RB2631 Δ *fruA*, que es una cepa de eliminación del gen *FruA* de la cepa RB2631.

15

Se cultivó cada una de dichas cepas en un fermentador de jarra bajo las mismas condiciones que las indicadas en el ejemplo 1. Sin embargo, la temperatura de cultivo se fijó en 37°C.

20

En consecuencia, tal como se muestra en la tabla 2, se demostró que la tasa de consumo de azúcar y la productividad de L-arginina eran elevadas en el caso de la cepa RB2631 Δ *fruKA* en la que se había interrumpido el gen *FruKA*.

[Tabla 2]

Tiempo requerido para consumir por completo la glucosa al 6% contenida al inicio y el título en ese tiempo			
Cepa	Tiempo requerido para el consumo (horas)	DO	L-arginina (g/l)
RB2631	11	84.6	1.57
RB2631 Δ <i>fruKA</i>	9	74.4	2.05
RB2631 Δ <i>fruA</i>	15	79.8	1.59

25

Ejemplo 3

Examen utilizando la cepa productora de L-lisina

30

Se creó una cepa de eliminación del gen *FruKA* y una cepa de eliminación del gen *FruA* de una cepa AHP-3 (FERM BP-7382), que es una cepa productora de L-lisina, en la que la L-lisina es un aminoácido cuya ruta biosintética es diferente de la ruta de la L-arginina, y se examinó la productividad de la L-lisina de la misma.

35

Mediante el mismo método descrito en el ejemplo 1, se creó una cepa AHP-3 Δ *fruKA*, que es una cepa de eliminación del gen *FruKA* de la cepa RB2631 y una cepa RB2631 Δ *fruA*, que es una cepa de eliminación del gen *FruA* de la cepa AHP-3.

40

Se cultivó cada una de dichas cepas en un fermentador de jarra bajo las mismas condiciones que las indicadas en el ejemplo 1.

En consecuencia, tal como se muestra en la tabla 3, se demostró que la tasa de consumo de azúcar y la productividad de la L-lisina eran elevadas en el caso de la cepa AHP-3 Δ *fruKA* en la que se había interrumpido el gen *FruKA*.

45

[Tabla 3]

Tiempo requerido para consumir por completo la glucosa al 6% contenida al inicio y el título en ese tiempo			
Cepa	Tiempo requerido para el consumo (horas)	DO	L-lisina (g/l)
AHP-3	11	25.7	9.9
AHP-3 Δ <i>fruKA</i>	9.5	26.7	12.8
AHP-3 Δ <i>fruA</i>	14.5	23.2	11.6

Aplicabilidad industrial

50

Según la presente invención, puede producirse eficientemente una sustancia diana mediante la utilización de un procedimiento de fermentación.

Listado de secuencias

- 5 SEC ID nº 5 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 6 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 7 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 8 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 9 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético
- SEC ID nº 10 - Descripción de secuencia artificial ADN sintético

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KYOWA HAKKO BIO CO., LTD.
 <120> Procedimiento para producir una sustancia mediante fermentación
 5 <130> 1000P12181
 <150> JP2011-025750
 <151> 2011-02-09
 <160> 10
 <170> PatentIn versión 3.1
 10 <210> 1
 <211> 993
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <220>
 15 <221> CDS
 <222> (1)..(993)
 <400> 1
 atg atc atc aca ttc acc cca aac ccg agt att gat tcc acg ctg tcg 48
 Met Ile Ile Thr Phe Thr Pro Asn Pro Ser Ile Asp Ser Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 ctc ggc gaa gag ctc tcc cgt gga tcc gtc caa cga ctt gat tcc gtc 96
 Leu Gly Glu Glu Leu Ser Arg Gly Ser Val Gln Arg Leu Asp Ser Val
 20 25 30
 acc gct gtc gca ggt ggt aaa ggc atc aat gtc gcc cac gct gtc ttg 144
 Thr Ala Val Ala Gly Gly Lys Gly Ile Asn Val Ala His Ala Val Leu
 35 40 45
 ctt gcg ggc ttt gaa acc ttg gct gtg ttc cca gcc ggc aag ctc gac 192
 Leu Ala Gly Phe Glu Thr Leu Ala Val Phe Pro Ala Gly Lys Leu Asp
 50 55 60
 ccc ttc gtc cca ctg gtc cgc gac atc ggc ttg ccc gtg gaa act gtt 240
 Pro Phe Val Pro Leu Val Arg Asp Ile Gly Leu Pro Val Glu Thr Val
 65 70 75 80
 gtg atc aac aag aac gtc cgc acc aac acc aca gtc acc gaa ccg gac 288
 Val Ile Asn Lys Asn Val Arg Thr Asn Thr Thr Val Thr Glu Pro Asp
 85 90 95
 ggc acc acc acc aag ctc aac ggc ccc ggc gcg ccg ctc agc gag cag 336
 Gly Thr Thr Thr Lys Leu Asn Gly Pro Gly Ala Pro Leu Ser Glu Gln
 100 105 110
 aag ctc cgt agc ttg gaa aag gtg ctt atc gac gcg ctc cgc ccc gaa 384
 Lys Leu Arg Ser Leu Glu Lys Val Leu Ile Asp Ala Leu Arg Pro Glu
 115 120 125
 gtc acc tgg gtt gtc ctg gcg ggc tcg ctg cca cca ggg gca cca gtt 432
 Val Thr Trp Val Val Leu Ala Gly Ser Leu Pro Pro Gly Ala Pro Val
 130 135 140
 gac tgg tac gcg cgt ctc acc gcg ttg atc cat tca gca cgc cct gac 480
 Asp Trp Tyr Ala Arg Leu Thr Ala Leu Ile His Ser Ala Arg Pro Asp

ES 2 790 661 T3

	145		150		155		160										
	ggt	cgc	gtg	gct	gtc	gat	acc	tca	gac	aag	cca	ctg	atg	gcg	ttg	ggc	528
	Val	Arg	Val	Ala	Val	Asp	Thr	Ser	Asp	Lys	Pro	Leu	Met	Ala	Leu	Gly	
				165						170					175		
	gag	agc	ttg	gat	aca	cct	ggc	gct	gct	ccg	aac	ctg	att	aag	cca	aat	576
	Glu	Ser	Leu	Asp	Thr	Pro	Gly	Ala	Ala	Pro	Asn	Leu	Ile	Lys	Pro	Asn	
				180						185				190			
	ggt	ctg	gaa	ctg	ggc	cag	ctg	gct	aac	act	gat	ggt	gaa	gag	ctg	gag	624
	Gly	Leu	Glu	Leu	Gly	Gln	Leu	Ala	Asn	Thr	Asp	Gly	Glu	Glu	Leu	Glu	
			195					200					205				
	gcg	cgt	gct	gcg	caa	ggc	gat	tac	gac	gcc	atc	atc	gca	gct	gcg	gac	672
	Ala	Arg	Ala	Ala	Gln	Gly	Asp	Tyr	Asp	Ala	Ile	Ile	Ala	Ala	Ala	Asp	
		210					215					220					
	gta	ctg	gtt	aac	cgt	ggc	atc	gaa	cag	gtg	ctt	gtc	acc	ttg	ggt	gcc	720
	Val	Leu	Val	Asn	Arg	Gly	Ile	Glu	Gln	Val	Leu	Val	Thr	Leu	Gly	Ala	
	225					230					235					240	
	gca	gga	gcg	gtg	ttg	gtc	aac	gca	gaa	ggt	gcg	tgg	act	gct	act	tct	768
	Ala	Gly	Ala	Val	Leu	Val	Asn	Ala	Glu	Gly	Ala	Trp	Thr	Ala	Thr	Ser	
				245						250					255		
	cca	aag	att	gat	gtt	gta	tcc	acc	gtt	gga	gct	gga	gac	tgt	gct	ctt	816
	Pro	Lys	Ile	Asp	Val	Val	Ser	Thr	Val	Gly	Ala	Gly	Asp	Cys	Ala	Leu	
				260					265					270			
	gca	ggt	ttt	gtt	atg	gca	cgt	tcc	cag	aag	aaa	aca	ctg	gag	gaa	tct	864
	Ala	Gly	Phe	Val	Met	Ala	Arg	Ser	Gln	Lys	Lys	Thr	Leu	Glu	Glu	Ser	
			275					280					285				
	ctg	ctg	aat	gcc	gtg	tct	tac	ggc	tcg	act	gcg	gcg	tct	ctt	cct	ggc	912
	Leu	Leu	Asn	Ala	Val	Ser	Tyr	Gly	Ser	Thr	Ala	Ala	Ser	Leu	Pro	Gly	
			290				295					300					
	act	acc	att	cct	cgt	cct	gac	caa	ctc	gcc	aca	gct	ggt	gca	acg	gtc	960
	Thr	Thr	Ile	Pro	Arg	Pro	Asp	Gln	Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	Ala	Thr	Val	
	305					310					315					320	
	acc	caa	gtc	aaa	gga	ttg	aaa	gaa	tca	gca	tga						993
	Thr	Gln	Val	Lys	Gly	Leu	Lys	Glu	Ser	Ala							
				325						330							
	<210>	2															
	<211>	2067															
	<212>	ADN															
5	<213>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>															
	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(2067)															
	<400>	2															
	atg	aat	agc	gta	aat	aat	tcc	tcg	ctt	gtc	cgg	ctg	gat	gtc	gat	ttc	48
	Met	Asn	Ser	Val	Asn	Asn	Ser	Ser	Leu	Val	Arg	Leu	Asp	Val	Asp	Phe	
	1				5					10					15		
10	ggc	gac	tcc	acc	acg	gat	gtc	atc	aac	aac	ctt	gcc	act	gtt	att	ttc	96
	Gly	Asp	Ser	Thr	Thr	Asp	Val	Ile	Asn	Asn	Leu	Ala	Thr	Val	Ile	Phe	

ES 2 790 661 T3

20					25					30						
gac	gct	ggc	cga	gct	tcc	tcc	gcc	gac	gcc	ctt	gcc	aaa	gac	gcg	ctg	144
Asp	Ala	Gly	Arg	Ala	Ser	Ser	Ala	Asp	Ala	Leu	Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	
		35					40					45				
gat	cgt	gaa	gca	aag	tcc	ggc	acc	ggc	ggt	cct	ggt	caa	ggt	gct	atc	192
Asp	Arg	Glu	Ala	Lys	Ser	Gly	Thr	Gly	Val	Pro	Gly	Gln	Val	Ala	Ile	
	50					55				60						
ccc	cac	tgc	cgt	tcc	gaa	gcc	gta	tct	gtc	cct	acc	ttg	ggc	ttt	gct	240
Pro	His	Cys	Arg	Ser	Glu	Ala	Val	Ser	Val	Pro	Thr	Leu	Gly	Phe	Ala	
	65				70					75					80	
cgc	ctg	agc	aag	ggt	gtg	gac	ttc	agc	gga	cct	gat	ggc	gat	gcc	aac	288
Arg	Leu	Ser	Lys	Gly	Val	Asp	Phe	Ser	Gly	Pro	Asp	Gly	Asp	Ala	Asn	
			85						90					95		
ttg	gtg	ttc	ctc	att	gca	gca	cct	gct	ggc	ggc	ggc	aaa	gag	cac	ctg	336
Leu	Val	Phe	Leu	Ile	Ala	Ala	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Lys	Glu	His	Leu	
			100					105					110			
aag	atc	ctg	tcc	aag	ctt	gct	cgc	tcc	ttg	gtg	aag	aag	gat	ttc	atc	384
Lys	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Arg	Ser	Leu	Val	Lys	Lys	Asp	Phe	Ile	
		115					120					125				
aag	gct	ctg	cag	gaa	gcc	acc	acc	gag	cag	gaa	atc	gtc	gac	ggt	gtc	432
Lys	Ala	Leu	Gln	Glu	Ala	Thr	Thr	Glu	Gln	Glu	Ile	Val	Asp	Val	Val	
	130					135					140					
gat	gcc	gtg	ctc	aac	cca	gca	cca	aaa	acc	acc	gag	cca	gct	gca	gct	480
Asp	Ala	Val	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Thr	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	
	145				150					155					160	
ccg	gct	gcg	gcg	gcg	ggt	gct	gag	agt	ggg	gcg	gcg	tcg	aca	agc	ggt	528
Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Ser	Val	
				165					170					175		
act	cgt	atc	gtg	gca	atc	acc	gca	tgc	cca	acc	ggt	atc	gca	cac	acc	576
Thr	Arg	Ile	Val	Ala	Ile	Thr	Ala	Cys	Pro	Thr	Gly	Ile	Ala	His	Thr	
			180					185					190			
tac	atg	gct	gcg	gat	tcc	ctg	acg	caa	aac	gcg	gaa	ggc	cgc	gat	gat	624
Tyr	Met	Ala	Ala	Asp	Ser	Leu	Thr	Gln	Asn	Ala	Glu	Gly	Arg	Asp	Asp	
		195					200					205				
gtg	gaa	ctc	ggt	gtg	gag	act	cag	ggc	tct	tcc	gct	gtc	acc	cca	gtc	672
Val	Glu	Leu	Val	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Ser	Ser	Ala	Val	Thr	Pro	Val	
	210					215					220					
gat	ccg	aag	atc	atc	gaa	gct	gcc	gac	gcc	gtc	atc	ttc	gcc	acc	gac	720
Asp	Pro	Lys	Ile	Ile	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Val	Ile	Phe	Ala	Thr	Asp	
	225				230					235					240	
gtg	gga	ggt	aaa	gac	cgc	gag	cgt	ttc	gct	ggc	aag	cca	gtc	att	gaa	768
Val	Gly	Val	Lys	Asp	Arg	Glu	Arg	Phe	Ala	Gly	Lys	Pro	Val	Ile	Glu	
			245					250						255		
tcc	ggc	gtc	aag	cgc	gcg	atc	aat	gag	cca	gcc	aag	atg	atc	gac	gag	816
Ser	Gly	Val	Lys	Arg	Ala	Ile	Asn	Glu	Pro	Ala	Lys	Met	Ile	Asp	Glu	
			260					265					270			
gcc	atc	gca	gcc	tcc	aag	aac	cca	aac	gcc	cgc	aag	ggt	tcc	ggt	tcc	864

ES 2 790 661 T3

Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Lys	Asn	Pro	Asn	Ala	Arg	Lys	Val	Ser	Gly	Ser		
		275					280					285					
ggt	gtc	gcg	gca	tct	gct	gaa	acc	acc	ggc	gag	aag	ctc	ggc	tgg	ggc		912
Gly	Val	Ala	Ala	Ser	Ala	Glu	Thr	Thr	Gly	Glu	Lys	Leu	Gly	Trp	Gly		
	290					295					300						
aag	cgc	atc	cag	cag	gca	gtc	atg	acc	ggc	gtg	tcc	tac	atg	gtt	cca		960
Lys	Arg	Ile	Gln	Gln	Ala	Val	Met	Thr	Gly	Val	Ser	Tyr	Met	Val	Pro		
305					310					315					320		
ttc	gta	gct	gcc	ggc	ggc	ctc	ctg	ttg	gct	ctc	ggc	ttc	gca	ttc	ggt		1008
Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Phe	Gly		
				325					330						335		
gga	tac	gac	atg	gcg	aac	ggc	tgg	caa	gca	atc	gcc	acc	cag	ttc	tct		1056
Gly	Tyr	Asp	Met	Ala	Asn	Gly	Trp	Gln	Ala	Ile	Ala	Thr	Gln	Phe	Ser		
			340					345					350				
ctg	acc	aac	ctg	cca	ggc	aac	acc	gtc	gat	ggt	gac	ggc	gtg	gcc	atg		1104
Leu	Thr	Asn	Leu	Pro	Gly	Asn	Thr	Val	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Ala	Met		
		355					360					365					
acc	ttc	gag	cgt	tca	ggc	ttc	ctg	ttg	tac	ttc	ggc	gca	gtc	ctg	ttc		1152
Thr	Phe	Glu	Arg	Ser	Gly	Phe	Leu	Leu	Tyr	Phe	Gly	Ala	Val	Leu	Phe		
	370					375					380						
gcc	acc	ggc	caa	gca	gcc	atg	ggc	ttc	atc	gtg	gca	gcc	ctg	tct	ggc		1200
Ala	Thr	Gly	Gln	Ala	Ala	Met	Gly	Phe	Ile	Val	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly		
385					390					395					400		
tac	acc	gca	tac	gca	ctt	gct	gga	cgc	cca	ggc	atc	gcg	ccg	ggc	ttc		1248
Tyr	Thr	Ala	Tyr	Ala	Leu	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Ile	Ala	Pro	Gly	Phe		
				405					410						415		
gtc	ggt	ggc	gcc	atc	tcc	gtc	acc	atc	ggc	gct	ggc	ttc	att	ggt	ggt		1296
Val	Gly	Gly	Ala	Ile	Ser	Val	Thr	Ile	Gly	Ala	Gly	Phe	Ile	Gly	Gly		
			420					425						430			
ctg	ggt	acc	ggt	atc	ttg	gct	ggt	ctc	att	gcc	ctg	tgg	att	ggc	tcc		1344
Leu	Val	Thr	Gly	Ile	Leu	Ala	Gly	Leu	Ile	Ala	Leu	Trp	Ile	Gly	Ser		
			435				440							445			
tgg	aag	gtg	cca	cgc	gtg	gtg	cag	tca	ctg	atg	cct	gtg	gtc	atc	atc		1392
Trp	Lys	Val	Pro	Arg	Val	Val	Gln	Ser	Leu	Met	Pro	Val	Val	Ile	Ile		
	450					455					460						
ccg	cta	ctt	acc	tca	gtg	ggt	ggt	ggt	ctc	gtc	atg	tac	ctc	ctg	ctg		1440
Pro	Leu	Leu	Thr	Ser	Val	Val	Val	Gly	Leu	Val	Met	Tyr	Leu	Leu	Leu		
465					470					475					480		
ggt	cgc	cca	ctc	gca	tcc	atc	atg	act	ggt	ttg	cag	gac	tgg	cta	tcg		1488
Gly	Arg	Pro	Leu	Ala	Ser	Ile	Met	Thr	Gly	Leu	Gln	Asp	Trp	Leu	Ser		
				485					490						495		
tca	atg	tcc	gga	agc	tcc	gcc	atc	ttg	ctg	ggt	atc	atc	ttg	ggc	ctc		1536
Ser	Met	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Ile	Leu	Leu	Gly	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu		
			500					505							510		
atg	atg	tgt	ttc	gac	ctc	ggc	gga	cca	gta	aac	aag	gca	gcc	tac	ctc		1584
Met	Met	Cys	Phe	Asp	Leu	Gly	Gly	Pro	Val	Asn	Lys	Ala	Ala	Tyr	Leu		
		515					520								525		

ES 2 790 661 T3

ttt ggt acc gca ggc ctg tct acc ggc gac caa gct tcc atg gaa atc 1632
 Phe Gly Thr Ala Gly Leu Ser Thr Gly Asp Gln Ala Ser Met Glu Ile
 530 535 540

atg gcc gcg atc atg gca gct ggc atg gtc cca cca atc gcg ttg tcc 1680
 Met Ala Ala Ile Met Ala Ala Gly Met Val Pro Pro Ile Ala Leu Ser
 545 550 555 560

att gct acc ctg ctg cgc aag aag ctg ttc acc cca gca gag caa gaa 1728
 Ile Ala Thr Leu Leu Arg Lys Lys Leu Phe Thr Pro Ala Glu Gln Glu
 565 570 575

aac ggc aag tct tcc tgg ctg ctt ggc ctg gca ttc gtc tcc gaa ggt 1776
 Asn Gly Lys Ser Ser Trp Leu Leu Gly Leu Ala Phe Val Ser Glu Gly
 580 585 590

gcc atc cca ttc gcc gca gct gac cca ttc cgt gtg atc cca gca atg 1824
 Ala Ile Pro Phe Ala Ala Ala Asp Pro Phe Arg Val Ile Pro Ala Met
 595 600 605

atg gct ggc ggt gca acc act ggt gca atc tcc atg gca ctg ggc gtc 1872
 Met Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Ile Ser Met Ala Leu Gly Val
 610 615 620

ggc tct cgg gct cca cac ggc ggt atc ttc gtg gtc tgg gca atc gaa 1920
 Gly Ser Arg Ala Pro His Gly Gly Ile Phe Val Val Trp Ala Ile Glu
 625 630 635 640

cca tgg tgg ggc tgg ctc atc gca ctt gca gca ggc acc atc gtg tcc 1968
 Pro Trp Trp Gly Trp Leu Ile Ala Leu Ala Ala Gly Thr Ile Val Ser
 645 650 655

acc atc gtt gtc atc gca ctg aag cag ttc tgg cca aac aag gcc gtc 2016
 Thr Ile Val Val Ile Ala Leu Lys Gln Phe Trp Pro Asn Lys Ala Val
 660 665 670

gct gca gaa gtc gcg aag caa gaa gca caa caa gca gct gta aac gca 2064
 Ala Ala Glu Val Ala Lys Gln Glu Ala Gln Gln Ala Val Asn Ala
 675 680 685

taa 2067
 <210> 3
 <211> 330
 <212> PRT
 5 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 <400> 3
 Met Ile Ile Thr Phe Thr Pro Asn Pro Ser Ile Asp Ser Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Glu Glu Leu Ser Arg Gly Ser Val Gln Arg Leu Asp Ser Val
 20 25 30
 Thr Ala Val Ala Gly Gly Lys Gly Ile Asn Val Ala His Ala Val Leu
 35 40 45
 Leu Ala Gly Phe Glu Thr Leu Ala Val Phe Pro Ala Gly Lys Leu Asp

ES 2 790 661 T3

```

        50                      55                      60

Pro Phe Val Pro Leu Val Arg Asp Ile Gly Leu Pro Val Glu Thr Val
65                      70                      75                      80

Val Ile Asn Lys Asn Val Arg Thr Asn Thr Thr Val Thr Glu Pro Asp
                      85                      90                      95

Gly Thr Thr Thr Lys Leu Asn Gly Pro Gly Ala Pro Leu Ser Glu Gln
                      100                     105                     110

Lys Leu Arg Ser Leu Glu Lys Val Leu Ile Asp Ala Leu Arg Pro Glu
                      115                     120                     125

Val Thr Trp Val Val Leu Ala Gly Ser Leu Pro Pro Gly Ala Pro Val
130                      135                      140

Asp Trp Tyr Ala Arg Leu Thr Ala Leu Ile His Ser Ala Arg Pro Asp
145                      150                     155                     160

Val Arg Val Ala Val Asp Thr Ser Asp Lys Pro Leu Met Ala Leu Gly
                      165                      170                      175

Glu Ser Leu Asp Thr Pro Gly Ala Ala Pro Asn Leu Ile Lys Pro Asn
                      180                      185                      190

Gly Leu Glu Leu Gly Gln Leu Ala Asn Thr Asp Gly Glu Glu Leu Glu
                      195                      200                      205

Ala Arg Ala Ala Gln Gly Asp Tyr Asp Ala Ile Ile Ala Ala Ala Asp
210                      215                      220

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

Ala Gly Ala Val Leu Val Asn Ala Glu Gly Ala Trp Thr Ala Thr Ser
                      245                      250                      255

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

Ala Gly Phe Val Met Ala Arg Ser Gln Lys Lys Thr Leu Glu Glu Ser
                      275                      280                      285

Leu Leu Asn Ala Val Ser Tyr Gly Ser Thr Ala Ala Ser Leu Pro Gly
290                      295                      300

Thr Thr Ile Pro Arg Pro Asp Gln Leu Ala Thr Ala Gly Ala Thr Val
305                      310                      315                      320

Thr Gln Val Lys Gly Leu Lys Glu Ser Ala
                      325                      330

```

<210> 4

<211> 688

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

5

ES 2 790 661 T3

<400> 4

Met Asn Ser Val Asn Asn Ser Ser Leu Val Arg Leu Asp Val Asp Phe
1 5 10 15

Gly Asp Ser Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Leu Ala Thr Val Ile Phe
20 25 30

Asp Ala Gly Arg Ala Ser Ser Ala Asp Ala Leu Ala Lys Asp Ala Leu
35 40 45

Asp Arg Glu Ala Lys Ser Gly Thr Gly Val Pro Gly Gln Val Ala Ile
50 55 60

Pro His Cys Arg Ser Glu Ala Val Ser Val Pro Thr Leu Gly Phe Ala
65 70 75 80

Arg Leu Ser Lys Gly Val Asp Phe Ser Gly Pro Asp Gly Asp Ala Asn
85 90 95

Leu Val Phe Leu Ile Ala Ala Pro Ala Gly Gly Gly Lys Glu His Leu
100 105 110

Lys Ile Leu Ser Lys Leu Ala Arg Ser Leu Val Lys Lys Asp Phe Ile
115 120 125

Lys Ala Leu Gln Glu Ala Thr Thr Glu Gln Glu Ile Val Asp Val Val
130 135 140

Asp Ala Val Leu Asn Pro Ala Pro Lys Thr Thr Glu Pro Ala Ala Ala
145 150 155 160

Pro Ala Ala Ala Ala Val Ala Glu Ser Gly Ala Ala Ser Thr Ser Val
165 170 175

Thr Arg Ile Val Ala Ile Thr Ala Cys Pro Thr Gly Ile Ala His Thr
180 185 190

ES 2 790 661 T3

Tyr Met Ala Ala Asp Ser Leu Thr Gln Asn Ala Glu Gly Arg Asp Asp
 195 200 205
 Val Glu Leu Val Val Glu Thr Gln Gly Ser Ser Ala Val Thr Pro Val
 210 215 220
 Asp Pro Lys Ile Ile Glu Ala Ala Asp Ala Val Ile Phe Ala Thr Asp
 225 230 235 240
 Val Gly Val Lys Asp Arg Glu Arg Phe Ala Gly Lys Pro Val Ile Glu
 245 250 255
 Ser Gly Val Lys Arg Ala Ile Asn Glu Pro Ala Lys Met Ile Asp Glu
 260 265 270
 Ala Ile Ala Ala Ser Lys Asn Pro Asn Ala Arg Lys Val Ser Gly Ser
 275 280 285
 Gly Val Ala Ala Ser Ala Glu Thr Thr Gly Glu Lys Leu Gly Trp Gly
 290 295 300
 Lys Arg Ile Gln Gln Ala Val Met Thr Gly Val Ser Tyr Met Val Pro
 305 310 315 320
 Phe Val Ala Ala Gly Gly Leu Leu Leu Ala Leu Gly Phe Ala Phe Gly
 325 330 335
 Gly Tyr Asp Met Ala Asn Gly Trp Gln Ala Ile Ala Thr Gln Phe Ser
 340 345 350
 Leu Thr Asn Leu Pro Gly Asn Thr Val Asp Val Asp Gly Val Ala Met
 355 360 365
 Thr Phe Glu Arg Ser Gly Phe Leu Leu Tyr Phe Gly Ala Val Leu Phe
 370 375 380
 Ala Thr Gly Gln Ala Ala Met Gly Phe Ile Val Ala Ala Leu Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Thr Ala Tyr Ala Leu Ala Gly Arg Pro Gly Ile Ala Pro Gly Phe
 405 410 415
 Val Gly Gly Ala Ile Ser Val Thr Ile Gly Ala Gly Phe Ile Gly Gly
 420 425 430
 Leu Val Thr Gly Ile Leu Ala Gly Leu Ile Ala Leu Trp Ile Gly Ser
 435 440 445

ES 2 790 661 T3

Trp Lys Val Pro Arg Val Val Gln Ser Leu Met Pro Val Val Ile Ile
450 455 460

Pro Leu Leu Thr Ser Val Val Val Gly Leu Val Met Tyr Leu Leu Leu
465 470 475 480

Gly Arg Pro Leu Ala Ser Ile Met Thr Gly Leu Gln Asp Trp Leu Ser
485 490 495

Ser Met Ser Gly Ser Ser Ala Ile Leu Leu Gly Ile Ile Leu Gly Leu
500 505 510

Met Met Cys Phe Asp Leu Gly Gly Pro Val Asn Lys Ala Ala Tyr Leu
515 520 525

Phe Gly Thr Ala Gly Leu Ser Thr Gly Asp Gln Ala Ser Met Glu Ile
530 535 540

Met Ala Ala Ile Met Ala Ala Gly Met Val Pro Pro Ile Ala Leu Ser
545 550 555 560

Ile Ala Thr Leu Leu Arg Lys Lys Leu Phe Thr Pro Ala Glu Gln Glu
565 570 575

Asn Gly Lys Ser Ser Trp Leu Leu Gly Leu Ala Phe Val Ser Glu Gly
580 585 590

Ala Ile Pro Phe Ala Ala Ala Asp Pro Phe Arg Val Ile Pro Ala Met
595 600 605

Met Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Ile Ser Met Ala Leu Gly Val
610 615 620

Gly Ser Arg Ala Pro His Gly Gly Ile Phe Val Val Trp Ala Ile Glu
625 630 635 640

Pro Trp Trp Gly Trp Leu Ile Ala Leu Ala Ala Gly Thr Ile Val Ser
645 650 655

Thr Ile Val Val Ile Ala Leu Lys Gln Phe Trp Pro Asn Lys Ala Val
660 665 670

Ala Ala Glu Val Ala Lys Gln Glu Ala Gln Gln Ala Ala Val Asn Ala
675 680 685

<210> 5

<211> 41

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> ADN sintético

<400> 5

atgcgccctg caggcctct ttactggcac caactggtgc g 41

10 <210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 790 661 T3

<223> ADN sintético
 <400> 6
 ggtaacccca tgacataatc ggaccttgac 30
 <210> 7
 5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético
 10 <400> 7
 gtcaaggtcc gattatgca tggggttacc 30
 <210> 8
 <211> 42
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético
 <400> 8
 20 atatgccctg cagcagggtc gtagcaacct gcctcaaagc cg 42
 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> ADN sintético
 <400> 9
 gattgaaaga atcagcatga cataatcgga 30
 <210> 10
 <211> 30
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> ADN sintético
 <400> 10
 35 gtcaaggtcc gattatgca tgctgattct 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para producir una sustancia diana, que comprende: cultivar, en un medio, una bacteria corineforme en la que la actividad de la proteína FruK y la proteína FruA implicada en el sistema de fosfotransferasa (PTS) en relación con la absorción de la fructosa se ha perdido en comparación con una cepa madre y la bacteria puede producir la sustancia diana, permitiendo que la sustancia diana se forme y acumule en un cultivo; y recoger la sustancia diana a partir del cultivo.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la bacteria corineforme, en la que la actividad de la proteína FruK y la proteína FruA se ha perdido en comparación con la cepa madre y la bacteria puede producir la sustancia diana es una bacteria corineforme en la que la actividad de la proteína FruK y la proteína FruA se ha perdido en comparación con la cepa madre introduciendo una eliminación, una sustitución o una adición de una base en un gen que codifica la proteína en el ADN cromosómico de la cepa madre.
- 15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la bacteria corineforme es *Corynebacterium glutamicum*.
- 20 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la sustancia diana es un aminoácido, un péptido o una proteína.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el aminoácido es un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en L-lisina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-treonina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptófano, L-cisteína, ácido L-glutámico, L-citrulina, L-glutamina, L-prolina, L-serina, L-ornitina, L-metionina, ácido L-aspártico, L-asparagina y glicina.