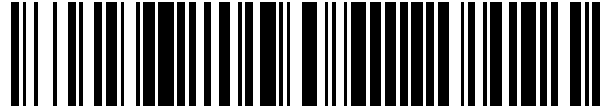


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 877**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2009 PCT/KR2009/000382**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2009 WO09096690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2009 E 09705987 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2236610**

54 Título: **Promotor mejorado y método para la producción de L-lisina mediante el uso del mismo**

30 Prioridad:

31.01.2008 KR 20080010073

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

23.01.2017

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
500, NAMDAEMUNRO 5-GA JUNG-GU
SEOUL 100-749, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, CHUL HA;
CHOI, JONG SOO;
LIM, SANG JO;
KIM, HYOUNG JOON;
RAH, SO YEON y
JEON, GEY HANG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 597 877 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

Promotor mejorado y método para la producción de L-lisina mediante el uso del mismo

5 La presente invención se refiere a un promotor mejorado y a un método para la producción de L-lisina mediante el uso del mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que procede de *Corynebacterium glutamicum*, que muestra una actividad promotora mejorada, que está unida operativamente a un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa, a un vector que contiene la molécula de ácido nucleico, a un transformante con el vector introducido en el mismo, y a un método para la producción de L-lisina mediante el uso del transformante.

15 Las bacterias corineformes son tradicionalmente microorganismos industriales que se usan muy ampliamente para la producción de una diversidad de materiales químicos útiles en la alimentación animal, en las industrias médicas y alimentarias, que incluyen aminoácidos, tales como L-lisina, L-treonina, L-arginina, L-treonina y ácido glutámico, y materiales relacionados con los ácidos nucleicos. Estos microorganismos son grampositivos y requieren biotina para su crecimiento. Se dividen mediante ruptura brusca y su baja capacidad para degradar los metabolitos que producen puede utilizarse de forma ventajosa. Algunos ejemplos representativos de bacterias corineformes incluyen el género *Corynebacterium*, tal como *Corynebacterium glutamicum*, el género *Brevibacterium*, tal como *Brevibacterium flavum*, especies de *Athrobacter* y especies de *Microbacterium*, etc.

20 La L-lisina es un L-aminoácido comercialmente importante que se usa como aditivo alimentario en nutrición animal gracias a su capacidad para ayudar al cuerpo en la absorción de otros aminoácidos, mejorando así la calidad del alimento animal. Para el cuerpo, L-lisina se usa como un ingrediente de soluciones para inyección, y también halla aplicaciones en el ámbito farmacéutico. Por lo tanto, la producción industrial de L-lisina es un proceso industrial económicamente importante.

30 El rendimiento de producción de la lisina está correlacionado con la actividad de la enzima de la ruta biosintética, que normalmente puede mejorarse mediante la aplicación de uno o más de los genes de la ruta biosintética de la lisina o mediante el empleo de un promotor modificado para los genes. Las cepas de *Corynebacterium* con los genes asociados a la biosíntesis de la lisina potenciados en las mismas y la producción de L-lisina mediante el uso de las mismas son bien conocidas. Por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 6.746.855 desvela un proceso para la producción de L-lisina mediante la fermentación de una corinebacteria productora de L-lisina con el gen lysE mejorado (el gen portador de la exportación de lisina), en la que se mejoran adicionalmente genes seleccionados entre el grupo que consiste en un gen dapA, un gen lysC, un gen pyc y un gen dapB. La Patente de EE.UU. nº 6.221.636 desvela corinebacterias transformadas con un ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una aspartocinasa en la que la inhibición de la retroalimentación por parte de la L-lisina y de la L-treonina está sustancialmente desensibilizada, y una secuencia de nucleótidos que codifica una descarboxilasa de diaminopimelato.

40 Ishino (1987), Nuc. Acid. Res. 15, 3917, e Ishino (1988), Agricultural and Biolog. Chemistry Jap. Soc. Biosciences, Biotechnology and Agrochem 52, 2903-2910 describen la clonación y la secuenciación del gen de la D-deshidrogenasa de mesodiaminopimelato DDH de *Corynebacterium glutamicum*.

45 La Patente Coreana nº 10-0345592 describe una cepa de *Escherichia* en la que se introducen dapA y lysC, ambos modificados para eliminar la inhibición por retroalimentación de la L-lisina, y en la que los genes dapB y ddh están amplificados, y un método para la producción de L-lisina mediante el uso de la misma.

50 Para el desarrollo de bacterias corineformes en variantes capaces de producir los productos objetivo en una elevada cantidad se necesita una técnica de ingeniería genética o metabólica mediante la cual los genes implicados en el metabolismo puedan ser controlados selectivamente. Con este fin es importante modificar la actividad de un promotor, una región reguladora del ADN que proporciona un sitio de unión inicial seguro para la polimerasa de ARN para el control de la transcripción de los genes regulados.

55 Los promotores modificados procedentes de bacterias corineformes se encuentran en muchas patentes. Por ejemplo, se describen promotores de *Corynebacterium* en la Patente de EE.UU. nº 5.700.661 titulada "Gene expression regulatory DNA", en la Patente de EE.UU. nº 5.965.391 titulada "DNA which regulates gene expression in coryneform bacteria", en la Patente de EE.UU. nº 7.141.388 titulada "Nucleotide sequences for transcriptional regulation in corynebacterium glutamicum" y en la Patente Coreana nº 10-0653742 titulada "Novel L-lysine-inducible promoter", y se describe un nuevo promotor de *Corynebacterium ammoniagenes* en la Publicación de Patente Coreana nº 10-2006-0068505 titulada "Novel promoter nucleic acid originating from corynebacterium genus bacteria, expression cassette comprising the promoter and vector comprising the cassette, host cell comprising the vector and method for expressing a gene using the cell".

65 Sin embargo, hasta la fecha no se ha divulgado ninguna de las bacterias corineformes que tengan mejorada la actividad de la ddh (diaminopimelato deshidrogenasa), que juega un papel crítico en la ruta biosintética de la lisina, que tiene un promotor mejorado para la enzima que sustituye el endógeno del genoma de la célula hospedadora.

Dando lugar a la presente invención, una amplia e intensa investigación sobre la producción de L-lisina dio como resultado el hallazgo de que cuando es transformado con un promotor del gen de la ddh, modificado en unas bases en particular, en el genoma de la corinebacteria, un microorganismo del género *Corynebacterium* muestra una actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa mejorada con respecto a la actividad endógena.

5 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una molécula de ácido nucleico procedente de *Corynebacterium glutamicum* que muestra una actividad promotora mejorada.

10 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un vector que contiene la molécula de ácido nucleico que muestra una actividad promotora mejorada.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un transformante con el vector anclado en el mismo.

15 Es un objetivo adicional más de la presente invención proporcionar un método para la producción de L-lisina mediante la fermentación del transformante.

20 Consecuentemente, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 2, que está unida operativamente a un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa.

25 Cuando está unida operativamente a un gen de la ddh, la molécula de ácido nucleico procedente de *Corynebacterium glutamicum*, que muestra una actividad promotora mejorada, de acuerdo con la presente invención, muestra una mayor actividad promotora de lo que lo hace el promotor natural, y por lo tanto puede aumentar la actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa. Por lo tanto, la cepa productora de lisina transformada con la molécula de ácido nucleico puede producir lisina con un mayor rendimiento.

Las figuras anexas muestran:

30 la FIG. 1 es un diagrama que muestra un mapa genético del vector pDZ para su integración en el genoma de una corinebacteria.

la FIG. 2 es un diagrama que muestra un mapa genético del vector pDZ-ddhP1 para la sustitución del promotor.

35 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una molécula de ácido nucleico procedente de *Corynebacterium glutamicum* que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 2, que está unida operativamente a un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa y que muestra una actividad promotora mejorada.

40 El término "promotor", según se usa en el presente documento, se refiere a una región del ADN que contiene un sitio de unión inicial para la polimerasa de ARN y que facilita la transcripción de un gen en particular secuencia abajo del mismo. Esto es, un promotor es una secuencia de nucleótidos no traducida secuencia arriba de una región codificante, a la que se une la polimerasa de ARN para iniciar la transcripción de un gen, y que normalmente está ubicada próxima a los genes que regula, en la misma hebra y secuencia arriba (hacia la región 5' de la hebra sentido).

45 La molécula de ácido nucleico de la presente invención, procedente de *Corynebacterium glutamicum*, que tiene una actividad promotora, está unida operativamente a un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa. El gen de la ddh que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa juega un importante papel en la ruta biosintética de la lisina en las especies de *Corynebacterium*.

50 Se pretende que el término "unido operativamente", según se usa en el presente documento, se refiera a una unión entre la secuencia de nucleótidos que tiene una actividad promotora según la presente invención y la secuencia promotora en una relación funcional tal que el promotor puede servir para iniciar y mediar en la transcripción de un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa. Esto es, cuando está unida operativamente a un gen de la ddh, la secuencia de nucleótidos que tiene una actividad promotora de acuerdo con la presente invención puede controlar la actividad de transcripción del gen de la ddh.

60 La secuencia de nucleótidos que tiene una actividad promotora de acuerdo con la presente invención, procedente de un promotor del gen de la ddh natural de *Corynebacterium glutamicum*, está modificada para garantizar una actividad enzimática superior a la actividad endógena. La actividad endógena significa la actividad de una enzima de las bacterias corineformes naturales. La modificación para garantizar una mayor actividad promotora puede conseguirse mediante el uso de técnicas bien conocidas en la materia, preferentemente mediante la inducción de una mutación en la secuencia de nucleótidos del promotor del gen de la ddh a través de una delección, una inserción, una sustitución conservativa o no conservativa, o una combinación de las mismas.

65

La molécula de ácido nucleico que tiene una actividad promotora de acuerdo con la presente invención puede aislarse o prepararse mediante el uso de una técnica biológica habitual. Por ejemplo, puede llevarse a cabo una PCR para su aislamiento en presencia de los cebadores adecuados. Como alternativa, puede ser sintetizada con una técnica biológica habitual mediante el uso de un sintetizador automático de ADN. En una realización, sobre la base de una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO. 1) que contiene una región promotora de un gen de la *ddh* (el gen NCBI, ID: NCg12528) obtenida a partir de los datos del NIH GenBank, se sintetizaron cuatro cebadores (las SEQ ID NOS. 3 ~ 6). En presencia de los cebadores, se llevó a cabo una PCR para dar una molécula de ácido nucleico que contiene el promotor que tiene modificaciones en unas posiciones de bases en particular (SEQ ID NO. 2), sirviendo como molde el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881.

Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico que tiene una actividad promotora de *Corynebacterium glutamicum* de acuerdo con la presente invención es útil como promotor para la expresión génica en procariontes, especialmente en *E. coli* o en bacterias corineformes. Según se usa en el presente documento, la expresión "bacterias corineformes" se refiere a un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* o al género *Brevibacterium*. Algunos ejemplos de bacterias corineformes útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, y los mutantes productores de L-aminoácidos o las cepas procedentes de los mismos, tales como *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 y *Corynebacterium glutamicum* KFCC11001, con preferencia por *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10881.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un vector en el que está localizada la molécula de ácido nucleico que tiene una actividad promotora mejorada.

Según se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una construcción de ADN en la que un gen de interés está unido operativamente a un elemento regulador, de forma que el gen pueda expresarse en un hospedador apropiado que ancla el vector en el mismo. El elemento regulador incluye un promotor para el inicio de la transcripción, un operador para el control de la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión del ARNm al ribosoma y una secuencia para el control de la terminación de la transcripción y de la traducción.

Siempre que sea replicable en hospedadores, en la presente invención puede emplearse cualquier vector conocido en la materia, sin ninguna limitación en particular. Por ejemplo, el vector útil en la presente invención puede ser un plásmido, una partícula de un fago o simplemente un potencial inserto genómico, pero la presente invención no se limita a los mismos. Un vector preferible es pACYC177 (New England Biolab, número de acceso del GenBank XO6402). Después de transformarse en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse o llevar a cabo su función independientemente del genoma del hospedador, o puede integrarse en el propio genoma.

Con más detalle, cuando el vector de acuerdo con la presente invención se introduce en una célula hospedadora, la molécula de ácido nucleico que tiene la actividad promotora del vector puede experimentar una recombinación homóloga con una región promotora para un gen endógeno de la *ddh* en el genoma del hospedador, dando como resultado la integración del vector en el cromosoma de la célula hospedadora. Por lo tanto, el vector de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente un marcador de selección para indicar la inserción del vector en el cromosoma del hospedador. Adaptado para indicar una célula transformada con el vector, es decir, si el gen de interés se ha insertado en el genoma de la célula hospedadora, el marcador de selección puede dotar a la célula la capacidad de mostrar resistencia a un fármaco, resistencia a un agente citotóxico, auxotrofia o la expresión de un fenotipo seleccionable, tal como la expresión de una proteína de superficie. En presencia de un agente selectivo, las células transformadas pueden seleccionarse gracias a que únicamente las células que expresan el marcador de selección sobreviven o muestran otro fenotipo. Preferiblemente, el vector puede comprender un gen *lacZ* como marcador de selección.

En una realización de la presente invención se construye un vector para que contenga un promotor modificado de la *ddh* con una actividad mejorada que puede sustituir el promotor endógeno de la *ddh* de *Corynebacterium glutamicum* a través de una recombinación homóloga. Con este fin, en primer lugar el vector pACYC177 para la clonación en *E. coli* se digiere con enzimas de restricción y se corta con extremos romos con un fragmento Klenow. Por separado se amplifica una secuencia de nucleótidos que comprende un gen *lacZ* y su promotor a partir del ADN genómico de *E. coli* K12W3110 a través de una PCR. Estos dos fragmentos de ADN así obtenidos se ligan entre sí para dar una molécula circular de ácido nucleico, seguido de la inserción de una secuencia adaptadora que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción en la misma en la molécula circular de ácido nucleico para proporcionar el vector pDZ para su inserción en el cromosoma de *Corynebacterium* (FIG. 1). A continuación se inserta un promotor del gen de la *ddh* modificado en unas bases en particular para que muestre una elevada actividad, en la secuencia adaptadora del vector pDZ para dar el vector pDZ-ddhP1 que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 2 (FIG. 2).

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a un transformante con el vector anclado en el mismo.

El término "transformación", según se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de un material de ADN exógeno en una célula hospedadora en el que el material de ADN exógeno es replicable como un elemento por separado o es incorporado en el genoma del hospedador. Como resultado de la transformación del vector en una célula hospedadora, el transformante ancla el vector en forma de un plásmido o según se incorpora en el cromosoma de la célula hospedadora después de que la secuencia de nucleótidos que tiene una actividad promotora experimente una recombinación homogénea con una región promotora endógena para un gen de la ddh en el genoma de la célula hospedadora.

Siempre que se use para la introducción del vector de la presente invención en una célula hospedadora, en la presente invención puede emplearse cualquier técnica. Dependiendo de la célula hospedadora, puede seleccionarse una técnica habitual adecuada, por ejemplo, entre electroporación, precipitación con fosfato de calcio (CaPO₄), precipitación con cloruro de calcio (CaCl₂), microinyección, una técnica con polietilenglicol (PEG), una técnica con DEAE-dextrano, una técnica con un liposoma catiónico y una técnica con acetato de litio-DMSO.

Es útil el uso de una célula hospedadora que sea muy eficaz en la captación y la expresión de materiales de ADN foráneos, y que pueda ser aplicable a todos los microorganismos, incluyendo procariontes y eucariontes. Preferiblemente, puede usarse *E. coli* o bacterias corineformes, y la más preferible es *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881.

En las células transformadas con el vector de la presente invención, el promotor modificado que tiene una actividad mejorada sustituye el promotor endógeno a través de una recombinación homóloga, que potencia el nivel de ARNm del gen de la ddh. Como resultado, el transformante tiene una mayor actividad de diaminopimelato deshidrogenasa que el natural.

En una realización de la presente invención, se transformó el vector pDZ-ddhP1 que portaba el promotor que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 2 de acuerdo con la presente invención en *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 para dar un transformante (KFCC10881-ddhP1), denominado CA01-0136, que muestra una actividad mejorada de diaminopimelato deshidrogenasa, que después se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (denominado en lo sucesivo "KCCM") con el número de acceso KCCM10920P el 18 de enero de 2008.

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a un método para la producción de lisina que comprende la fermentación del transformante de la presente invención.

En comparación con el natural, el transformante de acuerdo con la presente invención está mejorado en la actividad de diaminopimelato deshidrogenasa. Debido a que la diaminopimelato deshidrogenasa es la enzima más esencial de la ruta biosintética de la lisina, la fermentación del transformante da lugar a la producción de lisina con un mayor rendimiento.

En la presente invención, la fermentación del transformante puede llevarse a cabo mediante el uso de un método bien conocido, y las condiciones para la fermentación, que incluyen la temperatura, el tiempo, el pH, etc., pueden controlarse apropiadamente. En el siguiente documento se proporciona una descripción detallada de la fermentación [Chmiel; Bioprozesstechnik I. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), y en Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)]. La fermentación puede realizarse mediante un cultivo por discontinuo, un cultivo continuo o un cultivo semicontinuo. Preferiblemente, para la fermentación se usa un proceso por semicontinuo o semicontinuo repetido de una forma continua, pero la presente invención no se limita a los mismos.

Para su uso en la fermentación, un medio debe satisfacer el requisito de la cepa empleada. Los medios de cultivo adecuados para su uso en el cultivo de diversos microorganismos son bien conocidos en la materia (por ejemplo, "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU., 1981)). Los medios de cultivo pueden contener como fuentes de carbono sacáridos y carbohidratos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasa, almidón y celulosa), lípidos y grasas (por ejemplo, aceite de semilla de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de cacahuate y aceite de coco), ácidos grasos (por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido rinoico), alcoholes (por ejemplo, glicerol y etanol) y ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético). Estos materiales pueden usarse por separado o en combinación. Como fuentes de nitrógeno pueden usarse compuestos orgánicos que contengan nitrógeno (por ejemplo, peptona, extracto de levadura, caldo, extracto de malta, licor de maceración de maíz, harina de soja y urea) o compuestos inorgánicos (por ejemplo, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio) por separado o en combinación. Algunos ejemplos de fuentes de fósforo útiles en el medio de cultivo incluyen hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio y las correspondientes sales de sodio.

También, el medio de cultivo puede contener sales metálicas esenciales para el crecimiento de las células (por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato ferroso) y puede estar complementado con nutrientes esenciales para la estimulación del crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas. Además, pueden añadirse los precursores apropiados al medio de cultivo. Los nutrientes o los complementos pueden añadirse juntos de una vez o por

separado durante la fermentación.

El pH del medio de cultivo puede ajustarse con un compuesto alcalino (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco) o con un compuesto ácido (por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico). La generación de espumas en el medio de cultivo puede restringirse mediante el uso de un agente antiespumante tal como un éster de poliglicol de ácido graso. El medio de cultivo puede mantenerse en unas condiciones aerobias mediante la introducción de oxígeno o de una mezcla gaseosa que contenga oxígeno en el mismo. Con respecto a la temperatura del cultivo, normalmente es de entre 20 y 45 °C y preferentemente de entre 25 y 40 °C. La fermentación se continúa hasta que se produce una cantidad máxima del L-aminoácido. A este respecto, puede conseguirse en entre 10 y 160 h. Después de ser producida, la L-lisina puede exportarse al medio de cultivo o puede permanecer dentro de las células.

Como alternativa, el método para la producción de lisina de acuerdo con la presente invención puede comprender adicionalmente la recolección de la lisina producida. La L-lisina puede aislarse a partir del medio de cultivo o de las células mediante el uso de un método bien conocido. Algunos ejemplos del método útil para la recolección en la presente invención incluyen filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización y HPLC, pero no se limitan a los mismos.

Consecuentemente, la presente invención también proporciona un método para la producción de lisina, comprendiendo dicho método la fermentación del transformante de la presente invención y comprendiendo adicionalmente la recolección de la lisina producida. Al tener una actividad promotora mayor que la del natural, según se ha descrito hasta ahora, la molécula de ácido nucleico procedente de *Corynebacterium glutamicum* de acuerdo con la presente invención puede mejorar la actividad de diaminopimelato deshidrogenasa, aumentando así la eficacia de la biosíntesis de la lisina. Consecuentemente, la cepa que ancla el promotor mejorado puede producir L-lisina, un aminoácido industrialmente importante, con un elevado rendimiento.

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos, que se establecen para ilustrar, pero no deben ser interpretados como limitantes de la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

En los siguientes ejemplos se construyó un vector recombinante para que contuviera un promotor para un gen de la ddh de *Corynebacterium glutamicum* que se modificó para que tuviera una actividad mejorada. El vector recombinante se transformó en *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 en el que después se incorporó el promotor modificado de la ddh en el genoma de la célula mediante una recombinación homóloga con el promotor endógeno, dando como resultado una nueva cepa capaz de producir lisina con un mayor rendimiento.

La cepa mutada artificialmente a partir de una cepa natural de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032), *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 útil en la presente invención era resistente a las fugas de S-(2-aminoetil) cisteína (denominada en lo sucesivo "AEC") y de homoserina (Patentes Coreanas nº 0159812 y 0397322).

EJEMPLO 1: construcción del vector recombinante que contiene un promotor mejorado

(1) Construcción de un vector para su integración en el genoma (pDZ)

En este ejemplo se construyó pDZ, un vector que va a ser integrado en el genoma de *Corynebacterium*, sobre la base de pACYC177 (New England Biolab, número de acceso de GenBank X06402), un vector para su uso en *E. coli*.

Después de tratarse con Acul y BanI, el vector pACYC177 se cortó con extremos romos con un fragmento Klenow. Para su uso como marcador de selección se preparó un gen lacZ procedente de *E. coli* mediante la amplificación del ADN genómico de la *E. coli* K12 W3110 que comprende el gen y su promotor a través de una PCR, seguido del tratamiento del producto de la PCR con ADN polimerasa T4 y polinucleótido cinasa para fosforilar en el extremo 5' y crear extremos romos opuestos, respectivamente. Los dos fragmentos de ADN así obtenidos se ligaron entre sí para dar una molécula circular de ácido nucleico en la que se insertó después una secuencia adaptadora sintetizada artificialmente que contiene una pluralidad de enzimas de restricción para proporcionar el vector pDZ para su inserción en el cromosoma de *Corynebacterium*. En la FIG. 1 se ilustra esquemáticamente el vector pDZ para su integración en el cromosoma de *Corynebacterium*.

(2) Construcción de un vector que contiene un promotor mejorado para el gen de la ddh

En este ejemplo se construyó un vector recombinante para contener un promotor mejorado para un gen de la ddh de la cepa productora de lisina *Corynebacterium glutamicum*.

Sobre la base de los datos del NIH GenBank, en primer lugar se obtuvo una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO. 1) que comprende una región promotora para el gen de la ddh (NCBI ID Nº NCg12528). A partir de esta secuencia

de nucleótidos se preparó un fragmento de ADN que se mutó en unas posiciones de base en particular. Cada secuencia promotora modificada se diseñó sobre la base de una secuencia promotora consenso típica que se encuentra en los microorganismos.

- 5 Para su uso en la preparación de las secuencias promotoras modificadas se sintetizaron cuatro cebadores (SEQ ID NOS. 3 ~ 6, Tabla 1) basándose en las secuencias de la base.

TABLA 1

Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
ddh/PF	CCG GGG ATC CTC TAG AGT GCG TGG CGA GTT TTA CAA AG	3
ddh/PR	GCA GGT CGA CTC TAG AGG CGA ACT GCG CGA ACT TTG G	4
ddh/P1F	TAT GCA TTG TGG TAA GCT CG	5
ddh/P1R	CGA GCT TAC CAC AAT GCA TA	6
ddh/P1mut	CTA AGT ATG CAT TGT	7

- 10 Se preparó una secuencia promotora para el gen de la *ddh* de *Corynebacterium glutamicum* a través de una PCR mediante el uso de los conjuntos de cebadores de la Tabla 1 en presencia de ADN polimerasa *PfuUltra™* High-Fidelity (Stratagene) sirviendo como molde el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881. La PCR se llevó a cabo con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s, hibridación a 53 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Como resultado, el producto de la PCR era un fragmento de ADN con una longitud de 300 pb
- 15 con la porción de la sustitución ubicada en una región terminal. El *ddhP1-1* se amplificó con un conjunto de cebadores de las SEQ ID NOS. 3 y 6, y el *ddhP1-2* con un conjunto de cebadores de las SEQ ID NOS. 5 y 4. El producto de la PCR se digirió con XbaI y se clonó en pDZ mediante el uso de un kit de clonación In-fusion (TAKARA) para proporcionar el vector recombinante pDZ-*ddhP1*.
- 20 La FIG. 2 es un mapa del vector pDZ-*ddhP1* que contiene la secuencia promotora de la SEQ ID NO. 2 que está integrada en el genoma de *Corynebacterium*.

EJEMPLO 2: introducción del vector recombinante en cepas de *Corynebacterium glutamicum*

- 25 En este ejemplo se introdujo el vector recombinante preparado anteriormente en la cepa productora de lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10881, de forma que la secuencia promotora modificada de la *ddh* del vector se integrara en el genoma de la célula a través de una recombinación homóloga con el promotor de la *ddh* endógeno del genoma.
- 30 Con este fin se transformó el vector recombinante pDZ-*ddhP1* que contiene el fragmento de ADN correspondiente a la secuencia promotora modificada en *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 mediante el uso de un método de electroporación (basado en Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 541-545), seguido de la selección, en un medio de selección que contiene kanamicina en una cantidad de 25 mg/l, de los transformantes en los que el promotor modificado estaba integrado en el genoma a través de una recombinación homóloga con el promotor endógeno.
- 35 El éxito en la inserción del vector en el genoma fue identificado por la aparición de un color azul en la placa que contiene X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido). Los cruzamientos individuales con el vector incorporado en el genoma de los mismos se cultivaron en un caldo nutriente con agitación (30 °C, 8 h) tras lo cual el cultivo se diluyó hasta una concentración de desde 10^{-4} hasta 10^{-10} antes de extenderse sobre las placas que contienen X-gal.
- 40 Aunque la mayoría de las colonias cultivadas en las placas eran de color azul, únicamente una baja proporción de las colonias permaneció de color blanco. Las colonias de color blanco se seleccionaron como colonias de cruzamiento doble que anclaban el promotor de la *ddh* que estaba mutado en unas posiciones de base en particular. Para la confirmación, las cepas seleccionadas fueron analizadas para comprobar la sustitución de bases a través de una PCR y una secuenciación de las bases. La cepa transformada con pDZ-*ddhP1* fue analizada para comprobar la
- 45 sustitución de la base en el promotor mediante el uso de un conjunto de cebadores de las SEQ ID NOS. 4 y 7, a través de una PCR y una secuenciación de las bases.

- La cepa productora de lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-*ddhP1* en la que el promotor de la *ddh* mutado en unas posiciones de base en particular estaba integrado en el genoma de la misma, se confirmó finalmente a través de un cruzamiento doble.

EJEMPLO 3: ensayo de la cepa con el promotor mejorado de la *ddh* para analizar la actividad de diaminopimelato deshidrogenasa

- 55 Se cultivaron la cepa madre de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 y la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-*ddhP1* preparada finalmente en el Ejemplo 2, y se aislaron las proteínas

de los cultivos y se ensayaron para comprobar la actividad de diaminopimelato deshidrogenasa como sigue.

Cada uno de los cultivos cultivados en la fase logarítmica se inoculó en 50 ml del siguiente medio de siembra (I) para dar una DO₆₀₀ de 0,3, y después se incubó hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó aproximadamente 15. Después de recogerse a través de una centrifugación (5.000 rpm, 15 min), la masa de células se lavó dos veces con Tris HCl 20 mM (pH 8,0) y se suspendió en el mismo tampón hasta una absorbancia óptica a 610 nm de turbidez de 160. Las células se rompieron durante 6 min en un vaso de precipitados de vidrio con la adición de microesferas de vidrio a 1,25 g / 1,5 ml de la suspensión. Después de una centrifugación (15.000 rpm, 20 min), se midió cuantitativamente el contenido en proteínas del sobrenadante mediante un método de Bradford (Bradford, M. M 1976. Anal. Biochem. 72: 248-254) y se usó como una solución de proteínas en bruto para la medición de la actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa.

Con objeto de cuantificar la actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa, se mezclaron aproximadamente 0,01 ml de la solución de proteínas en bruto con una solución de reacción que contiene glicina 0,2 M / NaOH (pH 10,5), NADP 2 mM y mesodiaminopimelato 4 mM para dar un volumen total de 1 ml, y se dejó reaccionar a 25 °C durante 10 min, durante lo cual se controlaron las absorbancias a 340 nm. La actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa se definió como μ moles del NADPH reducido por min por 1 mg de proteína, y se expresó en unidades (U).

Se observó que *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-ddhP1 tenía una actividad de diaminopimelato deshidrogenasa 23,2 veces mayor que la de la cepa madre KFCC10881 (Tabla 2).

TABLA 2

Cepa	Diaminopimelato deshidrogenasa (U)	nº de veces
KPCC10881	25,2	1
KFCC10881-ddhP1	584,5	23,2

*** Medio de siembra (I) (pH 7,0)**

20 g de glucosa, 10 g de polipeptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de (NH₄)₂SO₄, 1,5 g de urea, 4 g de KH₂PO₄, 8 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄ 7 H₂O, 150 μ g de biotina, 1.500 μ g de tiamina HCl, 3.000 μ g de pantotenato de calcio, 3.000 μ g de nicotinamida (por litro de agua destilada)

EJEMPLO 4: producción de lisina en la cepa con el promotor de la ddh mejorado

Se fermentaron la cepa madre *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 y la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-ddhP1 preparadas en el Ejemplo 2 para producir L-lisina, como sigue.

Se inocularon *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10881 y KFCC10881-ddhP1 en matraces con tabiques en las esquinas de 250 ml, que contienen cada uno 25 ml del siguiente medio de siembra (II), y se cultivaron a 30 °C durante 20 h con agitación a 200 rpm. A 24 ml del siguiente medio de producción en un matraz con tabiques en las esquinas de 250 ml se añadió 1 ml del cultivo de siembra, seguido de una incubación a 30 °C durante 120 h con agitación (200 rpm).

Después de completarse el cultivo, se llevó a cabo un análisis mediante una HPLC para determinar la cantidad de L-lisina producida por las cepas. Las concentraciones de L-lisina en los cultivos de *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10881 y KFCC-10881-ddhP1 se resumen en la Tabla 3, a continuación.

TABLA 3

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KFCC10881	43,2	42,5	42,5
KFCC10881-ddhP1	44,2	44,2	44,1

*** Medio de siembra (II) (pH 7,0)**

20 g de azúcar sin refinar, 10 g de peptona, 5 g extracto de levadura, 1,5 g de urea, 4 g de KH₂PO₄, 8 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄ 7 H₂O, 100 μ g de biotina, 1.000 μ g de tiamina HCl, 2.000 μ g de pantotenato de calcio, 2.000 μ g de nicotinamida (por litro de agua destilada)

*** Medio de producción (pH 7,0)**

100 g de glucosa, 40 g de (NH₄)₂SO₄, 2,5 g de proteína de soja, 5 g de sólidos de fermentado de maíz, 3 g de urea, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄ 7 H₂O, 100 μ g de biotina, 1.000 μ g de cloruro de tiamina, 2.000 μ g de pantotenato de calcio, 3.000 μ g de nicotinamida, 30 g de CaCO₃ (por litro de agua destilada)

Como se observa en la Tabla 3, se encontró que *Corynebacterium glutamicum* KFCC-ddhP1, con una actividad de diaminipimelato deshidrogenasa aumentada 23 veces, aumentaba la productividad de lisina en aproximadamente un 3 %, en comparación con la cepa madre KFCC10881.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

10 <120>- Promotor mejorado y método para la producción de L-lisina mediante el uso del mismo

<130> OPA09004

<150> KR10-2008-0010073

15 <151> 31-01-2008

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

20 <210> 1

<211> 603

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

25 <220>

<221> gene

<222> (1)..(603)

<223>promotor de ddh y alguna parte de gen de ddh

30 <400> 1

```

gccgtgctg gcgagtttta caaagaacct cacatcatca atgcctaaat ggcgggtatt      60
ttcatccaaa cccaaccgcg catcattcca atgctgatcc accccatccg gataaaccac      120
catgaacggc aacggatcaa aagtcctgtt ggtgaagctg cgccccacag atcctgactg      180
ctgggagcca tgaaaataga tcagcgcata cgtgggtggaa ccaaaggct caacaatacg      240
aaacgttcgc tttcggtcct gatgaaagag atgtccctga atcatcatct aagtatgcat      300
ctcggtaagc tcgaccagga cagtgccacc acaattttgg aggattacaa gaacatgacc      360
aacatccgcg tagctatcgt gggctacgga aacctgggac gcagcgtcga aaagcttatt      420
gccaagcagc ccgacatgga ccttgtagga atcttctcgc gccggggccac cctcgacaca      480
aagacgccag tctttgatgt cgccgacgtg gacaagcacg ccgacgacgt ggacgtgctg      540
ttcctgtgca tgggctccgc caccgacatc cctgagcagg caccaaagtt cgcgagttc      600
gcc                                                                                   603
    
```

35 <210> 2

<211> 603

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

40 <220>

<221> gene

<222> (1)..(603)

<223> promotor de ddhP1 y alguna parte de gen de ddh

45 <400> 2

ES 2 597 877 T3

gccgtgctg gcgagtttta caaagaaccc cacatcatca atgcctaaat ggcggtatt 60
 ttcattcaaaa cccaaccgcg catcattcca atgctgatcc accccatccg gataaaccac 120
 catgaacggc aacggatcaa aagtcctggt ggtgaagctg cgccccacag atcctgactg 180
 ctgggagcca tgaaaataga tcagcgcate cgtggtggaa ccaaaaggct caacaatagc 240
 aaacgttcgc tttcggtcct gatgaaagag atgtccctga atcatcatct aagtatgcat 300
 tgtgtaagc tcgaccagga cagtgccacc acaattttgg aggattacaa gaacatgacc 360
 aacatccgcg tagctatcgt gggctacgga aacctgggac gcagcgtcga aaagcttatt 420
 gccaagcagc ccgacatgga ccttgtagga atcttctcgc gccgggccac cctcgacaca 480
 aagacgccag tctttgatgt cgccgacgtg gacaagcacg ccgacgacgt ggacgtgctg 540
 ttcctgtgca tgggctccgc caccgacatc cctgagcagg caccaaagtt cgcgagttc 600
 gcc 603

5 <210> 3
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador ddh/PF

<400> 3
 ccgggatcc tctagatgc gtggcgagt ttacaaag 38

15 <210> 4
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador ddh/PR

25 <400> 4
 gcaggtcgac tctagaggcg aactgcgca actttgg 37

30 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador ddh/P1F

35 <400> 5
 tatgcattgt ggtaagctg 20

40 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador ddh/P1R

45 <400> 6
 cgagctfacc acaatgcata 20

50 <210> 7
 <211> 15
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador ddh/P1mut

5

<400> 7

ctaagtatgc attgt

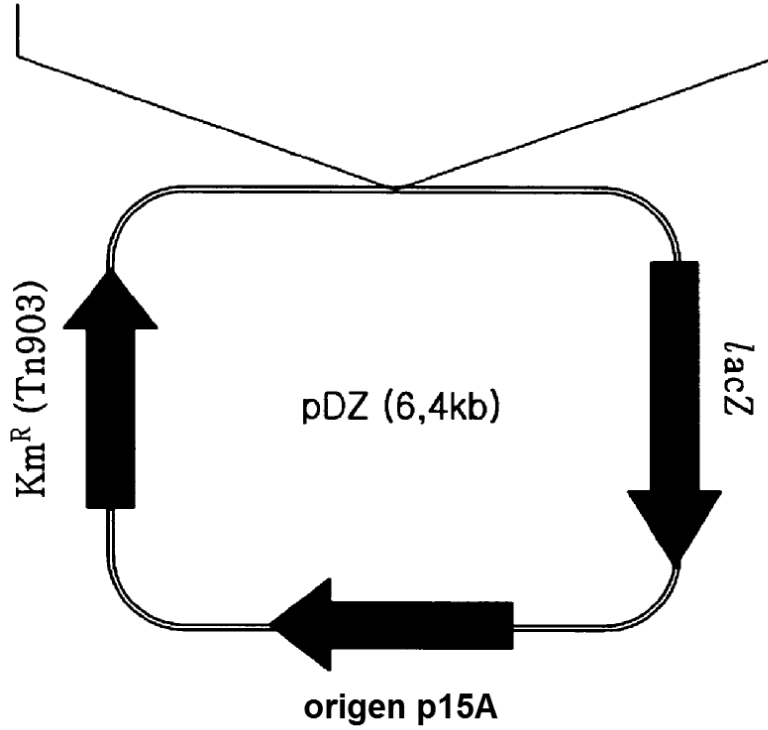
15

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico, que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO. 2, que está unida operativamente a un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa.
5
2. Un vector, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
3. Un transformante, portador del vector de acuerdo con la reivindicación 2.
- 10 4. El transformante de acuerdo con la reivindicación 3, perteneciente al género *Corynebacterium* o al género *Brevibacterium*.
- 15 5. El transformante de acuerdo con la reivindicación 3, que se ha denominado CA01-0136 depositado en el KCCM con el número de acceso KCCM10920P.
6. El transformante de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 está incorporada en un genoma del transformante a través de una recombinación homóloga.
- 20 7. El transformante de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, portador de la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 en forma de un plásmido.
- 25 8. Un método para la producción de lisina, que comprende la fermentación del transformante de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, y que comprende adicionalmente la recolección de la lisina producida.

[Fig. 1]

*Bam*HI *Eco*RI *Eco*RV *Kpn*I *Sac*I *Sal*I *Xba*I *Hind*III *Nhe*I



[Fig. 2]

