

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 128**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12P 13/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2011 PCT/KR2011/005252**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2012 WO12008810**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2011 E 11791415 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2430152**

54 Título: **Microorganismo con productividad potenciada de L-lisina y procedimiento de producción de L-lisina usando el mismo**

30 Prioridad:

**15.07.2010 KR 20100068618**  
**01.07.2011 KR 20110065694**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.02.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LIM, SANG JO;**  
**MOON, JUN OK;**  
**KIM, HYUNG JOON;**  
**JANG, JAE WOO y**  
**CHO, JAE YONG**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 603 128 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Microorganismo con productividad potenciada de L-lisina y procedimiento de producción de L-lisina usando el mismo

### Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un microorganismo con productividad alta de L-lisina y un procedimiento para producir L-lisina usando el mismo.

### Técnica anterior

10 La L-lisina se sintetiza a partir de ácido oxaloacético mediante la ruta biosintética de lisina. Las enzimas importantes para la biosíntesis de L-lisina son aspartato semialdehído deshidrogenasa, dihidrodipicolinato reductasa y diaminopimelinato deshidrogenasa, que están codificadas respectivamente por los genes *asd*, *dapB* y *ddh*, y que son reductasas dependientes de NADPH que median partes de la ruta biosintética de lisina. En esta ruta, la producción de una molécula de L-lisina requiere directamente el consumo de tres moléculas de NADPH por las enzimas y una molécula de NADPH indirectamente. La correlación directa entre la regeneración de NADPH y la biosíntesis de L-lisina en la célula de *Corynebacterium glutamicum* se presentó previamente (Wittmann y Heinzle, Microbiol 68:5843-5849, 2002; Marx y col., J Biotechnol 104:185-197, 2003; Ohnishi y col., Microbiol Lett 242:265-274, 2005).

15 En *Corynebacterium*, las rutas principales de suministro de NADPH son el ciclo TCA y la ruta de pentosa fosfato. Se prefiere que la energía reductora necesaria para la producción de L-lisina se suministre mediante la ruta de oxidación de la ruta de pentosa fosfato. La ruta de pentosa fosfato es económicamente más beneficiosa en términos de rendimiento de metabolismo de carbono porque la operación de dos ciclos de la ruta de pentosa fosfato libera una molécula de CO<sub>2</sub> con la producción concomitante de dos moléculas de NADPH mientras que se liberan dos moléculas de CO<sub>2</sub> por un ciclo TCA, con la producción concomitante de una molécula NADPH. Por tanto, un mayor rendimiento de L-lisina requiere un mayor suministro de NADPH, provocando mayor dependencia de la ruta de pentosa fosfato.

20 La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), ambas implicadas en la ruta de pentosa fosfato, se informaron asociadas con la producción de L-lisina (Marx y col., Biotechnol Bioeng 56:168-180, 1997; Wittmann y Heinzle, Microbiol 68:5843-5849, 2002).

25 En cepas de *Corynebacterium* productoras de L-aminoácidos, cuando los genes que codifican enzimas responsables para la producción de NADPH en la ruta de pentosa fosfato están potenciadas o cuando las enzimas están mutadas, se informó de que la productividad del L-aminoácido estaba aumentada. Por ejemplo, J. Becker y col., informaron de que la provisión de un promotor más fuerte para el gen *zwf* que codifica G6PDH en *C. glutamicum* productora de L-lisina conseguía un aumento significativo en la producción de lisina (J. Becker y col., J Biotechnol 132: 99-109, 2007). La patente europea n.º 1302537 divulga un procedimiento para producir L-aminoácidos cultivando corinebacterias productoras de L-aminoácidos en un gen que codifica un mutante de 6PGD que se ha introducido.

30 Un microorganismo de *Corynebacterium sp.* en que la biosíntesis de NADPH en la ruta de pentosa fosfato estaba aumentada por atenuación de la actividad de la gluconato quinasa (GntK) endógena de *Corynebacterium*, sin embargo, no se ha divulgado en los informes previos.

### Divulgación de la invención

#### Problema técnico

40 Conduciendo a la presente invención, la investigación intensiva y minuciosa, realizada por los presentes inventores, dirigida a encontrar un procedimiento para la producción de L-lisina a una alta eficacia y rendimiento, produjo el descubrimiento de que un aumento en la producción de NADPH por modificación genética en la ruta oxidativa de pentosa fosfato puede aumentar el rendimiento de L-lisina.

#### Solución al problema

45 Para resolver dicho problema técnico, los inventores han desarrollado un microorganismo productor de L-lisina que tiene actividad gluconato quinasa (GntK) debilitada en comparación con la actividad endógena y un procedimiento para producir el microorganismo productor de L-lisina, que comprende: construir un fragmento polinucleotídico que codifica gluconato quinasa (GntK) que tienen una actividad debilitada mutando completa o parcialmente dicho polinucleotídico; insertar el fragmento polinucleotídico en un vector para producir un vector recombinante, siendo capaz dicho vector de recombinación homóloga con un cromosoma en una célula huésped; introducir el vector recombinante en una célula huésped capaz de producir L-lisina para formar recombinantes homólogos; y seleccionar una cepa que tenga actividad GntK debilitada en comparación con la actividad endógena de la misma, a partir de los recombinantes homólogos.

5 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir L-lisina, que comprende: cultivar el microorganismo de la presente invención que tiene la actividad de una gluconato quinasa (GntK) debilitada en comparación con la actividad endógena de la misma en *Corynebacterium spp.* de tipo silvestre, en la que la GntK tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, para obtener un cultivo celular; y recoger L-lisina del cultivo celular o el microorganismo, en el que la actividad GntK está debilitada por delección completa o parcial, sustitución o inserción parcial:

- en un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa o
- en un elemento regulador para un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa.

10 Otro objetivo de la invención es usar el microorganismo de la presente invención que tiene actividad gluconato quinasa (GntK) debilitada en comparación con la actividad endógena para producir L-lisina, en el que la actividad GntK está debilitada por delección completa o parcial, sustitución o inserción parcial:

- en un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa o
- en un elemento regulador para un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa.

### **Efectos ventajosos de la invención**

15 La presente invención puede producir L-aminoácidos que necesitan NADPH para su biosíntesis a alta eficacia y rendimiento, especialmente L-lisina, aumentando el nivel intracelular de NADPH en cepas de *Corynebacterium*.

### **Breve descripción de los dibujos**

Los objetivos anteriores y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en que:

20 La FIG. 1 es un diagrama esquemático que ilustra la ruta de pentosa fosfato en *Corynebacterium glutamicum*;  
La FIG. 2 es un diagrama esquemático que ilustra el vector pDZ-ΔNCgl2399 para delección sin marcador del gen cromosómico NCgl2399 de *Corynebacterium*; y  
La FIG. 3 es un diagrama esquemático que ilustra el vector pDZ-ΔNCgl2905 para delección sin marcador del gen cromosómico NCgl2905 de *Corynebacterium*.

### **Mejor modo para realizar la invención**

De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención proporciona un procedimiento para producir L-lisina, que comprende las etapas de: 1) cultivar un microorganismo productor de L-lisina que pertenece a *Corynebacterium spp.*, que tiene la actividad de una gluconato quinasa (GntK) debilitada en comparación con la actividad endógena de la misma en *Corynebacterium spp.* de tipo silvestre, en la que la GntK tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, para obtener un cultivo celular; y 2) recoger L-lisina del cultivo celular o el microorganismo, en la que la actividad GntK está debilitada por delección completa o parcial, sustitución o inserción parcial:

- en un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa o
- en un elemento regulador para un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa.

35 De acuerdo con otro aspecto de la misma, la invención proporciona el uso de un microorganismo que pertenece a *Corynebacterium spp.*, que tiene la actividad de una gluconato quinasa (GntK) debilitada en comparación con la actividad endógena de la misma en *Corynebacterium spp.* de tipo silvestre, en la que GntK tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, para producir L-lisina, en la que la actividad GntK está debilitada por delección completa o parcial, sustitución o inserción parcial:

- en un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa o
- en un elemento regulador para un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa.

40 La L-lisina es un α-aminoácido básico con la fórmula química  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ . Es un aminoácido esencial, lo que significa que el organismo humano no puede sintetizarlo. La L-lisina se sintetiza a partir de ácido oxaloacético mediante la ruta de biosíntesis de lisina, una parte de la cual está catalizada por reductasas dependientes de NADPH. La biosíntesis de una molécula de L-lisina a través de esta ruta requiere el consumo directo de tres moléculas de NADPH por las enzimas, con el uso indirecto de una molécula de NADPH.

45 La expresión "gluconato quinasa (GntK)", como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima que está implicada en la ruta de GntK que produce ácidos 6-fosfogluconico, un intermedio en el proceso oxidativo de la ruta de pentosa fosfato en microorganismos. Los microorganismos de *Corynebacterium spp.* ejecutan ambas rutas, es decir, las rutas de G6PDH y GntK, para sintetizar ácidos 6-fosfogluconico, un intermedio de la ruta de pentosa fosfato (FIG. 1), lo que significa que los microorganismos de *Corynebacterium spp.* pueden degradar parcialmente glucosa mediante la ruta de GntK. En la suposición de que el bloqueo de la ruta de GntK puede interrumpir la provisión de carbono al ácido 6-fosfogluconico y convertir el flujo de carbono desde el ácido 6-fosfogluconico en el proceso de oxidación de la ruta de pentosa fosfato, los presentes inventores sugieren que el bloqueo de la ruta de

GntK da lugar a un aumento específico en la actividad de 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), aumentando de ese modo la regeneración de NADPH. En este contexto, la actividad de la enzima que se supone que actúa como gluconato quinasa (GntK) en microorganismos está debilitada.

5 En el procedimiento y en el uso de la invención, la gluconato quinasa (GntK) puede comprender adicionalmente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Preferentemente, la enzima que tiene actividad gluconato quinasa (GntK) representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 puede ser NCgl2399 y la enzima que tiene actividad gluconato quinasa (GntK) representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 puede ser NCgl12905.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad endógena" pretende indicar la actividad de una enzima en un microorganismo nativo, y particularmente cuando se usa en combinación con GntK, se refiere a la actividad de GntK que muestra un microorganismo nativo.

15 La expresión "debilidad de actividad endógena" se consigue en un cromosoma que contiene un polinucleótido que codifica una proteína endógena en un microorganismo, por un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en una deleción completa o parcial de la secuencia polinucleotídica, sustitución parcial de la secuencia polinucleotídica o inserción de al menos un par de bases en la secuencia polinucleotídica. Además, la actividad endógena puede debilitarse mutando un elemento regulador para la secuencia polinucleotídica, donde la mutación se consigue por deleción, sustitución o inserción completa o parcial del elemento regulador. El elemento regulador que se muta puede estar cadena arriba o cadena abajo de la secuencia polinucleotídica en un cromosoma, preferentemente, el elemento regulador puede ser un promotor, potenciador y lo demás, pero la presente invención no está limitada a ellos. La mutación del polinucleótido puede conseguirse usando un procedimiento bien conocido, tal como recombinación homóloga.

20 La expresión "la actividad de gluconato quinasa (GntK) debilitada en comparación con la actividad endógena", como se usa en el presente documento, pretende indicar que la actividad GntK está regulada negativamente por mutación genética tal como alteración y por tanto se vuelve inferior que la actividad endógena de la enzima en un microorganismo nativo. En una realización de la presente invención, la presente invención proporciona microorganismos de *Corynebacterium spp.* con productividad potenciada de L-lisina alterando la actividad GntK mediante la introducción de un vector recombinante representado por el mapa de escisión en la FIG. 2 o 3.

30 Cuando hay dos o más genes cromosómicos que codifican proteínas que tienen actividad gluconato quinasa y que tienen diferentes secuencias de aminoácidos entre sí, la actividad GntK endógena puede debilitarse por deleción, sustitución o inserción completa o parcial en al menos uno de los genes cromosómicos. Y la actividad GntK endógena puede debilitarse por deleción completa o parcial, sustitución o inserción parcial en un elemento regulador para al menos uno de los genes cromosómicos.

35 Preferentemente, puede permitirse que suceda una mutación por deleción, sustitución o inserción de nucleótidos en un gen que codifica NCgl2399 o NCgl2905, o uno cualquiera o ambos de los genes que tienen secuencias nucleotídicas de las SEQ ID NOS: 3 y 4 que codifican respectivamente NCgl2399 y NCgl2905, o en elementos reguladores de los mismos, de modo que GntK no funcione normalmente.

40 En la presente invención, un microorganismo con actividad gluconato quinasa debilitada en comparación con la actividad endógena del mismo puede prepararse introduciendo un vector recombinante que porta una parte del gen que codifica gluconato quinasa en el mismo para deleccionar o mutar el gen endógeno de gluconato quinasa del mismo. La inserción del gen parcial en el cromosoma puede conseguirse usando un procedimiento bien conocido, tal como recombinación homóloga.

45 La expresión "vector recombinante", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a un vector que no puede replicarse por separado del cromosoma de una célula huésped y normalmente significa una construcción genética que comprende elementos esenciales que permiten la recombinación homóloga de un gen foráneo con el cromosoma. El vector recombinante puede portar un gen de resistencia a antibióticos y un gen de selección tal como el gen de levansacarasa (*sacB*). Preferentemente, los vectores recombinantes representados por los mapas de escisión de las FIG. 2 y 3 pueden emplearse en la presente invención.

50 Siempre que pueda producirse L-lisina, puede usarse cualquier cepa sin limitación en cuanto a la célula huésped en que se introduce el vector recombinante. Se prefiere los microorganismos de *Corynebacterium spp.* o *Brevibacterium spp.* Ejemplos de células huésped útiles en la presente invención incluyen *C. glutamicum* ATCC13032, *C. termoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, y *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, y mutantes productores de L-aminoácidos o cepas derivadas de los mismos, tales como *C. glutamicum* KFCC10881, *C. glutamicum* KFCC11001 y *C. glutamicum* KCCM10770P. Se prefiere *C. glutamicum* KFCC10881. En una realización de la presente invención, se empleó *C. glutamicum* KFCC10881 pero la presente invención no está limitada a la misma.

55 En una realización de la presente invención, se utilizó el vector pDZ (divulgado en la patente coreana n.º 0924065), que puede realizar la deleción sin marcador de un gen diana en *C. Glutamicum* sin replicación, para deleccionar los

genes. Es decir, se construyó un vector recombinante que porta una parte del gen que codifica NCgl2399 o NCgl2905, se transformó en una cepa de *Corynebacterium* productora de L-lisina y se permitió que realizara recombinación homóloga con el genoma para preparar la cepa de *Corynebacterium* productora de L-lisina que tiene actividad gluconato quinasa debilitada.

- 5 En la presente invención, una parte de un gen que codifica NCgl2399 se insertó en un vector pDZ para construir un vector recombinante, llamado pDZ-ANCgl2399, que después se transformó en una cepa de *Corynebacterium*. La cepa de *Corynebacterium* recombinante resultante en que estaba alterado el gen cromosómico que codifica NCgl2399 se llamó KFCC10881-ΔNCgl2399. Por separado, se transformó un vector pDZ recombinante que porta una parte de un gen que codifica NCgl2905, llamado pDZ-ANCgl2905, en una cepa de *Corynebacterium*. La cepa recombinante resultante en que estaba alterado el gen cromosómico que codifica NCgl2905 se llamó KFCC10881-ΔNCgl2905. Además, KFCC10881-ΔNCgl2399 se transformó con el plásmido recombinante pDZ-ΔNCgl2905 para proporcionar una cepa mutante que era deficiente en los genes NCgl2399 y también NCgl2905. La cepa se llamó *C. glutamicum* CA01-0892 y se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms el 24 de junio de 2010, con el n.º de acceso KCCM 11085P.
- 10
- 15 Además, en una realización de la presente invención, se evaluaron las cepas de *C. Glutamicum* recombinantes para la actividad gluconato quinasa intracelular y el nivel de NADPH. La actividad GntK intracelular de la cepa que es deficiente en el gen NCgl2399 y la cepa que es deficiente en el gen NCgl2399 y también NCgl2905 se observó que había disminuido en comparación con la cepa precursora. Además, se observó que el nivel de NADPH intracelular y la actividad 6PGD habían aumentado en comparación con la cepa precursora (Tabla 2). Por consiguiente, se observó que el rendimiento de la producción de L-lisina de las cepas preparadas había aumentado en comparación con la cepa precursora (Tabla 3).
- 20

Estos resultados demuestran que la atenuación de la actividad gluconato quinasa por debajo de la actividad endógena aumenta la actividad 6PGD, que tiene un efecto positivo sobre la generación de NADPH, provocando de ese modo la producción de L-lisina a alta eficacia y rendimiento. Además, en el caso en que una proteína que tiene actividad gluconato quinasa está codificada por dos o más genes diferentes, una productividad mayor de L-lisina puede obtenerse delecionando dos o más de los genes. Por lo tanto, los microorganismos productores de L-lisina de la presente invención pueden usarse para producir L-lisina a alta eficacia y rendimiento.

25

Como se usa en el presente documento, el término "cultivar" significa permitir que los microorganismos crezcan en condiciones artificialmente controladas. Pueden emplearse diversos procedimientos bien conocidos en la técnica para cultivar los recombinantes de la presente invención. Las células pueden cultivarse en un proceso discontinuo o en un proceso continuo tal como un proceso de alimentación por lotes o un proceso de alimentación repetida por lotes, pero la presente invención no está limitada a los mismos.

30

Para su uso en el cultivo, un medio debe satisfacer las necesidades de la cepa empleada. Los medios de cultivo adecuados para su uso en el cultivo de cepas de *Corinebacterias* son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Bacteriology, Washington D.C., EE.UU., 1981). Las fuentes de carbono de los medios de cultivo pueden ser sacáridos y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; aceites y lípidos tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete o aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estos materiales pueden usarse por separado o en combinación. Ejemplos de una fuente de nitrógeno útil para cultivar los recombinantes incluyen peptona, extracto de levadura, caldo, extracto de malta, licor de macerado del maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse por separado o en combinación. Entre las fuentes de fósforo útiles en los medios de cultivo están hidrogenofosfato de dipotasio, hidrogenofosfato de potasio y sales sódicas correspondientes. Además, los medios de cultivo pueden contener sales de metales esenciales para el crecimiento de las células y pueden suplementarse con nutrientes esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Además, pueden añadirse precursores apropiados a los medios de cultivo. Los nutrientes o suplementos pueden añadirse juntos una vez o por separado durante el cultivo.

35

40

45

El pH de los medios de cultivo puede ajustarse con un compuesto básico tal como hidróxido sódico, hidróxido potásico o amoníaco o un compuesto ácido tal como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. La generación de espuma en los medios de cultivo puede restringirse usando un agente antiespuma tal como poliglicol éster de ácido graso. Los medios de cultivo pueden mantenerse en condiciones aeróbicas introduciendo oxígeno o un gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) a los mismos. La temperatura de cultivo es normalmente entre 20 y 45 °C y preferentemente entre 25 y 40 °C. El cultivo se continúa hasta que se produzca una cantidad máxima de L-aminoácido. A este respecto, puede conseguirse en 10 a 160 h. Después de producirse, la L-lisina puede exportarse al medio de cultivo o puede permanecer dentro de las células.

50

55

El procedimiento y uso de la invención para la producción de L-lisina comprende recoger lisina de las células o el cultivo celular. La L-lisina puede aislarse de los medios de cultivo o células usando un procedimiento bien conocido. Ejemplos del procedimiento de aislamiento útil en la presente invención incluyen centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización y HPLC, pero no está limitado a los mismos.

60

**Modo para la invención**

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

**Ejemplo 1: Preparación de cepas mutantes por alteración génica específica de sitio**

- 5 Para su uso en la preparación de las cepas recombinantes KFCC10881- $\Delta$ NCgl2399 y KFCC10881- $\Delta$ NCgl2905, se diseñaron cebadores. Para comenzar, se obtuvieron las secuencias de NCgl2399 (SEQ ID NO: 1) y NCgl2905 (SEQ ID NO: 2) del NIH GenBank. Sobre la base de estas secuencias, se sintetizaron los cebadores 2399F1, 2399F2, 2399R1, 2399R2, 2905F1, 2905F2, 2905R1, y 2905R2 (Tabla 1) que se usarían en la construcción de fragmentos de inactivación de NCgl2399 o NCgl2905. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores usados en la presente  
10 invención, junto con sus SEQ ID NO., se resumen en la Tabla 1 en la que están subrayados los sitios de restricción.

[Tabla 1]

Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
2399F1	<u>gctctaga</u> CCCCAGAACATGCTGACG(XbaI)	5
2399R1	ggggtaccCGCTGCTAGGGCTTTACC(KpnI)	6
2399F2	<u>ggggtacc</u> GGAACCGTCTTCGTCCACC(KpnI)	7
2399R2	<u>gctctaga</u> GTCACCGCTGGTACATCC(XbaI)	8
2905F1	<u>gctctaga</u> CATTGGAGCATCCGTAGC(XbaI)	9
2905R1	tccccgggGCCTTCACCATCGACCAA(SmaI)	10
2905F2	tccccgggGTTCCCGAACAGATCCCC(SmaI)	11
2905R2	<u>gctctaga</u> CGCTCTGACCTGCCTAAC(XbaI)	12

- 15 Se realizó alteración génica específica de sitio con pDZ, que es incapaz de replicarse en *C. glutamicum*. Para su uso en la preparación de cepas mutantes de gen alterado, se construyeron derivados de pDZ que portaban las respectivas fases de lectura abierta internamente deficientes de NCgl2399 y NCgl2905. Los derivados de pDZ son pDZ- $\Delta$ NCgl2399 (FIG. 2) y pDZ- $\Delta$ NCgl2905 (FIG. 3). pDZ- $\Delta$ NCgl2399 porta un extremo XbaI y un gen interno deficiente en el sitio KpnI de una longitud de 2.267 pb de NCgl2399. El gen interno deficiente en NCgl2399 se generó usando PCR de extensión solapante en presencia de los cebadores 2399F1-2399R1 (SEQ ID NO: 5 y 6) y 2399F2-2399R2 (SEQ ID NO: 7 y 8), con el ADN genómico de *C. glutamicum* ATCC13032 sirviendo como molde.

- 20 pDZ- $\Delta$ NCgl2905 porta un extremo XbaI y un gen interno deficiente en el sitio SmaI de 2.819 pb de longitud de NCgl2905. El gen interno deficiente de NCgl2905 se generó usando PCR de extensión solapante en presencia de los cebadores 2905F1-2905R1 (SEQ ID NO: 9 y 10) y los cebadores 2905F2-2905R2 (SEQ ID NO: 11 y 12), con el ADN genómico de *C. glutamicum* ATCC13032 sirviendo como molde.

- 25 Los plásmidos recombinantes se transformaron en *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre usando electroporación (van der Rest y col., Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999) y se incorporaron en el cromosoma por recombinación primaria (entrecruzamiento). Después, los plásmidos se escindieron de los cromosomas por recombinación secundaria (entrecruzamiento) en una placa de agar que contenía sacarosa al 10 %.

- 30 Usando los pares de cebadores específicos de gen 2399F1-2399R2 (SEQ ID NO: 5 y 8) y 2905F1-2905R2 (SEQ ID NO: 9 y 12), se realizó PCR de diagnóstico sobre el ADN genómico de los recombinantes de *C. glutamicum* en que estaba completada la recombinación secundaria, confirmando que los recombinantes de *C. glutamicum* tenían los genes NCgl2399 y NCgl2905 deficientes, respectivamente. Estas cepas recombinantes se llamaron KFCC10881- $\Delta$ NCgl2399 y KFCC10881- $\Delta$ NCgl2905, respectivamente. Las secuencias de ADN de la fase de lectura abierta de NCgl2399 y NCgl2905 se refieren al n.º de acceso a GenBank NC\_003450.

**Ejemplo 2: Preparación de cepa mutante deficiente en ambos genes NCgl2399 y NCgl2905**

- 35 La cepa recombinante KFCC10881- $\Delta$ NCgl2399 se transformó con el plásmido recombinante pDZ- $\Delta$ NCgl2905 usando electroporación y se trató del mismo modo que el ilustrado anteriormente para dar una nueva cepa recombinante que era deficiente en ambos genes NCgl2399 y NCgl2905. Esta cepa mutante se llamó *C. glutamicum* CA01-0892 y se depositó en la Korean Culture Center of Microorganisms el 24 de junio de 2010, con el n.º de acceso KCCM 11085P.

**Ejemplo 3: Ensayo para actividad GntK y 6PGD intracelular y el nivel de NADPH**

Se ensayaron las cepas productoras de L-lisina *C. glutamicum* KFCC-10881- $\Delta$ NCgl2399, KFCC-10881- $\Delta$ NCgl2905 y CA01-0892 (KFCC-10881- $\Delta$ NCgl2399 $\Delta$ NCgl2905), preparadas en los Ejemplos 1 y 2, para la actividad gluconato quinasa intracelular y los niveles de NADPH del siguiente modo.

La cepa precursora *C. glutamicum* KFCC-10881 y las tres cepas recombinantes se inocularon en respectivos matraces de 250 ml con deflector curvado que contenían 25 ml del siguiente medio complejo y se cultivaron a 30 °C con agitación a 200 r.p.m. Las células en la fase exponencial se recogieron por centrifugación y se suspendieron en tampón Tris/HCl 100 mM (pH 7,5). Las células se alteraron usando perlas de vidrio, seguido por centrifugación del liado celular para obtener un sobrenadante.

<Medio complejo (pH 7,0)>

Glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g, biotina 100 µg, tiamina HCl 1000 µg, pantotenato de calcio 2000 µg, nicotinamida 2000 µg (en 1 litro de agua destilada).

Los sobrenadantes se analizaron cuantitativamente para los contenidos de proteína total por un procedimiento de Bradford. La actividad 6PGD se determinó usando absorbancia a 340 nm para NADPH (Frunzke y col., Mol Microbiol 67:305-322, 2008). La actividad GntK se midió por el ensayo enzimático acoplado para 6PGD (Frunzke y col., Mol Microbiol 67:305-322, 2008). Los niveles de NADPH se determinaron por una reacción cíclica enzimática con la ayuda del kit de ensayo de NADP+/NADPH EnzyChrom™ (BioAssay Systems, CA, EE.UU.).

Como puede verse en la Tabla 2, la actividad GntK intracelular (EC:2.7.1.12) de KFCC-10881-ΔNCgl2399, que era deficiente en el gen NCgl2399 se disminuyó en aproximadamente un 58,7 % pero había un aumento de 2,4 veces en la actividad 6PGD, en comparación con la cepa precursora (KFCC10881). La actividad GntK de CA01-0892, deficiente en ambos genes NCgl2399 y NCgl2905, se disminuyó en aproximadamente un 78,3 %, pero hubo un aumento de 5,1 veces en la actividad 6PGD, en comparación con la cepa precursora (Tabla 2).

Como resultado del cambio de actividad enzimática, también se observó que el nivel de NADPH intracelular de CA01-0892 se aumentaba en hasta un 170 %. Estos datos son promedios de las mediciones de al menos tres cultivos independientes, con desviaciones típicas menores del 10 % en todos los casos. Los resultados indican que la atenuación de la actividad gluconato quinasa por debajo de la actividad endógena aumenta la actividad 6PGD, que tienen un efecto positivo sobre la generación de NADPH.

25

[Tabla 2]

Cepa	Enzima	Actividad específica (U mg proteína <sup>-1</sup> )	
		GntK	6PGD
KFCC-10881		0,46	0,99
KFCC-10881-ΔNCgl2399		0,19	2,4
CA01-0892 (KFCC-10881-ΔNCgl2399ΔNCgl2905)		0,10	5,1

#### Ejemplo 4: Producción de lisina en cepas deficientes en los genes NCgl2399 y NCgl2905

Para producir L-lisina, se cultivaron las cepas productoras de L-lisina *C. glutamicum* KFCC-10881-ΔNCgl2399, KFCC-10881-ΔNCgl2905 y CA01-0892 (KFCC-10881-ΔNCgl2399ΔNCgl2905), preparadas en los Ejemplos 1 y 2, del siguiente modo.

La cepa precursora *C. glutamicum* KFCC-10881, y las tres cepas recombinantes se inocularon en matraces de 250 ml con deflector curvado que contenían 25 ml del siguiente medio de siembra y se cultivaron a 30 °C durante 20 horas con agitación a 200 r.p.m. Después de ello, se inoculó 1 ml de cada uno de los cultivos en un matraz de 250 ml con deflector curvado que contenía 24 ml del siguiente medio de producción y se cultivaron a 30 °C durante 120 horas con agitación a 200 r.p.m. El medio de siembra y el medio de producción comprenden las siguientes composiciones.

<Medio de siembra (pH 7,0)>

Glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g, biotina 100 µg, tiamina HCl 1000 µg, pantotenato de calcio 2000 µg, nicotinamida 2000 µg (en 1 litro de agua destilada).

<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, sólidos de macerado del maíz 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, cloruro de tiamina 1000 µg, pantotenato de calcio 2000 µg, nicotinamida 3000 µg y CaCO<sub>3</sub> 30 g (en 1 litro de agua destilada).

Después de completarse el cultivo, se realizó análisis por HPLC para determinar las cantidades de L-lisina producidas por las cepas. Las concentraciones de L-lisina en los cultivos de *C. glutamicum* KFCC-10881, KFCC-

10881- $\Delta$ NCgl2399, KFCC-10881- $\Delta$ NCgl2905 y CA01-0892(KFCC-10881- $\Delta$ NCgl2399 $\Delta$ NCgl2905) se resumen en la Tabla 3, a continuación.

[Tabla 3]

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KFCC-10881	42,1	42,6	42,4
KFCC-10881- $\Delta$ NCgl2399	44,9	45,5	45,2
KFCC-10881- $\Delta$ NCgl2905	46,0	46,2	46,2
CA01-0892 (KFCC-10881- $\Delta$ NCgl2399 $\Delta$ NCgl2905)	48,1	48,7	48,3

5 Como puede verse en la Tabla 3, se encontró que las cepas recombinantes deficientes en el gen NCgl2399 o NCgl2905, aumentaban en productividad de lisina en aproximadamente un 5,9 % y un 8,0 %, respectivamente, en comparación con la cepa precursora KFCC-10881. Además, se midió que un aumento de aproximadamente 13,1 % en la producción de lisina se obtenía con CA01-0892, deficiente en ambos genes NCgl2399 y NCgl2905 en comparación con la cepa precursora (Tabla 3). Estos resultados demuestran que la atenuación de la actividad gluconato quinasa, la actividad endógena, aumenta la actividad 6PGD, que tiene un efecto positivo sobre la generación de NADPH, provocando de ese modo la producción de L-lisina a alta eficacia y rendimiento.

<110> CJ CheilJedang Corporation

15 <120> MICROORGANISMO CON PRODUCTIVIDAD POTENCIADA DE L-LISINA Y PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR L-LISINA USANDO EL MISMO

<130> OPA11076/PCT

20 <150> KR10-2010-0068618  
<151> 15-07-2010

<150> KR10-2011-0065694  
<151> 01-07-2011

25 <160> 12

<170> KopatentIn 1.71

30 <210> 1  
<211> 167  
<212> PRT  
<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

35 <220>  
<221> PÉPTIDO  
<222> (1)..(167)  
<223> gluconato quinasa NCgl2399

40 <400> 1



ES 2 603 128 T3

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

<210> 2  
 <211> 494  
 <212> PRT  
 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

5

<220>  
 <221> PÉPTIDO  
 <222> (1)..(494)  
 <223> gluconato quinasa NCgl2905

10

<400> 2

ES 2 603 128 T3

Met Gly Ser Ile Pro Thr Met Ser Ile Pro Phe Asp Asp Ser Arg Gly  
 1 5 10 15

Pro Tyr Val Leu Ala Met Asp Ile Gly Ser Thr Ala Ser Arg Gly Gly  
 20 25 30

Leu Tyr Asp Ala Ser Gly Cys Pro Ile Lys Gly Thr Lys Gln Arg Glu  
 35 40 45

Ser His Glu Phe Thr Thr Gly Glu Gly Val Ser Thr Ile Asp Ala Asp  
 50 55 60

Gln Val Val Ser Glu Ile Thr Ser Val Ile Asn Gly Ile Leu Asn Ala  
 65 70 75 80

Ala Asp His His Asn Ile Lys Asp Gln Ile Ala Ala Val Ala Leu Asp  
 85 90 95

Ser Phe Ala Ser Ser Leu Ile Leu Val Asp Gly Glu Gly Asn Ala Leu  
 100 105 110

Thr Pro Cys Ile Thr Tyr Ala Asp Ser Arg Ser Ala Gln Tyr Val Glu  
 115 120 125

Gln Leu Arg Ala Glu Ile Asp Glu Glu Ala Tyr His Gly Arg Thr Gly  
 130 135 140

Val Cys Leu His Thr Ser Tyr His Pro Ser Arg Leu Leu Trp Leu Lys  
 145 150 155 160

Thr Glu Phe Glu Glu Glu Phe Asn Lys Ala Lys Tyr Val Met Thr Ile  
 165 170 175

Gly Glu Tyr Val Tyr Phe Lys Leu Ala Gly Ile Thr Gly Met Ala Thr  
 180 185 190

Ser Ile Ala Ala Trp Ser Gly Ile Leu Asp Ala His Thr Gly Glu Leu  
 195 200 205

Asp Leu Thr Ile Leu Glu His Ile Gly Val Asp Pro Ala Leu Phe Gly  
 210 215 220

Glu Ile Arg Asn Pro Asp Glu Pro Ala Thr Asp Ala Lys Val Val Asp  
 225 230 235 240

Lys Lys Trp Lys His Leu Glu Glu Ile Pro Trp Phe His Ala Ile Pro  
 245 250 255

Asp Gly Trp Pro Ser Asn Ile Gly Pro Gly Ala Val Asp Ser Lys Thr  
 260 265 270

Val Ala Val Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ala Met Arg Val Ile Leu Pro  
 275 280 285

Ser Val Pro Glu Gln Ile Pro Ser Gly Leu Trp Cys Tyr Arg Val Ser

	290		295		300														
	Arg	Asp	Gln	Cys	Ile	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Asn	Asp	Val	Gly	Arg	Ala			
	305					310					315				320				
	Val	Thr	Trp	Leu	Glu	Arg	Thr	Ile	Ile	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu	Asp	Glu			
					325					330					335				
	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Pro	Leu	Glu	Gly	Thr	Pro	Ala	Val	Leu	Pro	Phe			
				340					345					350					
	Phe	Ser	Gly	Glu	Arg	Ser	Ile	Gly	Trp	Ala	Ala	Ser	Ala	Gln	Ala	Thr			
			355					360					365						
	Ile	Thr	Asn	Ile	Gln	Glu	Gln	Thr	Gly	Pro	Glu	His	Leu	Trp	Arg	Gly			
							375					380							
	Val	Phe	Glu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	Tyr	Gln	Arg	Val	Trp	Glu	His	Met			
	385					390					395					400			
	Gly	Lys	Ala	Gly	Ala	Ala	Pro	Glu	Arg	Val	Ile	Ala	Ser	Gly	Arg	Val			
					405					410					415				
	Ser	Thr	Asp	His	Pro	Glu	Phe	Leu	Ala	Met	Leu	Ser	Asp	Ala	Leu	Asp			
				420					425					430					
	Thr	Pro	Val	Ile	Pro	Leu	Glu	Met	Lys	Arg	Ala	Thr	Leu	Arg	Gly	Thr			
			435					440					445						
	Ala	Leu	Ile	Val	Leu	Glu	Gln	Leu	Glu	Pro	Gly	Gly	Thr	Arg	Ala	Thr			
			450				455					460							
	Pro	Pro	Phe	Gly	Thr	Thr	His	Gln	Pro	Arg	Phe	Ala	His	His	Tyr	Ser			
	465					470					475					480			
	Lys	Ala	Arg	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Leu	Tyr	Leu	Lys	Leu	Val					
					485					490									

<210> 3  
 <211> 504  
 <212> ADN  
 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

5

<220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(504)  
 <223> secuencia de nucleótidos de gluconato quinasa NCg12399

10

<400> 3

ES 2 603 128 T3

```

atgtcagcag ccgaaggctt acatattgtc gtcattggcg tttctggctg cggcaaatcc      60
tccgtcggta aagccctagc agcggagctc ggaatcgaat acaaagacgg cgacgaactt      120
caccocccagg aaaacatcga caagatggcc tccggccagg cacttgacga cgacgacggt      180
gcatggtggc tagtccaggt tggcaagtgg ctccgcgacc gaccaagcgg cgtcatcgca      240
tgetccgccc tcaagcgtc ctaccgcgat ctctgcgca ccaaatgcc aggaaccgtc      300
ttcgtccacc tccacggcga ctacgatctc ctactttccc gcatgaaggc ccgccaagat      360
cacttcatgc catccacctt gctagattcc caatttcaa cctcgcgacc gctcgaagat      420

gacgaagatg gcaaggtttt cgacgttgcc cacaccatca gcgaactggc cgcccaatct      480
gcagagtggg ttcgcaacaa ataa                                             504

```

```

5      <210> 4
      <211> 1485
      <212> ADN
      <213> Corynebacterium glutamicum ATCC 13032

10     <220>
      <221> gen
      <222> (1)..(1485)
      <223> secuencia de nucleótidos de gluconato quinasa NCgl2905

      <400> 4

```

ES 2 603 128 T3

atgggatcaa ttccaacaat gtccatccct tttgatgact cacgtggacc ttatgtcctt 60  
gctatggata ttggttccac tgcattcacga ggtggacttt atgatgcttc cggetgccca 120  
atcaaaggca ccaagcagcg cgaatcccat gaattcacca ccggtgaggg cgtttccacc 180  
attgatgctg accaggtggt ttoggagatc acctcagtta ttaatggcat tttgaacgcg 240  
gctgatcatc acaacatcaa agatcagatc gccgctgtcg cgctagatte ttttgcatec 300  
tcattaatct tggctgatgg tgaaggcaat gcgctcacc cgtgcattac ctacggggat 360  
tctcgttctg cacagtatgt ggagcagctg cgcgcgaaa tcgatgagga ggcctaccac 420  
ggcgcaccg gcgtctgcct gcacacctcc taccacccat cgcgcctgct gtggctgaaa 480  
actgagttcg aggaagagtt caacaaagcc aagtatgtga tgaccatcgg tgagtacgtc 540  
tacttcaaac ttgcaggcat caccggaatg gctacttoga ttgcgcgtg gagtggcatt 600  
ttggacgcc ataccggcga acttgatctg actatcttgg agcacatcgg tgttgatccg 660  
gctctgttcg gtgagatcag aaacctgat gaaccagcca ccgatgccaa agttgtcgac 720  
aaaaagtgga agcacctgga agaaatccct tggttccatg ccattccaga cggetggcct 780  
tccaacattg gccccaggcg cgtggattct aaaaccgtcg cagtcgccgc cgctacatcc 840  
ggcgccatgc gcgtgatcct tccgagcgtt cccgaacaga tcccctctgg cctgtggtgt 900  
taccgcgtt cccgcgacca gtgcatcgtt ggtggcgcac tcaacgacgt cggacgcgcc 960  
gtcacctggc tggaacgcac cattatcaag cctgaaaacc tcgacgaagt gctgatccgc 1020  
gaaccctcag aaggcaccct agctgtcctg ccgttcttct ccggggaacg ctccatcggc 1080  
tgggcagcct cagcgcaggc cacgatcacc aacattcagg aacaaaccgg ccctgaacac 1140  
ttgtggegcg gcgttttoga agccctcgca ctctcctacc agcgcggttg ggaacacatg 1200  
gggaaagccg gcgcagcccc tgaacgggtc atcgcatcag gacgagtctc caccgaccac 1260  
ccagaattcc tcgogatget ttccgacgce ctcgacacc cagtcatecc tctggaaatg 1320  
aagcgcgcca cctccgcg caccgcactt atcgctcttg agcagctcga accaggcggc 1380  
acgcgcgca cgcaccatt cggcacgacg catcagccgc gctttgcgca ccattactcc 1440

aaggcaagag agctttcga cgcctctac ctcaagttg tctag 1485

5 <210> 5  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> cebador 2399F1

<400> 5  
gctctagacc ccagaacatg ctgacg 26

15 <210> 6  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 603 128 T3

<220>  
 <223> cebador 2399R1  
  
 5 <400> 6  
 ggggtaccgg ctgctagggc ttacc 26  
  
 <210> 7  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador 2399F2  
  
 15 <400> 7  
 ggggtaccgg aaccgtcttc gtccacc 27  
  
 <210> 8  
 <211> 26  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador 2399R2  
  
 25 <400> 8  
 gctctagagt caccgctggt acatcc 26  
  
 <210> 9  
 <211> 26  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador 2905F1  
  
 35 <400> 9  
 gctctagaca ttggagcatc cgtagc 26  
  
 <210> 10  
 <211> 27  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> cebador 2905R1  
  
 <400> 10  
 50 tccccgggg cctcacat cgaccaa 27  
  
 <210> 11  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador 2905F2  
  
 <400> 11  
 60 tccccgggg tccccgaaca gatccc 27  
  
 <210> 12  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 603 128 T3

<220>

<223> cebador 2905R2

5 <400> 12  
gctctagacg ctctgacctg cctaac 26

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de L-lisina, que comprende las etapas de:

- 5 1) cultivar un microorganismo productor de L-lisina que pertenece a *Corynebacterium spp.*, que tiene la actividad de una gluconato quinasa (GntK) debilitada en comparación con la actividad endógena de la misma en *Corynebacterium spp.* de tipo silvestre, en el que la GntK tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, para obtener un cultivo celular; y  
2) recoger L-lisina del cultivo celular o el microorganismo,

en el que la actividad GntK está debilitada por delección completa o parcial, sustitución o inserción parcial:

- 10 - en un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa o  
- en un elemento regulador para un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa.

2. El uso de un microorganismo que pertenece a *Corynebacterium spp.*, que tiene la actividad de una gluconato quinasa (GntK) debilitada en comparación con la actividad endógena de la misma en *Corynebacterium spp.* de tipo silvestre, en el que la GntK tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, para producir L-lisina, en el que la actividad GntK está debilitada por delección completa o parcial, sustitución o inserción parcial:

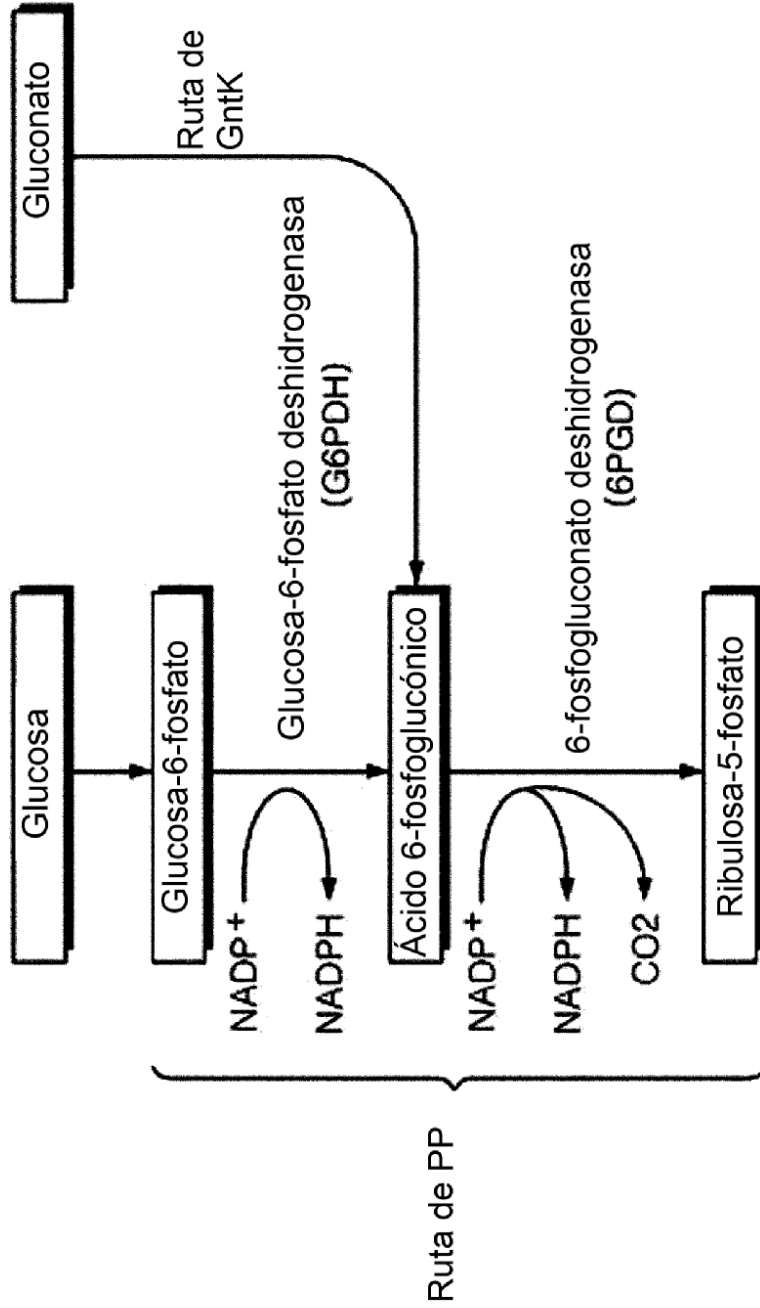
- 15 - en un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa o  
- en un elemento regulador para un gen cromosómico que codifica gluconato quinasa.

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que la gluconato quinasa (GntK) comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

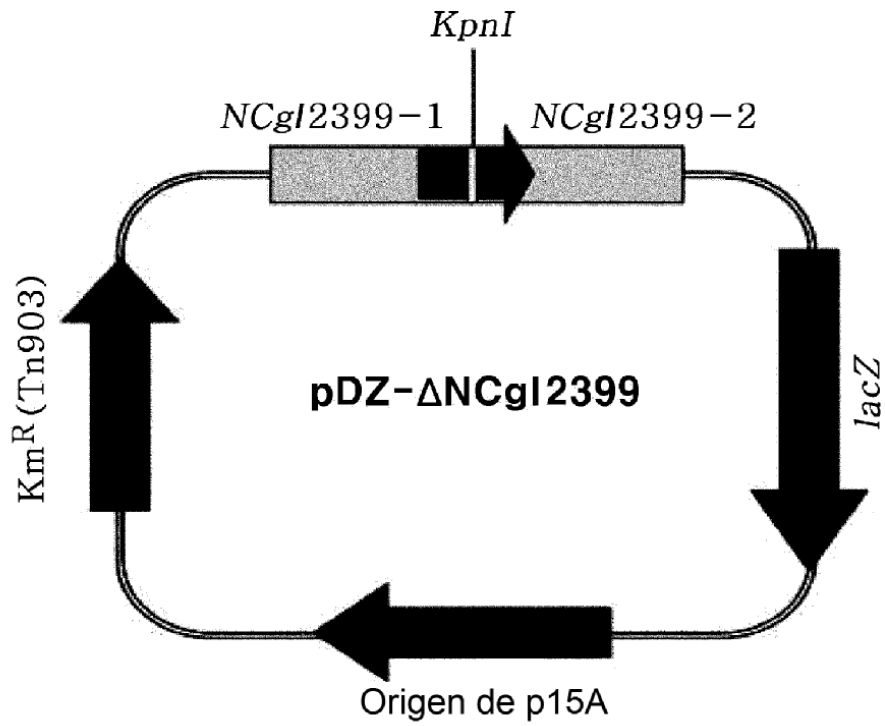
20 4. El procedimiento de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que el microorganismo productor de L-lisina es *Corynebacterium glutamicum* depositado con el n.º de acceso KCCM 11085P.



[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

