

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 342**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/53** (2006.01)

**C12P 13/08** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10797237 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2453006**

54 Título: **Procedimiento de producción de L-lisina usando Corynebacterium sp. que ha obtenido la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa a partir de una especie foránea**

30 Prioridad:

**08.07.2009 KR 20090062322**

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

**27.11.2015**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
292, Ssangnim-dong Jung-gu  
Seoul, 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**RAH, SO-YEON y  
LIM, SANGJO**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

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

**ES 2 552 342 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de L-lisina usando *Corynebacterium sp.* que ha obtenido la actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa a partir de una especie foránea

**Antecedentes**5 **1. Campo**

La presente divulgación se refiere a una cepa de *Corynebacterium sp.* que tiene una actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP y una mayor productividad de L-lisina y un procedimiento para producir L-lisina usando el mismo.

**2. Descripción de la técnica relacionada**

10 Tradicionalmente, las bacterias corineformes son los microorganismos industriales más ampliamente utilizados para la producción de una variedad de materiales químicos útiles en las industrias de alimentación animal, farmacéutica y alimentaria, incluyendo aminoácidos, tales como L-lisina, L-treonina, L-arginina y ácido glutámico y materiales relacionados con ácidos nucleicos. Estos microorganismos son bacterias gram-positivas y requieren biotina para su crecimiento. Los ejemplos representativos de bacterias corineformes son las del género *Corynebacterium*,  
15 incluyendo *Corynebacterium glutamicum*, el género *Brevibacterium*, incluyendo *Brevibacterium flavum*, las especies de *Arthrobacter*, las especies de *Microbacterium*, etc.

La L-lisina es un L-aminoácido que se utiliza comercialmente como un aditivo para piensos en la alimentación animal debido a su capacidad para ayudar al cuerpo a absorber otros aminoácidos mejorando así la calidad del pienso. En el cuerpo humano, la L-lisina se usa como un ingrediente de una solución de inyección, y también se aplica en el campo farmacéutico. Por lo tanto, la producción industrial de lisina es un proceso industrial económicamente importante.

Para mejorar el rendimiento de producción de lisina, la actividad de la enzima en la vía biosintética de la lisina ha sido generalmente mejorada mediante la amplificación de genes en la vía de biosíntesis de la lisina o mediante la modificación del promotor de los genes. Además, se puede introducir un gen exógeno obtenido de otras bacterias y, por ejemplo, la introducción de un gen que codifica la citrato sintasa obtenida de *Escherichia coli* se describe en la Publicación de Patente Japonesa N° Hei 7-121228.

Mientras tanto, la ruta metabólica central del carbono puede modificarse con el fin de mejorar la productividad de lisina implicada en la ruta metabólica central del carbono. En *Corynebacteria*, existe en una forma de gapA que convierte la gliceraldehído-3-fosfato en glicerato-1,3-bisfosfato utilizando NAD como coenzima, en la que el glicerato-1,3-bisfosfato se convierte en 3-fosfoglicerato por el gen pgk que codifica la enzima. Por el contrario, en *Streptococcus* y *Bacillus*, existe como GAPDH dependiente de NADP no fosforilante (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP no fosforilante, en lo sucesivo referida como gapN) que convierte el gliceraldehído-3-fosfato en 3-fosfoglicerato utilizando NADP como coenzima y produce NADPH. Este proceso es un proceso de un solo paso que juega un papel importante en la glucólisis y que está afectado por una relación NADPH/NADP (Iddar, A et al., Protein Expr Purif. 25(3):519-26 (2002)).

El documento WO 2006/071086 describe microorganismos de las especies de *Escherichia* y microorganismos de las especies de *Corynebacterium* que se transforman con un gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa exógeno y que tienen la capacidad de producir L-lisina y un procedimiento para producir L-lisina utilizando los microorganismos.

40 Se ha descrito que la enzima gapN no existe inherentemente en *Corynebacterium*. Además, no se ha descrito el uso del gen gapN en el cultivo de *Corynebacterium*. Sin embargo, hay patentes anteriores que se refieren al aumento de la productividad de aminoácidos mediante la introducción del gen gapN. Por ejemplo, la solicitud de patente coreana N° 10-2004-0116999 y la patente US-11/722.820 describen que el gapN se expresa en *E. coli* para aumentar la productividad de lisina, pero no se describe su aplicación a *Corynebacterium*. Por lo tanto, con el fin de lograr el efecto de gen gapN, se propuso el gapN derivado de *Clostridium acetobutyricum* para ser expresado en la cepa de *Corynebacterium* productora de lisina, pero no se pudo obtener un resultado satisfactorio. Por lo tanto, los presentes autores han explorado tres tipos de genes gapN presentes en otras bacterias mediante búsqueda en papel (Abdelaziz Soukri et al. INTERNATIONAL MICROBIOLOGY (2005) 8:251-258).

50 Los presentes autores encontraron que el gapN se expresa con el fin de utilizar NADP, en lugar de NAD, como una coenzima y el incremento resultante en los niveles de NADPH se utiliza como la fuente de poder reductor para la biosíntesis de lisina, y por tanto la productividad de L-lisina de la cepa de *Corynebacterium sp.* se puede mejorar, completando de esta manera la presente divulgación.

**Sumario**

Un objeto es proporcionar una cepa de *Corynebacterium* sp. que tenga una actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP y una mayor productividad de L-lisina y un procedimiento para producir L-lisina usando la misma.

5 **Breve descripción de las figuras**

La FIG. 1 muestra un mapa de escisión de pECCG122-Pcj7-gapN, que es un plásmido de expresión para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapN) de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae* o *Bacillus cereus* y

10 La FIG. 2 muestra un mapa de escisión de un vector de inserción cromosómica PDZ-gapA para la alteración del gen gapA.

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

En una realización, la presente divulgación proporciona una cepa de *Corynebacterium* sp. que tiene una actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP y una mayor productividad de L-lisina.

15 La cepa de *Corynebacterium* sp. que tiene una mayor productividad de L-lisina de la presente divulgación puede obtenerse mediante la inactivación del gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapA) endógeno e introduciendo el gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP (gapN) exógeno.

20 En la presente divulgación, el gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP exógeno incluye cualquier nucleótido que codifica un polipéptido, siempre que el polipéptido tenga una actividad de conversión en 3-fosfoglicerato mediante el uso de gliceraldehído-3-fosfato como sustrato y NADP como coenzima.

25 Ejemplos de gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP exógeno incluyen genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP obtenidos de animales, plantas y bacterias, preferiblemente genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP obtenidos de bacterias y, más preferiblemente, un gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP originado a partir de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae* o *Bacillus cereus*. Más específicamente, los genes de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae* y *Bacillus cereus* pueden tener las secuencias de nucleótidos de SEC ID N° 11 (GenBank N° de acceso NC\_004350), 12 (GenBank N° de acceso NC\_004116) y 13 (GenBank N° de acceso NC\_004722.1), respectivamente.

30 El gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa dependiente de NADP exógeno se puede introducir en un vector recombinante de expresión e introducir el vector recombinante en una bacteria corineiforme que tiene un gen endógeno inactivado de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa con el fin de producir una bacteria corineiforme transformada.

35 El vector recombinante que expresa la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP se puede preparar por un procedimiento común, por ejemplo, ligando la secuencia del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP exógeno con un vector adecuado usando una enzima de restricción. En la presente divulgación, el vector puede ser un vector que tiene el mapa de escisión de la Figura 1. En la realización específica de la presente divulgación, los vectores para la introducción de los genes de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae* y *Bacillus cereus* son pECCG122-Prj7-gapN1, pECCG122-Pcj7-gapN2 y pECCG122-Pcj7-gapN3, respectivamente.

40 El gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa endógeno se refiere a un gen que codifica la enzima que tiene una actividad de convertir en glicerato-1,3-bisfosfato mediante el uso de gliceraldehído-3-fosfato como sustrato y NAD como coenzima en la cepa de *Corynebacterium* sp. y preferiblemente se refiere a un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 14 (NCBI N° de Acceso NC\_003450, NCg11526).

45 Además, con el fin de inactivar el gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa endógeno, se puede aplicar la manipulación genética de delección, sustitución o inserción del gen nativo gapA de la cepa de *Corynebacterium* sp. Preferiblemente, se puede transformar una bacteria corineiforme con un vector recombinante que incluye una parte del gen gapA y se puede preparar, por ejemplo, una cepa que tiene la actividad gapA inactivada por introducción de un vector que tiene el mapa de escisión de la Figura 2. En la realización específica de la presente divulgación, se utilizó un vector recombinante pDZ-gapA que tiene dos fragmentos de una parte del gen  
50 que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa endógeno consecutivamente clonado como un vector para la inserción cromosómica. Preferiblemente, una bacteria corineiforme a ser transformada con este vector para la inserción cromosómica es, pero no se limita a, *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10 881. De acuerdo con la realización específica de la presente divulgación, la bacteria corineiforme que tiene la alteración del gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa endógeno puede ser *Corynebacterium glutamicum* CA01-0096 (N° de  
55 Acceso KCCM 11012P).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” significa que el ADN se introduce en un hospedador en el que el ADN se mantiene como un elemento extracromosómico o integrado en el cromosoma e invención, la bacteria corineiforme que tiene la alteración del gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa endógeno puede ser *Corynebacterium glutamicum* CA01-0096 (Nº de Acceso KCCM 11012P).

5

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” significa que el ADN se introduce en un hospedador en el que el ADN se mantiene como un elemento extracromosómico o integrado en el cromosoma y se hace que sea replicable. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “transfección” significa que un vector de expresión que tiene una secuencia de codificación arbitraria que se puede expresar o no es recibida por una célula hospedadora. Tal como se usa en el presente documento, los términos “hospedador transfectado” y “hospedador transformado” significan una célula en la que se introduce el ADN. La célula se denomina “célula hospedadora” y puede ser una célula procariota o eucariota. La célula procariota típica incluye una variedad de cepas tales como *E. coli*. El término “vector” se refiere a un producto de ADN que tiene una secuencia de ADN unida operativamente a una secuencia reguladora que puede expresar el ADN en un hospedador adecuado. Los ejemplos de la secuencia reguladora incluyen un promotor para la transcripción, una secuencia operadora arbitraria para la regulación de la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma del ARNm apropiado y secuencias para la regulación de la terminación de la transcripción y la traducción. Ejemplos del vector pueden incluir plásmidos, partículas de fagos o simplemente posibles insertos genómicos. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma hospedador, o puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma. Como se usa en el presente documento, “plásmido” y “vector” se utilizan a veces indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector en la actualidad. El término “secuencia reguladora” se refiere a una secuencia de ADN necesaria para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Por ejemplo, secuencias reguladoras necesarias para la expresión en procariotas incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Los eucariotas son conocidos por utilizar un promotor, una señal de poliadenilación y un potenciador.

Cuando un ácido nucleico está dispuesto en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico, está “unido operativamente” a la secuencia de ácido nucleico. Esto significa que los genes están unidos de una manera tal que permiten la expresión del gen cuando la secuencia reguladora(s) se acopla con una molécula adecuada (por ejemplo, una proteína activadora de la transcripción). Por ejemplo, se pueden utilizar de acuerdo con un procedimiento ordinario el ADN de una pre-secuencia o un líder secretor está unido operativamente al ADN de un polipéptido cuando se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante cuando afecta a la transcripción de la secuencia codificante; un sitio de unión al ribosoma es un sitio para unión a una enzima de restricción, un adaptador de oligonucleótido sintético o enlazador.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “vector” se refiere a un vehículo recombinante en el que se insertan fragmentos de ADN heterólogo, en el que el fragmento de ADN es generalmente un fragmento de ADN de doble cadena. Aquí, el ADN heterólogo significa ADN de tipo heterólogo que no se encuentra de forma natural en una célula hospedadora. Una vez que el vector de expresión se incorpora en una célula hospedadora, este se puede replicar independientemente del ADN genómico hospedador para generar varias copias y sus insertos (ADN heterólogos).

Como es conocido por un experto en la materia, a fin de elevar un nivel de expresión de un gen transfectado en una célula hospedadora, el gen correspondiente debe estar unido operativamente a una secuencia de control de la expresión que realiza funciones de transcripción y traducción en un hospedador de expresión seleccionado. Preferiblemente, la secuencia de control de la expresión y el gen se incluyen en un único vector de expresión que comprende tanto un marcador seleccionable bacteriano como un origen de replicación. Cuando un hospedador de expresión es una célula eucariota, el vector de expresión debe incluir además un marcador de expresión útil en el hospedador de expresión eucariótico.

El vector útil para la preparación del vector recombinante de la presente divulgación se puede obtener de vectores autónomamente replicables en las bacterias corineiformes, y por ejemplo, un vector de fago o un vector plásmido. Ejemplos de vector de fago o el vector cósmido incluyen pWE15, M13, λEMBL3, λEMBL4, λFIXII, λDASHII, λZAPII, λgt10, λgt11, Charon4A y Charon21A y los ejemplos de vector plasmídico incluyen un plásmido pBR, un plásmido pUC, un plásmido pBluescriptII, un plásmido pGEM, un plásmido PTZ, un plásmido pET, un plásmido pMal, un plásmido pQE, etc.

Además, el *Corynebacterium* sp. utilizado en la presente divulgación incluye cualquier *Corynebacterium* sp., con tal de que tenga productividad de L-lisina. Los ejemplos del *Corynebacterium* sp. incluyen *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum* y *Brevibacterium fermentum*.

Los *Corynebacterium* sp. de la presente divulgación incluyen una cepa mutante que tiene una mayor productividad de L-lisina, así como una cepa de tipo silvestre. Ejemplos de los mismos incluyen cepas que requieren

nutricionalmente metionina o son resistentes a los análogos de treonina (AHV: ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi valérico), análogos de lisina (AEC: S-(2-aminoetil)-L-cisteína), análogos de isoleucina (ácido  $\alpha$ -aminobutírico), análogos de metionina (etionina), etc. Además, con el fin de aumentar la productividad de L-lisina, la cepa puede ser un mutante asociado a una mayor productividad de L-lisina que se prepara aumentando el número de copias del gen introducido o manipulando una secuencia reguladora del gen. Preferiblemente, puede incluir *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 y un mutante o cepa productora de L-aminoácido preparados a partir de, por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum* KFCC11001 y lo más preferiblemente, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881, pero sin limitarse a estos.

La realización específica de la presente divulgación proporciona cepas de *Corynebacterium* sp. de *Corynebacterium glutamicum* CA01-0565 (Nº de Acceso KCCM 11013P), *Corynebacterium glutamicum* CA01-0566 (Nº de Acceso KCCM 11014P) y *Corynebacterium glutamicum* CA01-0567 (Nº de Acceso KCCM 11015P), las cuales se preparan introduciendo el gen de *Streptococcus mutans*, el gen de *Streptococcus agalactiae* y el gen de *Bacillus cereus* en *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 que tiene el gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa endógena inactivado, respectivamente. Estas cepas fueron depositadas en la KCCM (Colección Coreana de Cultivos de Microorganismos, ubicada en 361-221 Yurim Bild., Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea) el 2 de julio de 2009.

El aumento de la productividad de L-lisina se atribuye al aumento del poder reductor por la activación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP. En lugar de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa endógena, se introduce una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP exógena en la cepa de *Corynebacterium* productora de L-lisina, de manera que la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP se activa para hacer que la cepa utilice NADP en lugar de NAD como coenzima y, por lo tanto, el incremento de los niveles de NADPH resultantes puede ser utilizado como la fuente de poder reductor para la biosíntesis de L-lisina.

Otra realización de la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir L-lisina, que comprende las etapas de cultivar la cepa de *Corynebacterium* sp. que tiene una actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP y una mayor productividad de L-lisina y recuperar la lisina de las células cultivadas o del caldo de cultivo.

La cepa de *Corynebacterium* sp. utilizada de acuerdo con la presente invención puede cultivarse mediante el procedimiento de tipo continuo o discontinuo, como cultivos por lotes, por lotes alimentados y cultivos por lotes alimentados repetidos. Un resumen de los procedimientos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto [Chmiel, (Bioprozesstechnik 1.Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1991); y Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)]. de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP y una mayor productividad de L-lisina y recuperar la lisina de las células cultivadas o del caldo de cultivo.

La cepa de *Corynebacterium* sp. utilizada de acuerdo con la presente invención puede cultivarse mediante el procedimiento de tipo continuo o discontinuo, como cultivos por lotes, por lotes alimentados y cultivos por lotes alimentados repetidos. Un resumen de los procedimientos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto [Chmiel, (Bioprozesstechnik 1.Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1991); y Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)].

El medio de cultivo a utilizar debe cumplir los requisitos de las cepas particulares de una manera adecuada. Descripciones de medios de cultivo para la cepa de *Corynebacterium* sp. se encuentran en el manual ["Manual of Methods for General Bacteriology" de la Sociedad Americana de Bacteriología (Washington DC, EE.UU., 1981)]. La fuente de carbono útil puede incluir azúcares y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, aceites y grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete 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 vitaminas además de las sustancias anteriormente mencionadas. También pueden añadirse precursores adecuados al medio de cultivo. Las sustancias mencionadas se pueden añadir al cultivo mediante un tipo continuo o por lotes de una manera adecuada durante el cultivo.

Con el fin de controlar el valor del pH del cultivo, los compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y amoníaco o los compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se utilizan convenientemente. Con el fin de controlar el desarrollo de espuma, se puede usar un agente anti-espumante tales como los ésteres de poliglicol de ácidos grasos. Con el fin de mantener las condiciones aerobias, se puede introducir en el cultivo oxígeno o gas que contiene oxígeno. La temperatura del cultivo es normalmente de 20 °C a 45 °C, y preferiblemente de 25 °C a 40 °C. El cultivo se continúa hasta que se ha formado la cantidad máxima de los L-aminoácidos deseados. Este objetivo se logra normalmente en un plazo de entre 10 horas y 160 horas.

El análisis de los L-aminoácidos se puede llevar a cabo por cromatografía de intercambio aniónico con posterior derivatización de ninhidrina (Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190).

La presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, la divulgación no se pretende que esté limitada por estos ejemplos.

### Ejemplo 1. Exploración y clonación del gen gapN de *Streptococcus mutans*

5 La secuencia del gen gapN obtenido de *Streptococcus* ha sido claramente revelada. La información genética de gapN de *Streptococcus mutans* (nº de acceso NC\_004350) fue adquirida de GenBank de los NIH. Basándose en la secuencia descrita, se sintetizó un par de cebadores descritos en la siguiente Tabla 1 y se amplificaron 1428 pares de bases del gen gapN por reacción de polimerización en cadena (PCR) [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] (Condiciones de la PCR: Desnaturalización = 94 °C, 30 seg/hibridación = 50 °C, 30 seg/polimerización = 72 °C, 1 min 30 seg, 30 ciclos) usando un ADN cromosómico de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC25175 como molde, y se clonó en un plásmido pCR2.1 de *E. coli* usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener un plásmido pCR-gapN1.

[Tabla 1] Cebador

Cebador	secuencia	SEC ID Nº
gapN_F1	5'-GCG CAT ATG ACA AAA CAA TAT AA AAA-3'	1

15 La reacción de polimerización en cadena (PCR) [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] (Condiciones de la PCR: Desnaturalización = 94 °C, 30 seg/hibridación = 50 °C, 30 seg/polimerización = 72 °C, 1 min 30 seg, 30 ciclos) usando un ADN cromosómico de la cepa ATCC25175 de *Streptococcus mutans* como molde y se clonó en un plásmido pCR2.1 de *E. coli* usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener un plásmido pCR-gapN1.

[Tabla 1] Cebador

Cebador	secuencia	SEC ID Nº
gapN_F1	5'-GCG CAT ATG ACA AAA CAA TAT AA AAA-3'	1
gapN_R1	5'-GCG TCT AGA TTA TTT GAT ATC AAA TAC-3'	2

20

### Ejemplo 2. Construcción del vector de expresión gapN

El vector pCR-gapN1 que contiene el gen gapN obtenido en el Ejemplo 1 se escindió utilizando las enzimas de restricción Nde I y Xba-I y el fragmento de gen que codifica gapN se separó solo y se ligó un promotor de expresión Pcj7 (referencia; Publicación de Patente Nº 2006-0068505) con un vector lanzadera pECCG122 de *E. coli* y *Corynebacterium* (referencia; Publicación de Patente Nº 1992-0000933), a fin de construir pECCG122-Pcj7-gapN1 (Fig. 1).

### Ejemplo 3. Exploración y clonación del gen gapN de *Streptococcus agalactiae*

30 La secuencia del gen gapN obtenido de *Streptococcus* ha sido claramente revelada. La información genética de gapN de *Streptococcus agalactiae* (nº de acceso NC\_004116) fue adquirida de GenBank de los NIH. Basándose en la secuencia descrita, se sintetizaron un par de cebadores descritos en la siguiente Tabla 2 y se amplificaron 1428 pares de bases del gen gapN por reacción de polimerización en cadena (PCR) [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] (condiciones de la PCR: Desnaturalización = 94 °C, 30 seg/hibridación = 50 °C, 30 seg/polimerización = 72 °C, 1 min 30 seg, 30 ciclos) usando un ADN cromosómico de la cepa ATCC BAA-611 de *Streptococcus agalactiae* como molde, y se clonó en un plásmido pCR2.1 de *E. coli* usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener un plásmido pCR-gapN2.

35

[Tabla 2] Cebador

Cebador	secuencia	SEC ID Nº
gapN_F2	5'-GCG CAT ATG ACA AAA GAA TAT CAA-3'	3
gapN_R2	5'-GCG TCT AGA CTA TTT CAT ATC AAA AAC-3'	4

**Ejemplo 4. Construcción del vector de expresión gapN**

El vector pCR-gapN que contiene el gen gapN obtenido en el Ejemplo 3 se escindió utilizando las enzimas de restricción Nde I y Xba-I y sólo se separó el fragmento de gen que codifica gapN y se ligó un promotor de expresión Pcj7 (referencia; Publicación de Patente N° 2006-0068505) con un vector lanzadera pECCG122 de *E. coli* y *Corynebacterium* (referencia; Publicación de Patente N° 1992-0000933), a fin de construir pECCG122-Pcj7-gapN2 (Fig. 1).

**Ejemplo 5. Exploración y clonación del gen gapN de *Bacillus cereus***

La secuencia del gen gapN obtenida de *Bacillus* ha sido claramente revelada. La información genética de gapN de *Bacillus cereus* (n° de acceso NC\_004722.1) fue adquirida de GenBank de los NIH. Basándose en la secuencia descrita, se sintetizaron un par de cebadores descritos en la siguiente Tabla 3 y se amplificaron 1428 pares de bases del gen gapN por reacción de polimerización en cadena (PCR) [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratorios] (Condiciones de la PCR: Desnaturalización = 94 °C, 30 seg/hibridación = 50 °C, 30 seg/polimerización = 72 °C, 1 min 30 seg, 30 ciclos) usando un ADN cromosómico de la cepa ATCC 14579 de *Bacillus cereus* como molde, y se clonó en un plásmido pCR2.1 de *E. coli* usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener un plásmido pCR-gapN3.

[Tabla 3] Cebador

Cebador	secuencia	SEC ID N°
gapN_F3	5'-GCG CAT ATG ACA ACT AGC AAT ACG-3'	5
gapN_R3	5'-GCG TCT AGA TTA AAC TAA GTT TAA-3'	6

**Ejemplo 6. Construcción del vector de expresión gapN**

El vector pCR-gapN3 que contiene gapN obtenido en el Ejemplo 5 se escindió utilizando las enzimas de restricción Nde I y Xba-I y sólo se separó el fragmento de gen que codifica gapN y se ligó un promotor de expresión Pcj7 con un vector lanzadera pECCG122 de *E. coli* y *Corynebacterium*, con el fin de construir pECCG122-Pcj7-gapN3 (Fig. 1).

**Ejemplo 7. Preparación de *Corynebacterium glutamicum* (KFCC-10881) productora de lisina por mutación artificial**

Se usó *Corynebacterium glutamicum* (KFCC-10881) preparada por mutación artificial, que es resistente a S-(2-aminoetil) cisteína (en lo sucesivo denominada como "AEC") y produce cantidades pequeñas de homoserina, como una cepa en la que se insertó una pluralidad de genes responsables de la vía biosintética de la lisina.

La cepa mutante KFCC-10881 se preparó a partir de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032) de tipo silvestre como una cepa madre. La cepa madre de  $10^7$  ~  $10^8$  células/ml se trató con el mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (en lo sucesivo denominada "NTG") en una concentración final de 500 µg/ml a 30 °C durante 30 min, seguido de la selección de colonias crecidas en una placa compleja que contiene 5 g/l de AEC. Después de analizada la cepa mutante primaria en cuanto a la resistencia a AEC y la productividad de lisina, se indujo la mutación secundaria con NTG. Una pluralidad de las colonias formadas de este modo fueron recogidas con palillo en medio mínimo, las cuales fueron o no fueron suplementados con homoserina (100 mg/l), a fin de separar los auxótrofos de homoserina (mutantes secundarios), los cuales no pueden crecer en un medio mínimo que carece de homoserina. Se indujo una mutación terciaria en el auxótrofo de homoserina a fin de crear una cepa que produce cantidades pequeñas de homoserina que se identificó por incubación en un medio mínimo que contenía 10 mg/l de homoserina. La cepa crecida en el medio fue examinada para determinar la productividad de lisina (Tabla 4). La cepa productora de lisina resultante, que es resistente a la AEC y que produce cantidades pequeñas de homoserina, se depositó en la Colección Coreana de Cultivos de Microorganismos, número de acceso KFCC-10881.

[Tabla 4] Productividad de lisina de KFCC-10881

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Tipo silvestre (ATCC13032)	0	0	0
KFCC-10881	45	43	42,5

Medio mínimo (pH 7,0)

Glucosa 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, urea 2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,4 g, biotina 200 µg, tiamina HCl 3000 µg, pantotenato de calcio 1000 µg, nicotinamida 5000 µg, NaCl 0,5 g (por 1 litro de agua destilada)

Medio de siembra (pH 7,0)

- 5 Glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 10 g, urea 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 44 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,5 g, biotina 100 µg, tiamina HCl 1000 µg (por 1 litro de agua de proceso)

Medio de Producción (pH 7,0)

Glucosa 100 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 g, proteína de soja 2,5 g, maíz fermentado sólido 5 g, urea 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, biotina 100 µg, tiamina HCl 1000 µg, CaCO<sub>3</sub> 30 g (por 1 litro de agua destilada)

10 **Ejemplo 8. Clonación del gen gapA obtenido de *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10881, construcción del vector recombinante (pDZ-gapA) y preparación de la cepa con gen gapA alterado**

En este Ejemplo, el gen gapA de la ruta biosintética de la lisina fue obtenido por PCR usando un ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 productor de lisina preparado en el Ejemplo 7 como molde. Se adquirió de GenBank de los NIH, la información de la secuencia del gen gapN (NCBI n° de acceso NC\_003450, NCg11526) y se sintetizaron dos pares de cebadores (Tabla 5, SEC ID N° 7 a 10).

Se realizó la PCR utilizando el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 como molde y un conjunto de cebadores de oligonucleótidos de las SEC ID N° 7 y 10 en presencia de PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene), con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s; hibridación a 53 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 30 seg. Se observó que los productos de PCR obtenidos de este modo eran dos tipos de fragmentos de gen gapA (gapA-A, gapA-B) de 600 pb. El gapA-A se amplificó usando los cebadores de SEC ID N° 7 y 8 y el gapA-B fue amplificado utilizando los cebadores de la SEC ID N° 9 y 10. Los productos amplificados fueron clonados en un vector pCR2.1 de *E. coli* usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen), a fin de obtener los vectores pCR-gapA-A y pCR-gapA-B.

[Tabla 5] Cebador

Cebador	secuencia	SEC ID N°
F- gapA -Sall_P1	CAC <u>GTC GAC</u> GAA TGT GTC TGT ATG	7
R- gapA- XbaI_P2	TGA <u>TCT AGA</u> AGA TGA TGA CCT TCT	8
F- gapA -XbaI_P3	CCA <u>TCT AGA</u> GCT CTG GTT CTC CCA GAG	9
R- gapA -XbaI_P4	GCT <u>TCT AGA</u> GGT CTT AAC AGC CAT GCC	10

Estos vectores de PCR fueron tratados respectivamente con las enzimas de restricción incluidas en cada extremo de gapA-A y gapA-B (gapA-A: Sall, XbaI, gapA-B: XbaI) para separar los genes gapA partir de los vectores de pCR. A continuación, estos fragmentos se clonaron a través de la ligación de 3 piezas en un vector pDZ (referencia: Publicación de Patente N° 10-2008-0025355) tratado con enzimas de restricción Sall y XbaI, para producir un vector recombinante pDZ-gapA, en el que dos copias de gapA se clonaron de forma consecutiva. La figura 2 muestra un vector pDZ-gapA para la inserción cromosómica de *Corynebacterium*.

El vector pDZ-gapA construido se transformó en *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10 881 productor de lisina preparado en el Ejemplo 7, seguido por la inserción de un vector que tiene una delección de 300 pares de bases en el gen gapA en el gen gapA del cromosoma por entrecruzamiento secundario, a fin de producir un *Corynebacterium glutamicum* CA01-0096 productor de lisina que tiene el gen gapA inactivado (N° de Acceso KCCM 11012P). La PCR se realizó usando los cebadores de SEC ID N° 7 y 10 para confirmar que el gen gapA alterado tiene una delección de 300 pares de bases del gen gapA de tipo silvestre.

**Ejemplo 9. Inducción de la expresión del gen gapN en CA01-0096**

Los vectores pECCG122-Pcj7-gapN1 ~ 3 obtenidos en los Ejemplos 2, 4 y 6 se introdujeron en CA01-0096. La cepa con gapA alterado no crece en un medio mínimo donde suele crecer *Corynebacterium glutamicum* (documento de referencia; Hideaki Yukawa et al., J. Mol Microbiol Biotechnol., 2004; 8:91-103).

Los vectores pECCG122-Pcj7-gapN1 ~ 3 se transformaron en CA01-0096 mediante un procedimiento de pulso eléctrico a fin de preparar cepas transformadas (cepa N° CA01-0565, CA01-0566, CA01-0567). La expresión de gapN se indujo en *Corynebacterium glutamicum* mediante la utilización de la característica de crecimiento en un medio mínimo mediante la expresión de gapN. Las cepas CA01-0565, CA01-0566, CA 02-0567 fueron depositadas en KCCM (Colección Coreana de Cultivos de Microorganismos, ubicada en 361-221 Yurim Bild., Hongje 1-dong,

Seodaemun-gu, Seúl, Corea) el 2 de julio de 2009 con los N<sup>os</sup> de acceso KCCM 11013P, KCCM 11014P y KCCM 11015P, respectivamente.

**Ejemplo 10. Examen de la actividad gapN en la cepa productora de lisina**

5 Se examinó el crecimiento en un medio mínimo utilizando glucosa como fuente de carbono. Como resultado, la cepa con gapA alterado no creció y la cepa que expresa gapN se recuperó y creció.

[Tabla 6] Crecimiento

Cepa	Crecimiento	Sin crecimiento
KFCC10881	Crecimiento	
CA01-0096		Sin crecimiento
CA01-0565	Crecimiento	
CA01-0566	Crecimiento	
CA01-0567	Crecimiento	

**Ejemplo 11. Examen de la actividad gapN en la cepa productora de lisina**

10 Se midieron los niveles de expresión de gapN para confirmar si el gen gapN del vector de expresión de gapN se expresaba en una célula con el fin de exhibir su actividad. Las cepas CA01-0565, CA01-0566 y CA01-0567 se prepararon mediante la introducción de cada uno de los vectores pECCG122-Pcj7-gapN1,2,3 en la cepa con gapA alterado, la cepa CA01-0096 con gapA alterado y la cepa KFCC 10881 con gapA se cultivaron en medios de siembra durante un día y después se diluyó a una D.O. 600 = 0,2 y se recuperaron 25 ml de cada célula a una D.O. 600 = 10. La actividad gapN se determinó por un procedimiento descrito en A. Soukri et al., Protein Expression and Purification; 25; (2002) 519-529. Como resultado, se encontró gapN1 a 30 °C durante 20 horas con agitación (220 rpm). Después de esto, se inoculó 1 ml de cada uno de los cultivos de siembra en un matraz con deflector en ángulo de 250 ml que contiene 25 ml del medio de producción y se cultivó a 35 °C durante 96 horas con agitación (200 rpm). Después de la terminación del cultivo, se realizó el análisis por HPLC para determinar las cantidades de L-lisina producida por las cepas. Las concentraciones de L-lisina en los cultivos de *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10 881, CA01-0096, CA01-0565, CA01-0566 y CA01-0567 se resumen en la siguiente Tabla 8. Como resultado, la cepa con gapA alterado no produjo lisina. Se observó que la lisina era producida por el gen gapN introducido en la cepa con gapA alterado y las cantidades de producción también se incrementaron en un 16 ~ 17%, en comparación con las de la cepa madre KFCC-10 881 (Tabla 8).

[Tabla 8] Resultado del cultivo en matraz

Nombre de cepa	Lisina (g/l)
KFCC-10881	42
CA01-0096	0
CA01-0565	50
CA01-0566	48,8
CA01-0567	46

**Efecto**

De acuerdo con la presente divulgación, la cepa de *Corynebacterium* que tiene una productividad de L-lisina y una actividad gapN se prepara mediante la introducción de genes que codifican gapN obtenidos de *Streptococcus* y *Bacillus* y, por lo tanto, el poder reductor se incrementa para suministrar la energía necesaria para la producción de lisina, lo que conduce al aumento de la producción de L-lisina. se incrementa para suministrar la energía necesaria para la producción de lisina, lo que conduce al aumento de la producción de L-lisina.

<110> CJ CHEILJEDANG Corporation

<120> Procedimiento para la producción de L-lisina en *Corynebacterium* sp. amplificando el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa obtenido de otra

<130> OPA10051/PCT

<150> KR10-2009-0062322

<151> 08-07-2009

<160> 14

5 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador gapN\_F1 de *Streptococcus mutans*

15 <400> 1  
 gcgcatatga caaaacaata taaaaa 26

<210> 2  
 <211> 27  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de gapN\_R1 de *Streptococcus mutans*

25 <400> 2  
 gcgtctagat tatttgat caaac 27

<210> 3  
 <211> 24  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador de gapN\_F2 de *Streptococcus agalactiae*

35 <400> 3  
 gcgcatatga caaaagaata tcaa 24

<210> 4  
 <211> 27  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador gapN\_R2 de *Streptococcus agalactiae*

45 <400> 4  
 gcgtctagac tatttcatat caaaaac 27

<210> 5  
 <211> 24  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador gapN\_F3 de *Bacillus cereus*

55 <400> 5  
 gcgcatatga caactagcaa tacg 24

<210> 6  
 <211> 24  
 60 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 552 342 T3

<220>  
 <223> Cebador gapN\_R3 de *Bacillus cereus*

5 <400> 6  
 gcgtctagat taaactaagt ttaa 24

<210> 7  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador F- gapA -Sall\_P1 de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881

15 <400> 7  
 cacgctgacg aatgtgtctg tatg 24

<210> 8  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador R- gapA- Xbal\_P2 de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881

25 <400> 8  
 tgatctagaa gatgatgacc ttct 24

<210> 9  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador F- gapA -Xbal\_P3 de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881

35 <400> 9  
 ccatctagag ctctggttct cccagag 27

<210> 10  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador R- gapA -Xbal\_P4 de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881

45 <400> 10  
 gcttctagag gtcttaacag ccatgcc 27

50 <210> 11  
 <211> 1428  
 <212> ADN  
 <213> *Streptococcus mutans*

55 <400> 11

ES 2 552 342 T3

ttgacaaaac aatataaaaa ttatgtcaat ggcgagtgga agctttcaga aaatgaaatt	60
aaaatctacg aaccggccag tggagctgaa ttgggttcag ttccagcaat gagtactgaa	120
gaagtagatt atgtttatgc ttcagccaag aaagctcaac cagcttggcg atcactttca	180
tacatagaac gtgctgcta ccttcataag gtagcagata ttttgatgcg tgataaagaa	240
aaaataggtg ctgttctttc caaagaggtt gctaaaggtt ataaatcagc agtcagcgaa	300
gttgttcgta ctgcagaaat cattaattat gcagctgaag aaggccttcg tatggaaggt	360
gaagtccttg aaggcggcag ttttgaagca gccagcaaga aaaaaattgc cgttgttogt	420
cgtgaaccag taggtcttgt attagctatt tcaccattta actaccctgt taacttggca	480
ggttcgaaaa ttgcaccggc tcttattgcy ggaaatgta ttgcttttaa accaccgacg	540
caaggatcaa tctcagggtt cttacttgcg gaagcatttg ctgaagctgg acttcctgca	600
ggtgtcttta ataccattac aggtcgtggt tctgaaattg gagactatat tgtagaacat	660
caagcogtta actttatcaa tttcactggt tcaacaggaa ttggggaacg tattggcaaa	720
atggctggta tgcgtccgat tatgcttgaa ctcggtggaa aagattcagc catcgttctt	780
gaagatgcag accttgaatt gactgctaaa aatattattg caggtgcttt tggttattca	840
ggtcaacgct gtacagcagt taaacgtggt cttgtgatgg aaagtgttgc tgatgaactg	900
gtcgaaaaaa tccgtgaaaa agttcttgcg ttaacaattg gtaatccaga agacgatgca	960
gatattacac cgttgattga tacaaaatca gctgattatg tagaaggtct tattaatgat	1020
gccaatgata aaggagccgc tgccttact gaaatcaaac gtgaaggtaa tcttatctgt	1080
ccaatectct ttgataaggt aacgacagat atgcttcttg cttgggaaga accatttgggt	1140
cctgttcttc cgatcattcg tgtgacatct gtagaagaag ccattgaaat ttctaacaaa	1200
tcggaatatg gacttcaggc ttctatcttt acaaatgatt tcccacgcgc ttttggatt	1260
gctgagcagc ttgaagttgg tacagttcat atcaataata agacacagcg cggtacggac	1320
aacttccat tcttaggggc taaaaaatca ggtgcaggta ttcaaggggt aaaatattct	1380
attgaagcta tgacaactgt taaatccgtc gtatttgata tcaaataa	1428

<210> 12  
 <211> 1428  
 <212> ADN  
 <213> *Streptococcus agalactiae*  
 <400> 12

5

ES 2 552 342 T3

ttgacaaaag aatatcaaaa ttatgtcaat ggcgaaatgga aatcatctgt taatcagatt 60  
 gagatthttgt caccaattga tgattcttca ttgggattcg tgccagcgat gactcgagaa 120  
 gaagttgatc atgctatgaa agcgggtcgt gaggctttac cagcctgggc tgctttgaca 180  
 gtatatgaac gtgcacaata ccttcataaa gccgcagaca ttattgaacg tgataaagaa 240  
 gaaattgcta ctgttttagc aaaagaaatt tctaaagctt acaatgcttc agtaactgag 300  
 gttgtaagga cagctgatct tattcgttat gcagcagaag aaggaattcg tttatcaact 360  
 tcagctgacg aaggtggaaa aatggatgct tcaacaggtc ataagttggc tgttattcgt 420  
 cgtcaaccag taggtatcgt tttagcaatc gcaccttata attacctgt taacctctca 480  
 ggatcaaaaa ttgcgccagc tctaattggt ggaacgctg tgatgttta accaccaaca 540  
 caaggttcag totcaggact tgttttagca aaagctttg cagaagcagg tottcagca 600  
 ggtgtcttta atactattac aggacgcggt tctgagattg gagattacat tgttgagcat 660  
 gaagaagta attttattaa ctttacagga tcaacgccag ttggaaaacg tattggtaag 720  
 ttagcaggaa tgcgtccaat tatgcttgag ttgggtgga aggatgcagg tgcctctta 780  
 gctgatgctg accttgacaa cgctgctaaa caaatcgttg caggtgctta tgattactcc 840  
 ggacaacgct gtacggcaat taagcgtgta cttgtcgttg aagaagttgc agatgaattg 900  
 gcagaaaaaa tatctgaaaa tgtagcaaaa ttatcagtag gtgatccatt tgataatgca 960  
 acggtgacac cggttattga tgataattca gccgacttta ttgaaagett agtagtagat 1020  
 gcacgtcaaa aaggtgcaa agaattgaat gaatttaaac gtgatggtcg tctattaact 1080  
 ccaggattgt ttgatcatgt tacttttagat atgaaactag cttgggaaga gccttttggg 1140  
 ccaattctcc caattattcg tgtcaaggat gcagaagaag ctggtgctat tgccaacaaa 1200  
 tctgattttg gattacaatc atcagctttt acacgtgatt tccaaaaagc atttgatata 1260  
 gcaataaac ttgaagttgg tacagttcac attaacaata agactggacg tggctctgat 1320  
 aatttcccat tottaggact caaaggatct ggtgcaggtg ttcaaggtat cagatattca 1380  
 attgaagcaa tgacaaatgt aaaatcgata gtttttgata tgaaatag 1428

<210> 13  
 <211> 1440  
 <212> ADN  
 <213> *Bacillus cereus*  
 <400> 13

5

ES 2 552 342 T3

atgacaacta gcaatacgtg caaattttat ttaaaccggag aatggagaga aagctcttca 60  
 ggagaaacaa tcgaaattcc atctccatac ttacacgaag taattggaca agtacaagca 120  
 attactcgcg gagaagtaga tgaagcaatt gcatctgcaa aagaagctca aaaatcatgg 180  
 gctgaagctt ccctacaaga tcgcgcaaaa tacttatata aatgggctga tgagctcgta 240  
 aatatgcagg atgaaattgc cgatatcatt atgaaagaag tcggtaaagg atataaagat 300  
 gcgaagaaag aagttgttcg tacagctgac ttcattcgtt acacgatcga agaagcttta 360  
 catatgcacg gagaaagcat gatgggcat agcttcccgg gcggtacaaa atctaagctt 420  
 gcgattatcc aacgcgcacc acttgggtgt gtattagcaa tcgcaccatt taactacca 480  
 gtaaacttat ctgctgcaaa acttgcacca gcattaatta tgggtaacgc tgttatttcc 540  
 aaaccagcaa ctcaaggtgc aattagtggg attaaaatgg ttgaagcact tcataaagct 600  
 ggcttccaa aaggtcttgt aaacgtagct acaggacgcg gttctgtaat tggtgactac 660  
 ttagtagaac acgaaggcat caatatggtg tcggtcacag gtggtacaaa cacaggtaaa 720  
 catttagcga aaaaagcttc aatgattcca cttgtattag aacttgggtg taaagatcct 780  
 ggtatcgttc gtgaagatgc tgacttaca gatgctgcaa accatcgtt aagcgggtgca 840  
 ttctcttact ctggtaacg ttgtacagct attaaacgtg tacttgtaca cgaaaacgta 900  
 gcggacgagc ttgttagctt attaaaagcg caagtagctg aactatcagt tggatctcca 960  
 gaacaagata gcacaatcgt tccattaatc gacgacaagt ctgctgactt cgttcaaggt 1020  
 ttagttgacg acgctgtaga aaaaggtgct acaatcggtt tcggtacaaa acgtgagcgt 1080  
 aacttaattt acccaacatt aatcgatcac gtaacagaag agatgaaagt tgcttgggaa 1140  
 gagccattcg gcccaatcct tccaatcacc cgtgtttctt cagatgaaca agcaattgaa 1200  
 attgctaaca aatcagagtt cggctctgcaa gcaagtgtct tcaactaaga cattaacaaa 1260  
 gcatttgcaa ttgctaacaa aatcgaaact ggttctgttc aaattaacgg acgcacagag 1320  
 cgcgccctg accacttccc attcatcggg gtaaaagggt caggatggg cgcacaaggt 1380  
 attcgtgaaga gccttgagtc tatgacacgt gaaaaagtaa ctgtattaaa cttagttaa 1440  
 1440

<210> 14  
 <211> 1005  
 <212> ADN  
 <213> *Corynebacterium* sp.

<400> 14

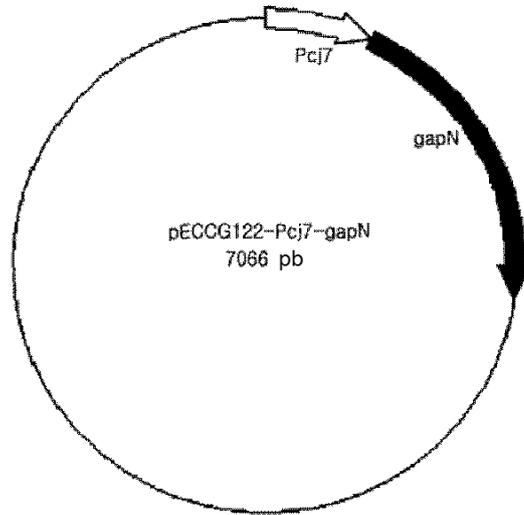
ES 2 552 342 T3

atgaccattc	gtggttggtat	taacggattt	ggcgcgtagc	gacgtaactt	cttccgcgca	60
gttctggagc	gcagcgacga	tctcgaggta	gttgcagtea	acgacctcac	cgacaacaag	120
accctttcca	cccttctcaa	gttcgactcc	atcatgggcc	gccttggcca	ggaagttgaa	180
tacgacgatg	actccatcac	cgttggtggc	aagcgcacgc	ctgtttacgc	agagcgcgat	240
ccaaagaacc	tggactgggc	tgcacacaac	gttgacatcg	tgatcgagtc	caccggcttc	300
ttcaccgatg	caaacgcggc	taaggtcac	atcgaagcag	gtgccaagaa	ggcatcatc	360
tccgcaccag	caagcaacga	agacgcaacc	tctgtttacg	gtgtgaacca	cgagtcctac	420
gatcctgaga	accacaacgt	gatctccggc	gcattcttga	ccaccaactg	cctcgcacca	480
atggcaaagg	tcctaaacga	caagttcggc	atcgagaacg	gcctcatgac	caccgttcac	540
gcatacactg	gcgaccagcg	cctgcacgat	gcacctcacc	gcgacctgcg	tcgtgcaegt	600
gcagcagcag	tcaacatcgt	tcctacctcc	accggtgcag	ctaaggctgt	tgctctggtt	660
ctcccagagc	tcaagggcaa	gcttgacggc	tacgcacttc	gcgttccagt	tatcaccggt	720
tccgcaaccg	acctgacctt	caacaccaag	tctgaggtea	ccgttgagtc	catcaacgct	780
gcaatcaagg	aagctgcagt	cggcgagttc	ggcgagacct	tggettactc	cgaagagcca	840
ctggtttcca	ccgacatcgt	ccacgattcc	cacggctcca	tcttcgacgc	tggcctgacc	900
aaggtctccg	gcaacaccgt	caaggttgtt	tcttggtagc	acaacgagtg	gggctacacc	960
tgccagctcc	tgcgtctgac	cgagctcgtg	gcttccaagc	tctaa		1005

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. La cepa de *Corynebacterium* sp. que tiene una actividad de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP y una productividad de L-lisina, en la que un gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gapA) endógeno está inactivado y se introduce un gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAPD (gapN) exógeno.
2. La cepa de *Corynebacterium* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP exógeno es un gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP de *Streptococcus mutans*, (ATCC 25175), *Streptococcus agalactiae* (ATCC BAA-611) o *Bacillus cereus* (ATCC 14579).
- 10 3. La cepa de *Corynebacterium* sp. de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el gen de *Streptococcus mutans*, el gen de *Streptococcus agalactiae* y el gen de *Bacillus cereus* tienen las secuencias de nucleótidos de SEC ID N<sup>OS</sup> 11, 12, y 13, respectivamente.
4. La cepa de *Corynebacterium* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el gen que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa endógeno tiene la secuencia de nucleótidos de SEC ID N° 14.
- 15 5. La cepa de *Corynebacterium* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cepa de *Corynebacterium* sp. es *Corynebacterium glutamicum* CA01-0565 (N° de Acceso KCCM 11013P), *Corynebacterium glutamicum* CA01-0566 (N° de Acceso KCCM 11014P) o *Corynebacterium glutamicum* CA01-0567 (N° de Acceso KCCM 11015P).
- 20 6. La cepa de *Corynebacterium* sp. de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el aumento de la productividad de L-lisina se obtiene del poder reductor aumentado por la activación de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP.
7. Un procedimiento de producción de L-lisina, que comprende las etapas de cultivar la cepa de *Corynebacterium* sp. de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y recuperar la lisina a partir de las células cultivadas o del caldo de cultivo.

[Fig. 1]



[Fig. 2]

