

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 022**

51 Int. Cl.:
C12N 15/03 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07851817 .2**
96 Fecha de presentación: **28.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2102337**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54 Título: **UN MICROORGANISMO DEL GÉNERO CORYNEBACTERIUM QUE TIENE UNA PRODUCTIVIDAD AUMENTADA DE L-LISINA Y UN MÉTODO DE PRODUCIR L-LISINA USANDO EL MISMO.**

30 Prioridad:
29.12.2006 KR 20060137652

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
**CJ CHEILJEDANG CORPORATION
500, NAMDAEMUNRO 5-GA
JUNG-GU SEOUL 100-095, KR**

72 Inventor/es:
**KOO, Hyun-min;
YANG, Young-lyeol;
KIM, Hyo-jin;
MOON, Jun-ok;
LIM, Sang-jo;
CHOI, Jong-soo y
PARK, Young-hoon**

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 022 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

Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una productividad aumentada de L-lisina y un método de producir L-lisina usando el mismo.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una productividad aumentada de L-lisina y un método de producir L-lisina usando el mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a un microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* que tiene una productividad aumentada de L-lisina inactivando el gen endógeno NCg11090 que tiene la secuencia de aminoácidos que contiene residuos repetidos de aspartato y a un método de producir L-lisina usando el mismo.

10 Fundamento técnico

Los L-aminoácidos, en particular la L-lisina han sido usados ampliamente para piensos, como una materia prima para medicinas y en la industria farmacéutica, y se producen por fermentación de los microorganismos del género *Corynebacterium*.

- 15 Los microorganismos del género *Corynebacterium*, particularmente el *Corynebacterium glutamicum* es un microorganismo Gram-positivo que se usan ampliamente en la producción de L-aminoácidos. El método de producir L-aminoácidos usando los microorganismos del género *Corynebacterium* es muy importante. Por tanto, ha habido muchos intentos de mejorar el método.

- 20 Uno de los intentos es mejorar los microorganismos del género *Corynebacterium* que producen L-aminoácidos por interrupción de genes específicos o atenuación de la expresión de genes específicos usando técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.872.553 describe un método de producir L-lisina a partir de microorganismos del género *Corynebacterium* mediante fermentación, que comprende las siguientes etapas: a) dejar crecer microorganismos del género *Corynebacterium* que tienen un DNA atenuado que codifica fosfoenolpiruvato (PEP)-carboxiquinasa (PCK) por un método de mutación seleccionado del grupo que consiste en inserción de uno o más pares de bases en el DNA, delección de uno o más pares de bases en el DNA, transición o transversión de pares de bases introduciendo un codón sin sentido en el DNA o que tienen reducida la fosfoenolpiruvato (PEP)-carboxiquinasa (PCK) comparada con los microorganismos del género *Corynebacterium* que no están atenuados; b) concentrar el producto L-aminoácido deseado en el medio o células; y c) separar el L-aminoácido.

- 30 Además, se han realizado muchos estudios sobre cómo cada gen implicado en la biosíntesis de L-aminoácidos afecta a la producción de L-aminoácidos amplificando los genes para desarrollar microorganismos del género *Corynebacterium* (Eggeling, *Aminoacids* 6, 261-272 (1994)). También puede ser desarrollados microorganismos del género *Corynebacterium* introduciendo genes extraños de otras bacterias. Por ejemplo, la publicación de patente japonesa N° Hei 7-121228 describe un método de producir L-ácido glutámico y L-prolina cultivando el microorganismo del género *Corynebacterium* o *Brevibacterium* que contiene la construcción recombinante entre el fragmento de DNA que tiene la información genética que implica la síntesis de ácido cítrico-sintasa y el DNA vector, y producir L-ácido glutámico y L-prolina a partir de los cultivos.

Sin embargo, a pesar de las pruebas anteriores todavía se requiere producir una cepa con productividad aumentada de L-lisina.

Descripción de la invención

Problema técnico

- 40 Los autores de la presente invención han estudiado desarrollar un microorganismo capaz de producir L-lisina con alto rendimiento con el gen diana endógeno NCg11090 que tiene residuos repetidos de aspartato en su secuencia de aminoácidos en microorganismos del género *Corynebacterium*. Y los autores de la presente invención trataron de aumentar la productividad de L-lisina reduciendo el consumo intracelular innecesario de aspartato, que es el compuesto intermedio de la biosíntesis de lisina, inactivando el gen diana anterior.

- 45 Es un objeto de la presente invención proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* con productividad aumentada de L-lisina.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método de producir L-lisina usando el microorganismo antes citado.

Solución técnica

- 50 Los objetos anteriores y otros objetos de la presente invención se pueden conseguir mediante las siguientes realizaciones de la presente invención.

La presente invención se describe con detalle a continuación.

Para conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* con productividad aumentada de L-lisina mediante la inactivación del gen endógeno NCg11090 del mismo, en donde el gen endógeno NCg11090 tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1.

5 En esta invención el microorganismo que tiene productividad L-lisina puede ser seleccionado del grupo que consiste en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10881, y *Corynebacterium glutamicum* KFCC 11001, pero no siempre limitado a ellos.

10 El aspartato es un compuesto intermedio de la vía de la biosíntesis de lisina, que es funcional como una unidad de composición celular o síntesis de proteína o un regulador. Como unidad de composición celular, el aspartato se usa para la síntesis de ácido nucleico, aminoácidos o grasa. Como unidad de síntesis de proteína, el aspartato se usa para la estructura de proteínas o como un grupo funcional principal. En particular, como unidad para la síntesis de proteínas, los genes traducidos en proteínas se dividen en dos grupos; uno es el de los genes esenciales para el crecimiento, mantenimiento y regulación celulares y el otro es el grupo de los genes no esenciales para dichos procesos. Los genes no esenciales se dividen como sigue: genes ya no requeridos de acuerdo con los otros genes que tienen funciones iguales; genes extraños introducidos desde el exterior, tales como los genes de virus; genes necesarios en algunos casos, pero no necesarios para otras condiciones, tales como para la producción de lisina; y genes cuyas funciones todavía no han sido explicadas.

15 Las células consumen aspartato masivamente para componer proteínas de los genes no esenciales. Por tanto, si se eliminan los genes no esenciales, se considera que puede reducirse la cantidad masiva de consumo de aspartato por los genes no esenciales, lo cual favorece la reducción del consumo de aspartato no necesario y también favorece la producción de lisina en la misma condición.

20 Para desarrollar un microorganismo con productividad mejorada de L-lisina, los autores de la presente invención buscaron un gen que contuviera residuos de aspartato, el compuesto intermedio de la biosíntesis de lisina, en su secuencia de aminoácidos que codifica una proteína, más que cualesquiera otros genes, de la base de datos de secuencia del genoma de la secuencia completamente analizada de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (NCBI GI: 19552361, SEQ. ID. NO: 1). Como resultado se confirmó que los residuos repetidos de aspartato estaban presentes en el C-terminal de la proteína NCg11090 que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ. ID. NO: 3. Sin embargo, no se ha explicado cómo esos residuos repetidos de aspartato en la secuencia de aminoácidos podrían estar implicados en la biosíntesis de lisina en una cepa productora de lisina.

25 En esta invención, el gen NCg11090 es un gen que existe endógenamente en el microorganismo del género *Corynebacterium*, y es conocido como un gen que codifica una proteína hipotética cuyas funciones son desconocidas. La actividad del gen se predice a partir de un análisis de la secuencia completa de un genoma de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 y se confirmó que tenía residuos repetidos de aspartato en el C-terminal y tenía la secuencia de nucleótidos representada por la secuencia SEQ. ID. NO: 1. El gen NCg11090 endógeno de un microorganismo del género *Corynebacterium* de la presente invención preferiblemente tiene alta homología con la secuencia representada por la SEQ. ID. NO: 1.

30 En esta invención, la "inactivación" se puede inducir por cualquier método de inactivación conocido por los expertos en la técnica. El término "inactivación" en la presente memoria intenta significar que la expresión del gen NCg11090 es reducida hasta un bajo nivel comparado con el de una cepa de tipo natural o se producen genes que no son expresados y genes que expresan productos que no tienen actividad o una actividad reducida a pesar de ser expresados.

35 En esta invención, la "inactivación" puede ser inducida por uno o más métodos de mutación seleccionados del grupo que consiste en la inserción de uno o más pares de bases en el gen NCg11090 gene, delección de uno o más pares de bases en el gene, transición o transversión de pares de bases insertando un codón sin sentido en el gen.

40 En una realización preferida de la presente invención, el microorganismo que contiene el gen endógeno inactivado NCg11090 se puede obtener cultivando un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con el vector que contiene una parte del gen NCg11090 y un marcador antibiótico en presencia de antibióticos. Preferiblemente, el vector es un vector pCR-1090 que contiene el fragmento del gen NCg11090 de la SEQ. ID. NO: 2. El microorganismo se transforma con el vector que contiene una parte de la secuencia génica, seguido por cultivo en presencia de un marcador de selección. Luego, ocurre la recombinación homóloga entre una parte del gen y el gen endógeno del microorganismo. Por la recombinación homóloga, los genes endógenos del microorganismo se recombinan y el gen recombinante que contiene el marcador es solamente seleccionado por el marcador de selección. Como resultado, puede obtenerse el microorganismo del género *Corynebacterium* cuyo gen endógeno NCg11090 está inactivado. Sin embargo, un método para preparar el microorganismo del género *Corynebacterium* de acuerdo con la presente invención no está limitado a la recombinación homóloga, y puede usarse cualquier método conocido por los expertos en la técnica.

45 El microorganismo transformado con productividad mejorada de L-lisina de la presente invención puede ser *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CO01-0018 (Nº de acceso: KCCM 10810P).

La presente invención también proporciona un método de producir L-lisina usando el microorganismo transformado. Más particularmente, la presente invención proporciona un método de producir L-lisina que comprende las etapas de producir L-lisina en los cultivos o células por cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium*; y recoger la L-lisina de los cultivos.

- 5 En el método de la presente invención, el cultivo de microorganismo del género *Corynebacterium* puede ser realizado por cualquier método de cultivo y condiciones de cultivo conocidas por los expertos en la técnica.

El medio para el cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium* puede ser seleccionado de los descritos en *Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology* (Washington D.C., USA, 1981).

- 10 El medio incluye varias fuentes de carbonos, fuentes de nitrógeno y elementos trazas. La fuente de carbono es ilustrada por azúcar y carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, celulosa; aceites y grasas, tales como aceite de semilla de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes, tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos, tales como ácido acético. Se pueden usar como fuente de nitrógeno uno de estos compuestos o una de sus mezclas.

El medio de la presente invención se ilustra por dicha fuente de nitrógeno orgánico como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, líquido de maceración de maíz (CSL) y harina de soja y dicha fuente de nitrógeno inorgánico como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Como fuente de nitrógeno se puede usar uno de estos compuestos o una de sus mezclas.

- 20 El medio de la presente invención puede incluir adicionalmente, dihidrógeno-fosfato de potasio, hidrógeno-fosfato de dipotasio y las sales correspondientes que contienen sodio como fuente de fosfato. El medio también puede incluir una sal metálica, tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, también pueden ser añadidos aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. El medio o el precursor puede ser añadido por lotes o continuamente.

- 25 El pH del cultivo puede ser controlado usando un compuesto básico, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoniaco o un compuesto ácido, tal como ácido fosfórico ácido sulfúrico durante el cultivo. La generación de burbujas de aire puede ser inhibida durante el cultivo usando un agente antiespumante, tal como éster poliglicólico de ácido graso. Para mantener la condición aerobia del cultivo se puede inyectar en el mismo, oxígeno o un gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire). La temperatura del cultivo es preferiblemente 20 - 45°C, más preferiblemente 25 - 40°C. El cultivo puede ser continuado hasta que la producción del L-aminoácido alcance un nivel deseado y el tiempo de cultivo preferible time es 10 - 160 horas.

En este método, el cultivo se puede realizar por un método de tipo continuo o por lotes, tales como cultivos por lotes, lotes, lote alimentado y lote alimentado repetido. Ha de entenderse por los expertos en la técnica que el método de cultivo se puede seleccionar apropiadamente.

- 35 El L-aminoácido puede ser separado y analizado por cromatografía de intercambio iónico y posterior derivatización con ninhidrina.

Además de la identificación del gen, los autores de la presente invención inactivaron también el gen NCg11090, el gen endógeno del microorganismo del género *Corynebacterium*, para medir la productividad de lisina y como resultado se confirmó que se aumentó la productividad de lisina.

Breve descripción de los dibujos

- 40 La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se comprenderá mejor con referencia a los dibujos que se acompañan, en donde:

La Fig. 1 es un diagrama que muestra el vector pCR-1090 en donde se clonó el fragmento de 401 pb del gen NCg11090.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

- 45 Las realizaciones prácticas y actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas como se muestran en los siguientes Ejemplos.

Sin embargo, se apreciará que los expertos en la técnica, por consideración de esta descripción pueden hacer modificaciones y mejoras dentro del alcance de la presente invención, como es definida por las reivindicaciones.

- 50 En los siguientes ejemplos, para confirmar el efecto de NCg11090 que tiene residuos repetidos de aspartato en su secuencia de aminoácidos sobre la producción de lisina, se inactivó, NCg11090, el gen endógeno de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881, y la cepa que contiene el gen NCg11090 inactivado se cultivó y se midió la productividad de lisina.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de un vector para inactivar el gen NCg11090, el gen endógeno del microorganismo del género *Corynebacterium*.

5 En este ejemplo, un fragmento de 401 pb del gen NCg11090 (SEQ. ID. NO: 2) (nucleótidos 160-560 de la secuencia representada por la SEQ. ID. NO: 1) se amplificó por PCR usando DNA cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) como molde con cebadores oligonucleotídicos representados por las SEQ. ID. NO: 4 y NO: 5 para construir el vector de interrupción del gen NCg11090 que contiene una parte del gen endógeno NCg11090 y un marcador de antibióticos. La PCR se realizó como sigue: desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, reasociación a 52°C durante 30 segundos y polimerización a 72°C durante 30 segundos (30 ciclos). El fragmento del gen
10 NCg11090 amplificado se clonó en el plásmido de *E. coli* pCR.2.1 usando el kit de clonación TOPO (Invitrogen, USA). Como resultado, se construyó el vector pCR-1090. La Fig. 1 es un diagrama que muestra el vector pCR-1090 que se clonó en el fragmento del gen NCg11090 de 500 pb.

Ejemplo 2: Construcción de un microorganismo que produce L-lisina que tiene inactivado el gen Ncg11090, el gen endógeno de *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10881

15 *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881, un microorganismo que produce L-lisina, se transformó con el vector pCR-1090 construido en el ejemplo 1 mediante el método del pulso eléctrico de acuerdo con el método descrito en *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (1999) 52:541-545. La PCR se realizó el segundo día del cultivo para confirmar la interrupción del gen NCg11090 en el microorganismo transformado. Particularmente, la PCR se realizó usando DNA cromosómico del microorganismo transformado como molde con los cebadores oligonucleotídicos representados por
20 las SEQ. ID. NO: 6 y NO: 7. Como resultado, se amplificaron aproximadamente 5030 pb (nucleótidos 1 - 804 de la secuencia representada por la SEQ. ID. NO: 1) el fragmento del gen NCg11090 que contiene el plásmido pCR-1090. Por la PCR, se confirmó que el gen NCg11090 estaba interrumpido por inserción del plásmido pCR-1090 en la parte media del gen NCg11090 endógeno en el DNA cromosómico pro cruzamiento a través de recombinación homóloga.

25 El microorganismo obtenido se denominó "*Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CO01-0018", que se depositó en el KCCM (Korean Cultive Center of Microorganisms) de la KFCC (Korean Federation of Cultive Collection), que es el organismo de depósito coreano internacional domiciliado en 361-221, Hongje-1-Dong, Seodaemungu-Gu, Seoul, Korea, el 7 de diciembre de 2006 (Nº de acceso No: KCCM 10810P).

Ejemplo 3: Producción de lisina usando *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CO01-0018

30 El transformante *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CO01-0018 (KCCM 10810P) preparado en el ejemplo 2, se cultivó para producir L-lisina.

Primeramente, la cepa madre de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 y la cepa transformada KFCC10881-CO01-0018 (KCCM 10810P) se inocularon en un matraz de 250 ml con tabiques en las esquinas que contenía 25 ml del cultivo de siembra que tenía la composición indicada más adelante, seguido por cultivo a 30°C durante 20 horas con agitación a 200 rpm. 1 mL del cultivo se siembra se inoculó en un matraz de 250 ml con tabiques en las esquinas que contenía 24 mL del medio de producción que tiene la composición indicada más adelante, seguido por cultivo a 30°C durante 120 horas con agitación a 200 rpm. Tras ser completado el cultivo, se midió la producción de L-lisina por HPLC (Waters 2457).
35

Como resultado, la cepa madre de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 y las cepas *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CO01-0018 (KCCM 10810P) produjeron 45 g/l y 50 g/l de L-lisina en sus medios de cultivo respectivamente en forma de hidrocloreuro de L-lisina.
40

Medio de siembra (pH 7.0):

Azúcar en bruto 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g, KH₂PO₄ 4g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, biotina 100 µg, tiamina.HCl 1000 µg, pantotenato de calcio 2000 µg, nicotinamida 2000 µg (en 1 litro de agua de proceso).

45 Medio de producción (pH 7.0):

Azúcar en bruto 100 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, proteína de soja 2,5 g, sólidos de maceración de maíz 5 g, urea 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, biotina 100 µg, tiamina.HCl 1000 µg, pantotenato de calcio 2000 µg, nicotinamida 3000 µg, CaCO₃ 30 g (en 1 litro de agua de proceso).

Ejemplo 4: Recogida de L-lisina del cultivo de *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10881-CO01-0018

50 *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CO01-0018 se cultivó en el medio que contenía melaza y azúcar en bruto. El pH de 1 L del cultivo de lisina obtenido se ajustó a 2.0 usando HCl y luego los iones Ca se cambiaron a la forma de CaSO₄ o CaCl₂. El medio de cultivo se vertió sobre la resina de cambio catatónico en la forma de iones amonio (Diaion SK-L10) ascendentemente seguido por adsorción. Las células que permanecían en la capa de resina se eliminaron por lavado con agua desalinizada, seguido por elución usando hidróxido de amonio 2N. Como

5 resultado, la lisina se recogió a una alta concentración. La solución recogida que contenía lisina se concentró y el pH de la solución se reguló a 5,0 por HCl, seguido por cristalización por enfriamiento a 20°C. Después de cristalización, la suspensión obtenida se centrifugó para dar el producto húmedo primario. La solución madre se concentró por lotes, seguido por cristalización para obtener el producto húmedo secundario. Los productos húmedos primario y secundario se mezclaron y secaron para dar 47,5 g de producto lisina seco (contenido de lisina: 98,5%).

Aplicabilidad industrial

10 Como se ha explicado en lo que antecede, de acuerdo con la presente invención, la productividad de L-lisina puede ser aumentada inactivando el gen NCg11090, el gen endógeno de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-0001-0018 (KCCM 10810P). El método de la presente invención facilita la producción de L-lisina a alta concentración, dando como resultado el aumento de la productividad de L-lisina.

Los expertos en la técnica apreciarán que las concepciones y realizaciones específicas reseñadas en la descripción anterior pueden ser utilizadas como base para modificar o diseñar otras realizaciones para conseguir los mismos fines de la presente invención. Los expertos en la técnica también apreciarán que dichas realizaciones equivalentes no se apartan de la invención como se expone en las reivindicaciones anexas.

15 **LISTA DE SECUENCIAS**

<110> CJ Corp.

<120> Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una productividad mejorada de L-lisina y un método para producir L-lisina usando el mismo.

20 <130> PP07- 0141

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

25 <211> 804

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

```

atgagctttt ttgaggacat cgcggctgga cttgatagtg acggtatcga gtcgccgta 60
aacggcgaca caatgttcgt tccgatcacc tctgacttgg aaatccagtt cgtggagatc 120
gattccctcc tacctgcagc aaacgtttat atcgctgcag ccaatgttga tgaagacgat 180
gatgagttcg aggcagttct cgtttcggtg gtgttctctg ttgaggatgc tgtcgctgct 240
gtcgaaaagc atgttgctac t gatcaggtg gtgactgtgc tgcgtgatct acttgaagga 300
actgatgaac gcatccagga tttggagttt ttccaggatg cagtgaatgc aaatttggtt 360
cgtcggaag tcggccagaa tctgagctt caggttttgg tcgaggttga agacggcgtc 420
ccaaccgcaa cggccaattt catcgcatc ggtgagtcct ttgaagatct gatgatcag 480
gccattgaag aatgtggga atccgacggc gacgcagttc t atcggatga agatcgccaa 540
cgcatgttcg ctgat ttgac ctccgagttg gaat ttgtca ctgatgaagt cctcgacttg 600
ggtagcttca ctgat ttgga tgcacttttc gat atccttt ccctcgccga tgaccaggct 660
gaggattggg aagcacagct cgttctttt gaggacgagg aat ttgatga gccggatgtt 720
tatgaccttt tcgtcgatga ctctgaagaa gatgacgacg acctcgatga tgacgaggac 780
gatgaggatg atgacgaaga ct ag 804
    
```

30 <210> 2

<211> 401

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

ES 2 369 022 T3

gccaatgttg atgaagacga t gatgagttc gaggcagttc t cgtttcggt ggtgttctct 60
 gttgaggatg ctgtcgctgc t gtcgcaaag catgttgcta ctgatcaggt ggtgactgtg 120
 ctgcgtgatc t acttgaagg aactgatgaa cgcacccagg atttggagtt tttccaggat 180
 gcagtgaatg caaat t t ggt t cgtgcggaa gt cggccaga at t ct gagct t caggt t t t g 240
 gtcgaggttg aagacggcgt cccaaccgca acggtcaatt t catcgcgat cggtgagtcc 300
 tttgaagatc t gat t gat ca ggccat t gaa gaat t gt ggg aat cggacgg cgacgcagt t 360
 ctatcggatg aagatcgcca acgcatgttc gctgat t t ga c 401

<210> 3

<211> 267

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencias de aminoácidos de NCg11090 que codifican una proteína hipotética

<400> 3

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

10 <210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15 <220>

ES 2 369 022 T3

<223> cebador 1 para amplificar una región parcial (160-560nt) de NCg11090
<400> 4
gccaat gttg at gaagacga 20

5 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

10 <223> cebador 2 para amplificar una región parcial (160-560nt) de NCg11090
 <400> 5
 gt caaat cag cgaacat gcg 20

15 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

20 <223> cebador 3 para amplificar el gen entero de NCg11090
 <400> 6
 atgagcttttt gaggacat 20

25 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>

30 <223> cebador 4 para amplificar el gen entero de NCg11090
 <400> 7
 ctagtcttcg tcatcatcct 20

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad aumentada de L-lisina por inactivación de un gen que tiene residuos repetidos de aspartato en su secuencia de aminoácidos, en donde el gen es el gen endógeno NCg11090 que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ. ID. NO: 1.
- 5 2. El microorganismo del género *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inactivación es inducida por uno o más métodos de mutación seleccionados del grupo que consiste en inserción de uno o más pares de bases en el gen NCg11090, delección de uno o más pares de bases en el gen, y transición o transversión de pares de bases insertando un codón sin sentido en el gen.
- 10 3. El microorganismo del género *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la inactivación es inducida por la transformación del microorganismo del género *Corynebacterium* con un vector que contiene una parte del gen endógeno NCg11090 y un marcador de antibióticos.
4. El microorganismo del género *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10881-CO01-0018 (KCCM 10810P) seleccionado por cultivo en presencia de antibióticos.
- 15 5. Un método de producir L-lisina que comprende las siguientes etapas: producir L-lisina en los cultivos o células del microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y recoger L-lisina de los cultivos.

[Fig. 1]

