

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 048**

51 Int. Cl.:

C12P 13/08 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2014 E 14186238 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2860256**

54 Título: **Procedimiento de producción de L-aminoácidos**

30 Prioridad:

11.10.2013 KR 20130121090

18.07.2014 KR 20140091307

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

21.07.2017

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
Dongho-ro 330 Ssangnim-dong Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**MOON, JUN OK;
LIM, SANG JO;
KWON, DO HYUN;
LEE, KWANG HO y
BAE, HYUN WON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 626 048 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-aminoácidos

Antecedentes

1. Campo

- 5 Una o más realizaciones de la presente invención se refieren a un procedimiento de producción de L-aminoácidos utilizando un procedimiento de inhibición de transcripción de genes.

2. Descripción de la técnica relacionada

10 El piruvato, que se produce mediante glucólisis de diversas fuentes de carbono en microorganismos corineformes, se transforma en aspartato vía oxaloacetato. El aspartato se transforma en aminoácidos tales como treonina, metionina, isoleucina y lisina a través de diversas rutas biosintéticas (FIG. 1). Por lo tanto, la expresión de genes, localizados en cada punto de ramificación en los procesos biosintéticos de aminoácidos, puede inhibirse para disminuir la producción de subproductos y aumentar la producción de aminoácidos diana.

15 Como se ha descrito anteriormente, para desarrollar una cepa de microorganismo, que sea capaz de producir con gran fuerza materiales diana utilizando modificación por ingeniería genética y metabólica, la expresión de genes relacionados con diversos procesos metabólicos de un microorganismo requiere controlarse de manera selectiva. Recientemente, se describió una tecnología para debilitar la expresión de genes, denominada "transcripción convergente artificial", (Krylov y col., J Mol Microbiol Biotechnol, 18: 1-13, 2010). La transcripción convergente artificial es una tecnología que debilita la expresión de un gen diana insertando un promotor en una región cadena abajo de un terminador de la transcripción del gen diana de tal manera que la dirección opuesta del promotor causa una colisión de complejos de ARN polimerasa procedentes de cada promotor durante la transcripción.

20 Los inventores desarrollaron una tecnología para inhibir, de manera selectiva, la expresión de un gen diana en presencia de acetato, insertando un promotor inducible por acetato en una dirección opuesta a la de la transcripción del gen diana, y aplicaron de un modo eficaz la tecnología para inhibir la expresión de genes localizados en puntos de ramificación en un microorganismo corineforme. Después, los inventores verificaron el proporcionar el microorganismo corineforme de producción de L-aminoácidos con alto rendimiento, utilizando la tecnología y completando así la presente invención.

Sumario

El fin de la presente invención es ofrecer un procedimiento de producción de L-aminoácidos utilizando un promotor inducible por acetato para inhibir la transcripción de un gen diana.

- 30 Por consiguiente la presente invención ofrece un procedimiento de producción de L-aminoácidos, comprendiendo el procedimiento

- 1) cultivar un microorganismo corineforme recombinante capaz de producir L-aminoácidos, en el que el microorganismo corineforme recombinante tiene un promotor inducible por acetato cadena abajo de un codon de terminación de un gen diana en un cromosoma; y
- 35 2) añadir acetato durante el cultivo para debilitar la expresión del gen diana, y para intensificar la capacidad de producción de L-aminoácidos del microorganismo corineforme recombinante, en el que el promotor inducible por acetato está en una dirección opuesta a la de la transcripción del gen diana.

Las características preferidas se definen en las reivindicaciones 2 a 5.

Breve descripción de los dibujos

- 40 Estos y/u otros aspectos resultarán obvios y se apreciarán más fácilmente a partir de la siguiente descripción de las realizaciones, tomadas en conjunto con los dibujos acompañantes, en los que:

La FIG. 1 muestra puntos de ramificación del proceso de biosíntesis de aminoácidos en un microorganismo corineforme;

- 45 La FIG. 2 es un diagrama esquemático que muestra la inhibición de la expresión del gen aceE insertando un promotor del gen aceA a) entre el codon de terminación y el terminador de la transcripción cadena arriba del gen aceE o b) cadena abajo del terminador de la transcripción en una dirección opuesta a la dirección de la transcripción del gen aceE.

Descripción detallada

- 50 Se hará referencia ahora con detalle a las realizaciones, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos acompañantes, en los que, en todos ellos, números de referencia similares se refieren a elementos similares. En este sentido, las presentes realizaciones pueden tener diferentes formas y no deben considerarse como que limitan las descripciones

expuestas en el presente documento. Por consiguiente, las realizaciones se describen simplemente a continuación, por referencia a las figuras, explicando aspectos de la presente descripción. Expresiones tales como “al menos uno(a) de” cuando va delante de una lista de elementos, modifica toda la lista de elementos y no modifica los elementos individuales de la misma.

5 En lo sucesivo, la presente invención se describe en detalle.

La presente invención ofrece un procedimiento de producción de L-aminoácidos, comprendiendo el procedimiento:

- 1) cultivar un microorganismo corineforme recombinante capaz de producir L-aminoácidos, en el que el microorganismo corineforme recombinante tiene un promotor inducible por acetato cadena abajo de un codón de terminación de un gen diana en un cromosoma; y
- 10 2) añadir acetato durante el cultivo para debilitar la expresión del gen diana, y para intensificar la capacidad de producción de L-aminoácidos del microorganismo corineforme recombinante, en el que el promotor inducible por acetato está en una dirección opuesta a la de la transcripción del gen diana.

La expresión “promotor inducible por acetato” utilizada en el presente documento se refiere a un promotor que, en presencia de acetato, tiene actividad inductora de expresión de genes.

15 En un microorganismo corineforme, el acetato se transforma mediante acetato quinasa (*ackA*, NCgl2656) y fosfotransacetilasa (*pta*, NCgl2657), o mediante succinil -CoA:acetato CoA-transferasa (*actA*, NCgl2480), en acetil CoA, y después se metaboliza mediante isocitrato liasa (*aceA*, NCgl2248) en un ciclo de glioxalato. En *Escherichia coli*, el acetato se transforma en acetil CoA mediante acetil-CoA sintetasa (*acs*, b4069) (Gerstmeir y col., J Biotechnol, 104: 99-122, 2003). La expresión de los genes mencionados, implicados en el metabolismo de acetato, se induce en presencia de acetato. Por lo tanto, cuando se utilizan los promotores de los genes, la expresión del gen puede inducirse específicamente en presencia de acetato.

Los promotores inducibles por acetato incluyen un promotor de un gen que codifica la isocitrato liasa (*aceA*, NCgl2248) o un promotor de un operón de un gen que codifica la acetato quinasa (*ackA*, NCgl2656) y un gen que codifica la fosfotransacetilasa (*pta*, NCgl2657), que es un promotor cadena arriba del gen *pta*. Más específicamente, entre los promotores inducibles por acetato descritos anteriormente, el promotor del gen *aceA* se representa por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 e incluye 486 pares de bases cadena arriba del gen *aceA* y 36 pares de bases desde un N-terminal de una fase de lectura abierta (ORF por las siglas en inglés *open reading frame*).

El promotor cadena arriba del gen *pta*, que es otro promotor inducible por acetato, se representa por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 e incluye 340 pares de bases cadena arriba del gen *pta*.

30 Además, es obvio que cualquier promotor capaz de inducir la expresión de un gen diana por acetato, puede incluirse en el ámbito de la presente invención. Por ejemplo, los promotores inducibles por acetato pueden incluir una secuencia de nucleótidos que incluya la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 2, o que incluya una secuencia conservada de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 2, y una o una pluralidad de nucleótidos (específicamente de 2 a 20, más específicamente, de 2 a 10, adicionalmente más específicamente, de 2 a 5 nucleótidos, dependiendo de la conformación estérica de los restos de aminoácido de una proteína) que se sustituyen, delecionan, insertan, añaden o invierten en una o más localizaciones. Siempre que la función del promotor inducible se mantenga o intensifique, este puede incluir una secuencia de nucleótidos que tiene más de 80 % de homología con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o 2, específicamente más de 90 %, más específicamente más de 95 %, adicionalmente más específicamente más de 97 %. Siempre que la función del promotor inducible se mantenga, la secuencia de nucleótidos sustituida, delecionada, insertada, añadida o invertida puede incluir una secuencia mutante espontánea o incluso una secuencia mutante artificial.

El término “homología” como se usa en presente documento se refiere a la identidad entre dos secuencias de nucleótidos diferentes. La homología puede determinarse mediante un procedimiento conocido en esta técnica utilizando un programa informático BLAST 2.0 que calcula parámetros tales como puntuación, identidad y similitud. Sin embargo, el procedimiento de determinación de la homología no está limitado a este.

A menos que se mencione de otra manera en el presente documento, la expresión “cadena arriba” se refiere a una dirección 5', y la expresión “cadena abajo”, se refiere a una dirección 3'. Normalmente, la dirección del avance de la transcripción es de 5' a 3', de tal manera que la posición del promotor normalmente es cadena arriba(5') del gen diana.

50 En el presente documento, un gen diana en un cromosoma puede ser un gen implicado en un proceso de síntesis biológica de aminoácidos, tales como treonina, metionina, isoleucina y lisina, a partir de diversas fuentes de carbono, especialmente un gen localizado en un punto de ramificación de una ruta biosintética.

Por ejemplo, con respecto a la lisina, un gen de la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa (*aceE*, NCgl2167) que está implicado en la conversión de piruvato en acetil CoA, un gen de homoserina deshidrogenasa (*hom*, NCg11136) que produce homoserina a partir de aspartato y un gen de UDP-N-acetilmuramoylalanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligasa (*murE*, NCgl2083) que utiliza meso-2,6-diaminopimelato, que es un precursor de lisina en

síntesis somática, se localizan en puntos de ramificación de la ruta biosintética.

Además, un gen de dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*, NCg11896) implicado en la producción de lisina a partir de aspartato está en un punto de ramificación con respecto a treonina, y un gen de homoserina quinasa (*thrB*, NCg11137) implicado en la producción de treonina a partir de homoserina, está en un punto de ramificación con respecto a metionina. Con respecto a la alanina y a la valina, que son aminoácidos derivados de piruvato, un gen de la subunidad 1 de la piruvato deshidrogenasa (*aceE*, NCg12167) implicado en la conversión de piruvato en acetil CoA está en un punto de ramificación.

Por lo tanto, puede seleccionarse un gen diana del grupo que consiste en un gen que codifica una subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa (*aceE*, NCg12167), un gen que codifica una homoserina deshidrogenasa (*hom*, NCg11136), un gen que codifica una UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligasa (*murE*, NCg12083) y un gen que codifica una di-hidrodipicolinato sintasa (*dapA*, NCg11896), pero no se limita a estos.

Específicamente, la subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa (*aceE*, NCg12167) es una de las subunidades proteicas del complejo de piruvato deshidrogenasa (PDHC), que está implicada en el flujo de entrada de piruvato que es un metabolito final de la glucólisis en un ciclo de ácido tricarbóxico (ciclo TCA). Por lo tanto, el debilitamiento de la expresión del gen *aceE* puede disminuir el flujo de entrada de fuentes de carbono en un ciclo TAC y aumentar el flujo de entrada de fuentes de carbono en una ruta biosintética de lisina para aumentar la producción de lisina.

La homoserina deshidrogenasa (*hom*, NCg11136) es una enzima que sintetiza homoserina a partir de aspartato semialdehído. Dado que el aspartato semialdehído es uno de los precursores intermedios de una ruta biosintética de lisina, el debilitamiento de la actividad del gen *hom* puede disminuir el flujo de entrada de fuentes de carbono en una ruta biosintética de homoserina y aumentar el flujo de entrada de fuentes de carbono en una ruta biosintética de lisina para aumentar la producción de lisina.

La UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligasa (*murE*, NCg12083) utiliza meso-2,6-diaminopimelato para la síntesis somática. Dado que la meso-2,6-diaminopimelato se utiliza también como un precursor para la biosíntesis de lisina, el debilitamiento de la actividad del gen *murE* puede disminuir el flujo de entrada de fuentes de carbono en la síntesis somática y aumentar el flujo de entrada de fuentes de carbono en una ruta biosintética de lisina para aumentar la producción de lisina.

La dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*, NCg11896) es una enzima que está implicada en la producción de lisina utilizando aspartato semialdehído. Dado que el aspartato semialdehído es uno de los precursores intermedios de una ruta biosintética de lisina, el debilitamiento de la actividad del gen *dapA* puede disminuir el flujo de entrada de fuentes de carbono en la ruta biosintética de lisina y aumentar el flujo de entrada de fuentes de carbono en una ruta biosintética de treonina para aumentar la producción de treonina.

En el presente documento, la expresión "codón de terminación" se utiliza para referirse a codones que no codifican un aminoácido en ARNm, sino que actúan como una señal para la terminación de la síntesis de proteínas. Convencionalmente, como codones de terminación, se utilizan tres codones, que incluyen UAA, UAG y UGA.

En el presente documento, la expresión "terminador de la transcripción" se utiliza para referirse a una secuencia repetida inversa rica en bases GC. Un terminador de la transcripción forma un bucle en horquilla para terminar la transcripción de genes.

En la presente invención, para debilitar la expresión de un gen diana, como se describe anteriormente, puede introducirse un promotor inducible por acetato cadena abajo de un codon de terminación de un gen diana, específicamente, entre un codon de terminación y cadena arriba de un terminador de la transcripción. Un promotor inducible por acetato puede utilizarse para causar una transcripción inversa de un gen diana de tal manera que los complejos de ARN polimerasa pueden entrar en conflicto entre sí para debilitar la expresión de un gen diana.

La expresión de un gen diana puede debilitarse en cualquier momento del cultivo. Más específicamente la expresión de un gen diana puede debilitarse antes o durante el cultivo.

En el presente documento, el término "transformación" se utiliza para referirse a la introducción de un vector que incluye un polinucleótido que codifica un gen diana en una célula hospedadora, de tal manera que una proteína codificada por el polinucleótido puede expresarse en la célula hospedadora. Siempre que un polinucleótido introducido pueda expresarse en una célula hospedadora, el polinucleótido puede insertarse en el cromosoma de la célula hospedadora o existir fuera del cromosoma. Además, el polinucleótido incluye ADN o ARN que codifica una proteína diana. Siempre que el polinucleótido pueda introducirse y expresarse en una célula hospedadora, el polinucleótido puede introducirse en cualquier forma.

En una realización de la invención, el microorganismo corineforme puede incluir microorganismos de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* sp. y *Microbacterium* sp. Como ejemplos de microorganismos corineformes se incluyen *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* y variantes productoras de L-aminoácidos preparadas a partir de los mismos. Específicamente, el microorganismo corineforme puede ser *Corynebacterium glutamicum*, pero no está limitado a

estos ejemplos.

Más específicamente, los microorganismos corineformes en la presente invención pueden incluir *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (n.º de registro anterior: KFCC10881, referido a la patente coreana n.º: 10-0159812), *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (referido a la patente coreana n.º: 10-0924065) y *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (n.º de registro anterior: KFCC10750, referido a la patente coreana n.º: 10-0073610).

En la presente invención también puede incluirse *Corynebacterium glutamicum* CJ3P como microorganismo corineforme. CJ3P ha evolucionado hasta tener la capacidad de producir lisina introduciendo mutación en tres genes implicados en la eficiencia de producción de lisina, *pyc*(P458S), *hom*(V59A) y *lysC*(T311I)) en una cepa parental, *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre (ATCC13032) de acuerdo con el informe de Binder y col. (Binder y col., Genome Biology, 13: R40, 2012).

Además, otro microorganismo corineforme en la presente invención puede ser *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P, que es una cepa productora de L-treonina (referida a la patente coreana n.º: 10-1335853).

De acuerdo con una realización de la presente invención, en todos los organismos corineformes en los que se introdujo un promotor representado por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, la productividad de L-lisina o L-treonina aumentó en comparación con la de la cepa parental.

Con respecto al procedimiento proporcionado en la presente invención, el cultivo de un microorganismo corineforme puede realizarse aplicando cualquiera de las condiciones y métodos de cultivo conocidos en esta técnica.

Un medio de cultivo que puede utilizarse en el cultivo de una cepa corineforme, puede ser, por ejemplo, los medios de cultivo descritos en Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

Las fuentes de carbono, que pueden utilizarse en el medio de cultivo, pueden incluir un hidrato de carbono tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, un aceite o lípido, tal como aceite de semilla de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de cacahuete, un ácido graso, tal como, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, un alcohol, tal como, glicerol y etanol y un ácido orgánico, tal como ácido acético. Estas sustancias pueden estar individualmente o como una mezcla.

Las fuentes de nitrógeno que pueden utilizarse en el medio de cultivo, pueden incluir peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, líquido de macerado de maíz, semilla de soja y urea y una fuente de nitrógeno inorgánica tal como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno también pueden estar individualmente o como una mezcla.

Las fuentes de fósforo que pueden utilizarse en el medio de cultivo, pueden incluir dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato dipotásico y una sal de los mismos que contenga sodio. Además, puede haber un medio de cultivo que incluya una sal metálica, tal como sulfato de magnesio y sulfato de hierro necesario para el crecimiento. Además de las sustancias descritas anteriormente, pueden utilizarse sustancias necesarias para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas. Además, en un medio de cultivo pueden utilizarse precursores apropiados. Durante el cultivo las materias primas pueden añadirse a la solución de cultivo en un modo discontinuo o continuo.

Durante el cultivo del microorganismo, el pH del medio de cultivo puede ajustarse añadiéndole un compuesto básico tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y amoníaco, o añadiéndole un compuesto ácido tal como ácido fosfórico y ácido sulfúrico en un modo apropiado. Además, la formación de burbujas puede reprimirse con un agente antiespuma tal como poliglicol éster de ácido graso. Para mantener las condiciones aerobias, se puede inyectar oxígeno o un gas que contenga oxígeno (for ejemplo, aire) al medio de cultivo. La temperatura del medio de cultivo puede ser normalmente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 45 °C, específicamente, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C. El cultivo puede continuar hasta que se produzca una cantidad deseada de un L-aminoácido, si bien, un tiempo de cultivo apropiado puede durar de aproximadamente 10 a 160 horas.

Con respecto al procedimiento proporcionado en la presente invención, el cultivo puede realizarse en un modo continuo o discontinuo, tal como un proceso discontinuo, un proceso semicontinuo y un proceso semicontinuo repetido. Estos procedimientos de cultivo son conocidos en la técnica y puede utilizarse cualquiera de los mismos.

El término "cultivo", como se usa en el presente documento, puede incluir tanto la preparación de un medio de cultivo como el tiempo que dura el crecimiento del microorganismo.

Con respecto al procedimiento proporcionado en la presente invención, el procedimiento puede incluir adicionalmente una etapa de purificación o de recuperación. Un L-aminoácido diana puede purificarse o recuperarse de una solución de cultivo utilizando un procedimiento apropiado conocido en esta técnica de acuerdo con el procedimiento, tal como un cultivo discontinuo, continuo y semicontinuo.

Un L-aminoácido producido en el cultivo de la presente invención puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en treonina, metionina, isoleucina, lisina, valina y alanina, especialmente lisina o treonina.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle con referencia a los ejemplos. Los fines de estos ejemplos son únicamente ilustrativos y el ámbito de la presente invención no se limita a ellos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Selección de un promotor inducible por acetato

La isocitrato liasa (*aceA*, NCgl2248) es una enzima clave de un ciclo de glioxilato, y un gen que codifica la isocitrato liasa se expresa en presencia de acetato. Además, la acetato quinasa (*ackA*, NCgl2656) y la fosfotransacetilasa (*pta*, NCgl2657), que son enzimas que están implicadas en el proceso metabólico del acetato, forman un operón, y su expresión se intensifica en presencia de acetato. Las regiones promotoras del gen *aceA* y del operón *pta-ackA* ya se conocen (Gerstmeir y col., J Biotechnol, 104, 99-122, 2003).

En el Ejemplo 1, para inhibir la transcripción de un gen diana en presencia de acetato, se seleccionaron un promotor del gen *aceA* y un promotor del operón *pta-ack*, que es una región promotora cadena arriba del gen *pta*. Basándose en el gen *aceA* registrado en el US NIH GenBank (nº. de registro NCBI: NCgl2248), se obtuvo una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1), que incluía 486 pares de bases cadena arriba del gen *aceA* y 36 pares de bases de un N-terminal de una fase de lectura abierta (ORF). Además, basándose en el gen *pta* registrado en el US NIH GenBank (nº. de registro NCBI: NCgl2657), se obtuvo una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2), que incluía 340 pares de bases cadena arriba del gen *pta*.

Ejemplo 2: Preparación de un vector para inhibir la expresión del gen *aceE*

Una subunidad E1 de piruvato deshidrogenasa (*aceE*, NCgl2167) es una de las subunidades proteicas del complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC), que está implicado en el flujo de entrada de piruvato que es un metabolito final de la glucólisis en un ciclo TCA.

Por lo tanto, el debilitamiento de la expresión del gen *aceE* puede disminuir el flujo de entrada de fuentes de carbono en un ciclo TCA y aumentar el flujo de entrada de fuentes de carbono en una ruta biosintética de lisina para aumentar la producción de lisina (Blombach y col., Appl Microbiol Biotechnol, 76(3): 615-23, 2007).

El promotor del gen *aceA* se insertó cadena abajo del gen *aceE* de tal manera que la transcripción a partir de este promotor puede ocurrir en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen *aceE* para inhibir la expresión del gen *aceE* de manera selectiva en presencia de acetato (FIG. 2).

En primer lugar, para predecir un terminador de la transcripción del gen *aceE*, se utilizó el programa informático del conjunto de programas maestro CLC (CLC Bio, Dinamarca). Un terminador de la transcripción es una secuencia repetida invertida rica en bases GC y forma un bucle en horquilla para terminar la transcripción génica. El resultado de la predicción de un terminador de la transcripción del gen *aceE* mostró que 36 pares de bases, desde el par de bases 21 al par de bases 56 cadena abajo desde el codón de terminación del gen *aceE*, forma un bucle en horquilla como un terminador de la transcripción. Basándose en este resultado, se prepararon dos vectores para insertar el promotor *aceE* cadena arriba o cadena abajo, respectivamente, del terminador de la transcripción del gen *aceE* de tal manera que la transcripción a partir de este promotor puede producirse en una dirección opuesta a la original.

<2-1> Preparación del vector pDZ-*aceE*1-PaceA para inhibir la expresión del gen *aceE*

Se preparó un vector insertando un promotor del gen *aceE* cadena abajo del codon de terminación de gen *aceE*, que está entre el codon de terminación y cadena arriba del terminador de la transcripción.

Para obtener un fragmento de un gen *aceE* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, como molde se utilizó el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P para sintetizar cebadores (SEQ ID NO: 3 y 4), que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en el extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SpeI en el extremo 3' del fragmento. Se realizó una PCR utilizando los cebadores sintetizados para obtener un fragmento de ADN que incluía 296 pares de bases entre el nucleótido 2474 desde el codon de inicio del gen *aceE* y el nucleótido 2769, un codon de terminación del gen *aceE*. Además, se sintetizaron cebadores (SEQ ID NO: 5 y 6), que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento SpeI en un extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento XbaI en el extremo 3' del fragmento, y se realizó una PCR utilizando los cebadores para obtener un fragmento de ADN que incluyese 300 pares de bases cadena abajo del codon de terminación del gen *aceE*. Se utilizó ADN polimerasa PfuUltra™ de alta fidelidad (Stratagene) como una polimerasa, y se realizó una PCR con 30 ciclos de desnaturización a 95 °C durante 30 segundos; hibridación a 55 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 30 segundos y después polimerización a 72 °C durante 7 minutos.

Los dos productos de amplificación de la PCR y un vector pDZ (referido a la patente coreana n.º: 10-0924065) para la introducción cromosómica que ya se habían preparado escindiendo con una enzima de restricción XbaI, se

clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-aceE1.

SEQ ID NO: 3: aceE-P1 F 5'- ccggggatcctctagacctccggcccatagcttgc -3'
 SEQ ID NO: 4: aceE-P1 R 5'- ttgagactagttatcctcaggagcggttg -3'
 SEQ ID NO: 5: aceE-P2F 5'- gaataactagtctcaagggacagataaatc -3'
 SEQ ID NO: 6: aceE-P2R 5'- gcaggtcgactctagagaccgaaaagatcggtggcag -3'

Para obtener un fragmento promotor de un gen *aceA* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, se sintetizaron cebadores que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de escisión Spel en un extremo 5' y en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 7 y 8). La PCR se realizó utilizando como molde el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y los cebadores sintetizados para amplificar una región promotora de aproximadamente 500 pares de bases que se representaba por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. El producto de amplificación de la PCR y un fragmento de ADN que se obtuvo tratando un vector pDZ-aceE1 con la enzima de restricción Spel, se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-aceE1-PaceA.

SEQ ID NO: 7: PaceA-P3F 5'- gtcccttgagactagtagcactctgactacctctg -3'
 SEQ ID NO: 8: PaceA-P3R 5'- ctgaggaata actagttcctgtgctgctacgtggc -3'

<2-2> Preparación del vector pDZ-aceE2-PaceA para inhibir la expresión del gen *ace*

Se preparó un vector insertando un promotor del gen *aceA* cadena abajo del terminador de la transcripción del gen *aceE*.

Para obtener un fragmento de un gen *aceE* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P se utilizó como un molde, y se utilizaron los cebadores que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en el extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de escisión Spel en el extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 9 y 10). Se realizó una PCR utilizando los cebadores sintetizados para obtener un fragmento de ADN que incluía 294 pares de bases entre el nucleótido 2538 desde el codon de inicio del gen *aceE* y el nucleótido 62 cadena abajo del codon de terminación. Además, se utilizaron cebadores, que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de enzima de restricción Spel en el extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de escisión XbaI en el extremo 3' del fragmento (SEQ ID NOS: 11 y 12) para realizar un PCR para obtener un fragmento de ADN que incluía 294 pares de bases entre el nucleótido 69 cadena abajo del codon de terminación del gen *aceE* y el nucleótido de 36. Se utilizó la ADN polimerasa PfuUltra™ de alta fidelidad (Stratagene) como una polimerasa y se realizó una PCR con 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos; hibridación a 55 °C durante 30 segundos; y polimerización a 72 °C durante 30 segundos y después polimerización a 72 °C durante 7 minutos.

Los dos productos de amplificación PCR y un vector pDZ para la introducción cromosómica que ya se había preparado por escisión con una enzima de restricción XbaI, se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-aceE2.

SEQ ID NO: 9: aceE-P4F 5'- ccggggatcctctagaggtcccaggcgactacacc -3'
 SEQ ID NO: 10: aceE-P4R 5'- gagctactagtagcagcaatcccggccagacta -3'
 SEQ ID NO: 11: aceE-P5F 5'- gtcgtactagtagctcttttagccgaggaacgcc -3'
 SEQ ID NO: 12: aceE-P5R 5'- gcaggtcgactctagacatgctgttggatgagcac -3'

Para obtener un fragmento promotor de un gen *aceA* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, se sintetizaron cebadores que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de escisión Spel en un extremo 5' y en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 13 y 14). La PCR se realizó utilizando como molde el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y los cebadores sintetizados para amplificar una región promotora de aproximadamente 500 pares de bases que se representaba por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. El producto de amplificación de la PCR y un fragmento de ADN que se obtuvo tratando un vector pDZ-aceE2 con la enzima de restricción Spel, se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-aceE2-PaceA.

SEQ ID NO: 13: PaceA-P6F 5'- aaaaagagctactagtagcactctgactacctctg -3'
 SEQ ID NO: 14: PaceA-P6R 5'- gattcgtctactagtttctgtgctgctacgtggc -3'

Ejemplo 3: Preparación de cepas en las que se inserta el promotor del gen *aceA* cadena abajo del gen *aceE*

Los vectores pDZ-aceE1-PaceA y pDZ-aceE2-PaceA preparados en el Ejemplo 2 se introdujeron respectivamente mediante impulso eléctrico en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P que es una cepa productora de L-lisina (procedimiento de transformación descrito en Van der Rest et col., Appl Microbiol Biotechnol, 52: 541-545, 1999). Se seleccionaron las cepas respectivas en las que se insertó el promotor del gen *aceA* cadena abajo del codón de terminación del gen *aceE* en el cromosoma de tal manera que la transcripción desde este promotor puede ocurrir en una dirección opuesta a la dirección original, realizando una PCR para obtener una cepa productora de L-lisina. Las

cepas seleccionadas se denominaron *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE1-PaceA, y *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE2-PaceA, respectivamente. *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE1-PaceA se depositó internacionalmente con el nombre de *Corynebacterium glutamicum* CA01-2271 en el *Korean Culture Center of Microorganism* (Centro coreano de Cultivo de Microorganismos, siglas en inglés KCCM) el 12 de junio del 2013 con el número de registro KCCM11432P. Las cepas preparadas se verificaron de manera que la secuencia de nucleótidos de la región diana obtenida se analizó realizando una PCR utilizando la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6 como cebadores para la KCCM11016P::aceE1-PaceA, y la SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 12 como cebadores para la KCCM11016P::aceE2-PaceA.

Ejemplo 4: Comparación de productividad de lisina de cepas en las que el promotor del gen *aceA* se inserta cadena abajo del gen *aceE*

La cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, que se utilizó como una cepa parental, y las cepas *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE1-PaceA y *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P::aceE2-PaceA que eran cepas productoras de L-lisina preparadas en el Ejemplo 3, se cultivaron mediante el procedimiento descrito a continuación.

Corynebacterium glutamicum KCCM11016P KCCM11016P::aceE1-PaceA y KCCM 11016P::aceE2-PaceA se inocularon respectivamente en 25 ml del medio de siembra descrito a continuación en matraces con deflectores angulares de 250 ml, seguido de cultivo con agitación a 200 rpm a 30 °C durante 20 horas. Se añadió 1 ml de la solución del cultivo de siembra a un matraz con deflector angular de 250 ml que incluía 24 ml del medio de producción descrito más adelante, seguido de cultivo con agitación a 200 rpm a 30 °C durante 72 horas. A continuación se describen las composiciones respectivas del medio de siembra y los medios de producción.

<Medio de siembra (pH 7,0)>

glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄·7(H₂O) 0,5 g, biotina 100 µg, HCl tiamina 1.000 µg, pantotenato de calcio 2.000 µg, nicotinamida 2.000 µg (con referencia a 1 l de agua destilada).

<Medio de producción (pH 7,0)>

glucosa 100 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, proteína de soja 2,5 g, sólidos de macerado de maíz 5 g, urea 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7(H₂O) 0,5 g, biotina 100 µg, HCl tiamina 1.000 µg, pantotenato de calcio 2.000 µg, nicotinamida 3.000 µg, CaCO₃ 30 g (con referencia a 1 l de agua destilada).

Después del cultivo, la concentración de L-lisina se midió utilizando HPLC. En la Tabla 1 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, KCCM11016P::aceE1-PaceA y de KCCM11016P::aceE2-PaceA cuando no se añadía acetato.

Tabla 1. Variación de la producción de L-lisina (sin añadir acetato)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	43,5	43,1	43,4
KCCM11016P::aceE1-PaceA	43,7	43,2	43,6
KCCM11016P::aceE2-PaceA	43,3	43,4	43,7

Además, las cepas se cultivaron mediante el mismo procedimiento, excepto que se añadieron 5 g/l de acetato al medio de producción para comparar la producción de L-lisina. En la Tabla 2 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo.

Tabla 2. Variación de la producción de L-lisina (5 g/l de acetato añadido)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	45,6	45,3	45,8
KCCM11016P::aceE1-PaceA	47,2	47,1	47,4
KCCM11016P::aceE2-PaceA	46,7	46,5	47,0

Como se muestra en la Tabla 1, en ausencia de acetato, la productividad de L-lisina de las cepas KCCM11016P::aceE1-PaceA y KCCM11016P::aceE2-PaceA no era diferente de la de la cepa parental KCCM11016P.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 2, en presencia de acetato, la productividad de L-lisina de la cepa KCCM11016P::aceE1-PaceA fue más del 3,6 % más alta que la de la cepa parental KCCM11016P, y la de la cepa

KCCM11016P::aceE2-PaceA fue más alta del 2,5 % más alta que la de la cepa parental KCCM11016P.

Además, la comparación de la cepa KCCM11016P::aceE1-PaceA y de la cepa KCCM11016P::aceE2-PaceA muestra que la producción de L-lisina de la cepa KCCM11016P::aceE1-PaceA en la que se insertó el promotor aceA cadena arriba del terminador de la transcripción del gen aceE, que estaba entre el codon de terminación y cadena arriba del terminador de la transcripción, era más efectiva. Esto indica que la región entre el codon de terminación y cadena arriba del terminador de la transcripción puede utilizarse para inhibir la expresión del gen de un modo más eficaz.

Ejemplo 5: Preparación del vector pDZ-aceE-Ppta para inhibir la expresión del gen aceE

La acetato quinasa (ackA, NCgl2656) y la fosfotransacetilasa (pta, NCgl2657), que son enzimas que están implicadas en un proceso metabólico de acetato, forman un operón, y la expresión del mismo se intensifica en presencia de acetato. Por lo tanto, cuando se utilizan los promotores de los genes, la expresión de un gen puede inducirse específicamente en presencia de acetato.

En el Ejemplo 5, para inhibir la expresión del gen aceE en presencia de acetato, se preparó un vector utilizando un promotor del operón pta-ack que era la región promotora cadena arriba del gen pta.

Para inhibir la expresión del gen aceE, se construyó un vector que podía comprender un promotor del gen pta cadena abajo del codon de terminación del gen aceE, que está entre el codon de terminación y cadena arriba del terminador de la transcripción, de tal manera que la transcripción desde el promotor del gen pta puede producirse en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen aceE.

Para obtener un fragmento de un gen aceE procedente de Corynebacterium glutamicum, como molde se utilizó el ADN cromosómico de Corynebacterium glutamicum KCCM11016P para preparar un vector pDZ-aceE1 mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 2.

Para obtener un fragmento promotor de un gen pta procedente de Corynebacterium glutamicum, se sintetizaron cebadores que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SpeI en un extremo 5' y en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16). El ADN cromosómico de Corynebacterium glutamicum KCCM11016P se utilizó como molde, y los cebadores sintetizados se utilizaron para realizar una PCR para amplificar una región promotora de aproximadamente 340 pares de bases que se representaban por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2. El producto de amplificación de la PCR y un fragmento de ADN, que se obtuvo tratando un vector pDZ-aceE1 con una enzima de restricción SpeI, se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-aceE1-Ppta.

SEQ ID NO: 15: Ppta-P7F 5'-gtcccttgagactagtctttgctggggtcagatttg-3'
 SEQ ID NO: 16: Ppta-P7R 5'- ctgaggaataactagatcatcgctttctaatttc-3'

Ejemplo 6: Preparación de cepas en las que el promotor del gen pta se inserta cadena abajo del gen aceE y comparación de productividad de lisina de las mismas

La cepa Corynebacterium glutamicum KCCM11016P se transformó con el vector pDZ-aceE1-Ppta preparado en el Ejemplo 5 mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 3. La cepa en la que se insertó el promotor del gen pta cadena abajo del codon de terminación del gen aceE en el cromosoma de tal manera que la transcripción podía producirse en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen aceE, se seleccionó realizando una PCR para obtener una cepa productora de L-lisina, que se denominó KCCM11016P::aceE1-Ppta. La cepa KCCM11016P::aceE1-Ppta preparada se verificó de manera que la secuencia de nucleótidos de la región diana obtenida se analizó realizando una PCR utilizando, como cebadores, la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 6.

La cepa preparada se cultivó mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 4 y se midió la concentración de L-lisina recuperada de la solución de cultivo. En la Tabla 3 se muestra la concentración de L-lisina en la solución de cultivo cuando no se añadía acetato.

Tabla 3. Variación de la producción de L-lisina (sin añadir acetato)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	42,9	43,5	43,4
KCCM11016P:: aceE1-Ppta	43,2	43,3	43,6

Además, las cepas se cultivaron mediante el mismo procedimiento, excepto que se añadieron 5 g/l de acetato al medio de producción para comparar la producción de L-lisina. En la Tabla 4 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo.

Tabla 4. Variación de la producción de L-lisina (5 g/l de acetato añadido)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	45,5	45,7	45,3
KCCM11016P::aceE1-Ppta	46,7	46,5	46,6

Como se muestra en la Tabla 3, en ausencia de acetato, la productividad de L-lisina de la cepa KCCM11016P::aceE1-Ppta no fue diferente de la de la cepa parental KCCM11016P.

- 5 Sin embargo, como se muestra en la Tabla 4, en presencia de acetato, la productividad de L-lisina de la cepa KCCM11016P::aceE1- Ppta fue más del 2,4 % más alta que la de la cepa parental KCCM11016P.

Además, dado que la productividad de L-lisina de la cepa KCCM11016P::aceE1-PaceA era mayor que la de la cepa KCCM11016P::aceE1-Ppta, en presencia de acetato, la expresión de un gen diana puede inhibirse más eficazmente utilizando el promotor del gen *aceA* que utilizando el promotor del gen *pta*.

10 **Ejemplo 7: Preparación de cepas en las que se inserta un promotor del gen *aceA* cadena abajo del gen *aceE***

Tres cepas productoras de L-lisina, que eran *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750, KCCM10770P y CJ3P, se transformaron respectivamente con el vector pDZ-aceE1-PaceA preparado en el Ejemplo 2 mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 3. Las cepas en las que se insertó un promotor del gen *aceA* cadena abajo del codon de terminación del gen *aceE* en el cromosoma de tal manera que la transcripción puede producirse en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen *aceE*, se seleccionaron realizando una PCR. Las tres cepas productoras de L-lisina obtenidas eran KFCC10750::aceE1- PaceA, KCCM10770P::aceE1-PaceA y CJ3P::aceE1-PaceA. Las cepas preparadas se verificaron de tal manera que la secuencia de nucleótidos de la región diana obtenida se analizó realizando una PCR utilizando como cebadores la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6.

- 15 Las cepas preparadas se cultivaron mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 4, y se midió la concentración de L-lisina recuperada de las soluciones de cultivo. En la Tabla 5 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo cuando no se añadía acetato.

Tabla 5. Variación de la producción de L-lisina (sin añadir acetato)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KFCC10750	38,3	38,0	38,4
KFCC10750::aceE1-PaceA	38,6	38,2	38,3
KCCM10770P	47,5	47,3	47,6
KCCM 10770P::aceE1-PaceA	47,3	47,7	47,5
CJ3P	8	8,4	8,3
CJ3P::aceE1-PaceA	8,2	8,1	8,5

- 25 Además, las cepas se cultivaron mediante el mismo procedimiento excepto que se añadieron 5 g/l de acetato al medio de producción para comparar la producción de L-lisina. En la Tabla 6 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo.

Tabla 6. Variación de la producción de L-lisina (5 g/l de acetato añadido)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KFCC10750	39,3	39,5	39,2
KFCC10750::aceE1-PaceA	41,3	41,6	41,0
KCCM10770P	47,5	47,3	47,6
KCCM 10770P::aceE 1-PaceA	49,0	48,6	48,8
CJ3P	8	8,4	8,3
CJ3P::aceE1-PaceA	9,5	9,7	9,4

- 30 Como se muestra en la Tabla 5, en ausencia de acetato, la productividad de L-lisina de las tres cepas KFCC10750::aceE1- PaceA, KCCM10770P::aceE1-PaceA, CJ3P::aceE1-PaceA no fue diferente de la de la cepa parental.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 6, en presencia de acetato, la productividad de L-lisina de la cepa KFCC10750::aceE1- PaceA fue 5 % mayor que la de la cepa parental, que la de la cepa KCCM10770P::aceE1-

PaceA fue 2,8 % mayor que la de la cepa parental y que la de la cepa CJ3P::aceE1-PaceA fue 15 % mayor que la de la cepa parental.

Ejemplo 8: Preparación de un vector para inhibir la expresión del gen *hom*

5 La ruta biosintética de la L-treonina utilizando el mismo sustrato que el de la ruta biosintética de L-lisina puede debilitarse para aumentar la productividad de L-lisina. Un ejemplo de los procedimientos de debilitamiento de la ruta biosintética de L-treonina es disminuir la actividad enzimática de la homoserina deshidrogenasa (*hom*, NCg11136) que produce homoserina a partir de aspartato.

10 En *Corynebacterium glutamicum*, el gen *hom* forma el operón *hom-thrB* con el gen *thrB*, y el terminador de transcripción del gen *hom* existe cadena abajo del gen *thrB*. Se indicó que un promotor existe cadena arriba del operón *hom-thrB* que está cadena arriba del gen *hom*. Además, se indicó que existe un segundo promotor cadena arriba del operón del gen *thrB* (Mateos y col., J Bacteriol, 176: 7362-7371, 1994). Por lo tanto, un promotor del *aceA* se insertó cadena abajo del codon de terminación del gen *hom* de tal manera que la transcripción desde este promotor puede producirse en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen *hom* para inhibir de manera selectiva la expresión del gen *hom* en presencia de acetato. Para mantener la expresión del gen *thrB*, se añadió una segunda secuencia promotora cadena arriba de la ORF del gen *thrB*.

15 En el Ejemplo 8, se preparó un vector recombinante insertando un promotor del gen *aceA* entre cadena abajo del codon de terminación del gen *hom* y cadena arriba del gen *thrB*.

20 Para obtener un fragmento de un gen *hom* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P se usó como un molde y se sintetizaron cebadores, que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en el extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SmaI en el extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 17 y 18). Se realizó una PCR utilizando los cebadores sintetizados para obtener un fragmento de ADN que incluía 300 pares de bases entre el nucleótido 1039 desde el codon de inicio del gen *hom* y el nucleótido 1338 que era un codon de terminación. Incluso cuando se insertaba *aceA* entre los operones *hom-thrB*, la expresión del gen *thrB* podía mantenerse. Por lo tanto, cuando el fragmento de ADN que incluía 300 pares de bases del codon de terminación del gen *hom* cadena abajo se preparó, se sintetizaron cebadores que se diseñaron para añadir adicionalmente una secuencia promotora *thrB* de 32 pares de bases en un lado 5' (SEQ ID NO: 19 y 20). Se realizó una PCR utilizando estos cebadores (SEQ ID NO: 19 y 20) para obtener un fragmento de ADN de 334 pares de bases que tenía un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SmaI en el extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en el extremo 3' del fragmento. La PCR se realizó en las mismas condiciones que las del Ejemplo 2.

Los dos productos de amplificación por PCR y un vector PdZ para la introducción cromosómica, que ya se había preparado escindiendo con una enzima de restricción XbaI, se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-*hom*.

35 SEQ ID NO: 17: *hom-h1F* 5'- cggggatcctctagaccagggtgagtcacactacg -3'
 SEQ ID NO: 18: *hom-h1R* 5'- gagcggatcactagtttagtcccttcgaggcgg -3'
 SEQ ID NO: 19: *hom-h2F* 5'- actagtgatccgctcgaaaggac -3'
 SEQ ID NO: 20: *hom-h2R* 5'- gcaggtcgactctagagactgcggaatggtgtg -3'

40 Para obtener un fragmento promotor de un gen *aceA* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, se sintetizaron cebadores que se diseñaron para que tuviese un sitio de reconocimiento de la enzima de escisión SmaI en un extremo 5' y en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 21 y 22). La PCR se realizó utilizando como molde ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y los cebadores sintetizados para amplificar una región promotora de aproximadamente 500 pares de bases se representaron mediante una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. El producto de amplificación de la PCR y un fragmento de ADN que se obtuvo tratando un vector pDZ-*hom* con una enzima de restricción SmaI, se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-*hom-PaceA*.

SEQ ID NO: 21: *PaceA-h3F* 5'- gagcggatcactagtagcactctgactacctctg -3'
 SEQ ID NO: 22: *PaceA-h3R* 5'- aaggactaaactagttctgtgctgctgctg -3'

50 Ejemplo 9: Preparación de cepas en las que se inserta el promotor del gen *aceA* cadena abajo del gen *hom* y comparación de la productividad de lisina de las mismas

La cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P que es una cepa productora de L-lisina, se transformó con el vector pDZ-*hom-PaceA* preparado en el Ejemplo 8 mediante el mismo procedimiento que en el Ejemplo 3. La cepa en la que se insertó el promotor del gen *aceA* cadena abajo del codon de terminación del gen *hom* en el cromosoma de tal manera que podía producirse la transcripción en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen *hom*, se seleccionó realizando una PCR para obtener una cepa productora de L-lisina, que se denominó KCCM11016P::*hom-PaceA*. La cepa KCCM11016P::*hom-PaceA* preparada se verificó de manera que la secuencia de nucleótidos de la región diana obtenida se analizó realizando una PCR utilizando como cebadores la

SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 20.

5 La cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P que se utilizó como una cepa parental y la cepa KCCM11016P::hom-PaceA preparada se cultivaron mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 4, y se midió la concentración de L-lisina recuperada de las soluciones de cultivo. En la Tabla 7 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo de la cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y de la cepa KCCM11016P::hom-PaceA cuando no se añadía acetato.

Tabla 7. Variación de la producción de L-lisina (sin añadir acetato)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	43,2	43,3	43,6
KCCM11016P:: hom-PaceA	43,3	43,6	43,4

10 Además, las cepas se cultivaron mediante el mismo procedimiento excepto que se añadieron 5 g/l de acetato al medio de producción para comparar la producción de L-lisina. En la Tabla 8 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo.

Tabla 8. Variación de la producción de L-lisina (5 g/l de acetato añadido)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	44,9	45,6	45,2
KCCM11016P:: hom-PaceA	46,3	46,6	46,4

15 Como se muestra en la Tabla 7, en ausencia de acetato, la productividad de L-lisina de la cepa KCCM11016P::hom-PaceA no fue diferente de la de la cepa parental KCCM11016P.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 8, en presencia de acetato, la productividad de L-lisina de la cepa KCCM11016P::hom-PaceA fue más de 2,6 % más alta que la de la cepa parental KCCM11016P.

Ejemplo 10: Preparación de un vector para inhibir la expresión del gen *murE*

20 La UDP-N-acetilmuramoylalanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligasa (*murE*, NCgl2083) utiliza meso-2,6-diaminopimelato, que es un precursor para la biosíntesis de lisina, en síntesis somática. El debilitamiento de la actividad del gen *murE* puede disminuir el flujo de entrada de fuentes de carbono a la síntesis somática y aumentar el flujo de entrada de fuentes de carbono a una ruta biosintética de lisina para aumentar la producción de lisina.

25 En *Corynebacterium glutamicum*, el gen *murE* (NCgl2083) forma un operón con siete genes de NCgl2076 a NCgl2082. La transcripción del operón comienza desde *murE* NCgl2083 en dirección del gen *NCgl2076*. De este modo, existe un terminador de la transcripción cadena abajo del gen *NCgl2076*. Por lo tanto, se insertó un promotor del gen *aceA* cadena abajo del codon de terminación del gen *murE* de tal manera que podía producirse la transcripción en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen *murE* para inhibir de manera selectiva la expresión del gen *murE* en presencia de acetato. Para mantener la expresión de los otros siete genes excepto la del gen *murE* que se localizaba en la primera región del operón, adicionalmente se añadió el promotor del operón *murE* cadena arriba de la ORF del gen *NCgl2082*.

30 En el Ejemplo 10, se preparó un vector recombinante insertando un promotor del gen *aceA* cadena abajo del codon de terminación del gen *murE*.

35 Para obtener un fragmento de un gen *murE* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P se usó como molde, y se sintetizaron cebadores, que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en el extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI en el extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 23 y 24). Se realizó una PCR utilizando los cebadores sintetizados para obtener un fragmento de ADN que incluía 300 pares de bases entre el nucleótido 1267 desde el codon de inicio del gen *murE* y el nucleótido 1566 que era un codon de terminación. Además, se sintetizaron cebadores diseñados para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI en un extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 25 y 26). Se realizó una PCR utilizando los cebadores sintetizados para obtener un fragmento de ADN que incluía 292 pares de bases desde el nucleótido 10 cadena abajo del codon de terminación del gen *murE*. Se realizó una PCR en las mismas condiciones que las del Ejemplo 2. Los dos productos de amplificación de la PCR y un vector pDZ para la introducción cromosómica que ya se había preparado escindiendo con una enzima de restricción XbaI, se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-*murE*.

SEQ ID NO: 23: mur-m1 F 5'- ccggggatcctctagaaccctcggtcagaggtgc -3'
 SEQ ID NO: 24: mur-m1 R 5'- ttgtgatcatctcgagctatccttctccgtagtaag -3'
 SEQ ID NO: 25: mur-m2F 5'- ag ctcgagatgatcacaatgacccttgg -3'
 SEQ ID NO: 26: mur-m2R 5'- gcaggtcgactctagacatgagcataaatgtcagc -3'

5 Para obtener un fragmento de un gen *aceA* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, se sintetizaron cebadores que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI en un extremo 5' del fragmento (SEQ ID NO: 27 y 28). Como molde se utilizó el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016, y los cebadores sintetizados se utilizaron para realizar una PCR para amplificar una región promotora de aproximadamente 500 pares de bases que se representaba mediante una secuencia de bases de SEQ ID NO: 1.
 10 Además, para obtener una región promotora de un operón *murE* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, como molde se usó el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y se sintetizaron cebadores que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XhoI en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 29 y 30). Se realizó una PCR utilizando los cebadores sintetizados para obtener un fragmento de ADN que incluía 300 pares de bases cadena arriba de la ORF del gen *murE*.
 15 Los dos productos de amplificación por PCR y el fragmento de ADN obtenido tratando el vector pDZ-*murE* con la enzima de restricción XhoI se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-*murE*-*PaceA*-*PmurE*.

SEQ ID NO: 27: mur-m3F 5'- tcatcagcagcactctgactacctctg -3'
 SEQ ID NO: 28: mur-m3R 5'- agaaggatagctcgagttcctgtgcggtacgtggc -3'
 20 SEQ ID NO: 29: mur-m4F 5'- agagtgcctgctgatgatcctcgattg -3'
 SEQ ID NO: 30: mur-m4R 5'- ttgtgatcatctcgagggtttctcctccacagg -3'

Ejemplo 11: Preparación de cepas en las que se insertó un promotor del gen *aceA* cadena abajo del gen *murE* y comparación de la productividad de lisina de las mismas

25 La cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P se transformó con el vector pDZ-*murE*-*PaceA*-*PmurE* preparado en el Ejemplo 10 mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 3.

La cepa en la que se insertó un promotor del gen *aceA* cadena abajo del codón de terminación del gen *murE* en el cromosoma de tal manera que la transcripción podía ocurrir en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen *murE*, se seleccionó realizando una PCR para obtener una cepa productora de L-lisina, que se denominó KCCM11016P::*murE*-*PaceA*-*PmurE*. La cepa KCCM11016P::*murE*-*PaceA*-*PmurE* preparada se verificó de manera que las secuencias de nucleótidos de la región diana obtenidas se analizó realizando una PCR utilizando la SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 26 como cebadores.
 30

La cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, que se usó como una cepa parental, y la cepa KCCM11016P::*murE*-*PaceA*-*PmurE* preparada, se cultivaron mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 4, y se midió la concentración de la L-lisina recuperada de las soluciones de cultivo. En la Tabla 9 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo de la cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y de la cepa KCCM11016P::*murE*-*PaceA*-*PmurE* cuando no se añade acetato.
 35

Tabla 9. Variación de la producción de L-lisina (sin añadir acetato)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	43,5	43,9	44,0
KCCM11016P:: <i>murE</i> - <i>PaceA</i> - <i>PmurE</i>	43,7	44,1	43,8

40 Además, las cepas se cultivaron mediante el mismo procedimiento excepto que se añadieron 5 g/l de acetato al medio de producción para comparar la producción de L-lisina. En la Tabla 10 se muestra la concentración de L-lisina en las soluciones de cultivo.

Tabla 10. Variación de la producción de L-lisina (5 g/l de acetato añadido)

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	45,2	45,6	45,3
KCCM11016P:: <i>murE</i> - <i>PaceA</i> - <i>PmurE</i>	46,6	46,9	46,5

45 Como se muestra en Tabla 9, en ausencia de acetato, la productividad de L-lisina de la cepa KCCM11016P::*murE*-*PaceA*-*PmurE* no era diferente de la de la cepa parental KCCM11016P.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 10, en presencia de acetato, la productividad de L-lisina de la cepa KCCM11016P::murE- PaceA-PmurE fue más de 2,8 % más alta que la de la cepa parental KCCM11016P.

Ejemplo 12: Preparación de un vector para inhibir la expresión del gen *dapA*

5 La ruta biosintética de la L-lisina utilizando el mismo sustrato que el de la ruta biosintética de la L-treonina puede debilitarse para aumentar la productividad de L-treonina. Un ejemplo de los procedimientos de debilitamiento de la ruta biosintética de L-lisina es disminuir la actividad enzimática de la dihidrodipicolinato sintasa (*dapA*, NCg1896) que está implicada en la producción de lisina a partir de aspartato.

10 En *Corynebacterium glutamicum*, el gen *dapA* forma el operón *dapA*-ORF4 con el gen *ORF4* (NCg1895), y por tanto el terminador de la transcripción del gen *dapA* existe cadena abajo del gen *ORF4*. Además, se notificó que existía un promotor cadena arriba del operón *dap*-ORF4 que está cadena arriba del gen *dapA*, y que existía un segundo promotor cadena arriba del gen *ORF4* (Patek y col., *Biotechnology letters*, 19: 1113-1117, 1997). Por lo tanto, se insertó un promotor del gen *aceA* cadena abajo del codon de terminación del gen *dapA* de tal manera que la transcripción puede producirse en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen *dapA* para inhibir de manera selectiva la expresión del gen *dapA* en presencia de acetato. Para mantener la expresión del gen *ORF4*, se añadió una secuencia de región promotora de aproximadamente 100 pares de bases en el gen *ORF4* cadena arriba en la ORF cadena arriba del gen *ORF4*.

En el Ejemplo 12, se preparó un vector recombinante insertando un promotor del gen *aceA* cadena abajo del codon de terminación del gen *dapA*.

20 Para obtener un fragmento de un gen *dapA* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, como molde se usó el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y se sintetizaron cebadores que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en un extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SpeI en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 31 y 32). Se realizó una PCR utilizando los cebadores sintetizados para obtener un fragmento de ADN que incluía 301 pares de bases entre el nucleótido 606 del codon de inicio del gen de *dapA* y el nucleótido 906 que era un codon de terminación. Además, se sintetizaron cebadores, que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SpeI en un extremo 5' del fragmento y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción XbaI en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NOs: 33 y 34). A través de una PCR, se obtuvo un fragmento de ADN que adicionalmente incluía una secuencia de región promotora de aproximadamente 100 pares de bases entre el nucleótido 809 del codon de inicio del gen *dapA* y el nucleótido 2 en el codon de terminación cadena abajo, para mantener la expresión del gen *ORF4*, y 213 pares de bases del codon de terminación del gen *dapA*. La PCR se realizó en las mismas condiciones que las del Ejemplo 2. Los dos productos de amplificación de la PCR y un vector pDZ para la introducción cromosómica que ya se había preparado mediante la escisión con una enzima de restricción XbaI, se clonaron utilizando un kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-*dapA*.

35 SEQ ID NO: 31: *dapA*-d1 F 5'- ccggggatcctctaga tgtttgcttgctttgggc -3'
 SEQ ID NO: 32: *dapA*-d1 R 5'- gttgatgcactagttatagaactccagcttt-3'
 SEQ ID NO: 33: *dapA*-d2F 5'- ttctataaactagtgcatcaacgtaggagatcc -3'
 SEQ ID NO: 34: *dapA*-d2R 5'- gcaggtcgcactctagacgttctgggaaccctgag -3'

40 Para obtener un fragmento promotor de un gen *aceA* procedente de *Corynebacterium glutamicum*, se sintetizaron cebadores que se diseñaron para que tuviesen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción SpeI en un extremo 5' y en un extremo 3' del fragmento (SEQ ID NO: 35 y 36). La PCR se realizó utilizando como molde el ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y los cebadores sintetizados para amplificar una región promotora de aproximadamente 500 pares de bases que se representaba por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. El producto amplificado de la PCR y un fragmento de ADN, que se obtuvo tratando un vector pDZ-*dapA* con la enzima de restricción SpeI, se clonaron utilizando el kit de clonación In-fusion (TAKARA, JP) para preparar un vector pDZ-*dapA*-PaceA.

SEQ ID NO: 35: PaceA-d3F 5'- acgttgatgc actagt agcactctgactacctctg -3'
 SEQ ID NO: 36: PaceA-d3R 5'- agttctataa actagt ttctgtgctgctgacgtggc -3'

50 Ejemplo 13: Preparación de cepas en las que se inserta el promotor del gen *aceA* cadena abajo del gen *dapA* y comparación de la productividad de treonina de las mismas

Para verificar el efecto de la inhibición de la expresión del gen *dapA* en una cepa productora de L-treonina, el vector pDZ-*dapA*- PaceA preparado en el Ejemplo 12 se transformó mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 3 en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P (patente coreana n.º 2013-0061570) que es una cepa productora de L-treonina. La cepa en la que se insertó el promotor del gen *aceA* cadena abajo del codon de terminación del gen *dapA* en el cromosoma de tal manera que podía producirse la transcripción en una dirección opuesta a la dirección original de la transcripción del gen *dapA* se seleccionó realizando una PCR, que se denominó KCCM11222P::*dapA*-PaceA. La cepa KCCM11222P::*dapA*-PaceA preparada se verificó de manera que la secuencia de nucleótidos de la región diana obtenida se analizó realizando una PCR utilizando la SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO:

34 como cebadores.

La cepa de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P, que se utilizó como una cepa parental, y la cepa KCCM11222P::dapA-PaceA preparada se cultivaron mediante el procedimiento descrito más adelante.

- 5 Cada una de las cepas se inoculó respectivamente a 25 ml de un medio de siembra en matraces deflectores angulares de 250 ml, seguido de un cultivo con agitación a 200 rpm a 30 °C durante 20 horas. Después de esto, se añadió 1 ml de la solución de cultivo de siembra a un matraz deflector angular de 250 ml incluyendo 24 ml de un medio de producción, seguido de un cultivo con agitación a 200 rpm a 30 °C durante 48 horas a 200 rpm. Las composiciones respectivas del medio de siembra y los medios de producción se describen a continuación.

<Medio de siembra (pH 7,0)>

- 10 glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄·7(H₂O) 0,5 g, biotina 100 µg, HCL tiamina 1.000 µg, pantotenato de calcio 2.000 µg, nicotinamida 2.000 µg (con referencia a 1 l de agua destilada).

<Medio de producción (pH 7,0)>

- 15 glucosa 100 g, (NH₄)₂SO₄ 20 g, proteína de soja 2,5 g, sólidos de macerado de almidón 5 g, urea 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7(H₂O) 0,5 g, biotina 100 µg, HCL tiamina 1.000 µg, pantotenato de calcio 2.000 µg, nicotinamida 3.000 µg, CaCO₃ 30 g (con referencia a 1 l de agua destilada).

Después del cultivo, la concentración de L-treonina en la solución de cultivo se midió mediante HPLC. En la Tabla 11 se muestra la concentración de L-treonina en las soluciones de cultivo de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11222P y KCCM11222P::dapA-PaceA cuando no se añade acetato.

- 20 Tabla 11. Variación de la producción de L-treonina (sin añadir acetato)

Cepa	Treonina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11222P	7,0	6,9	7,2
KCCM11222P::dapA-PaceA	7,1	7,3	7,0

Además, las cepas se cultivaron mediante el mismo procedimiento excepto que se añadieron 5 g/l de acetato al medio de producción para comparar la producción de L-treonina. En la Tabla 12 se muestra la concentración de L-treonina en las soluciones de cultivo.

- 25 Tabla 12. Variación de la producción de L-treonina (5 g/l de acetato añadido)

Cepa	Treonina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11222P	7,6	7,4	7,7
KCCM11222P::dapA-PaceA	11,2	11,5	11,4

Como se muestra en Tabla 11, en ausencia de acetato, la productividad de L-treonina de la cepa KCCM11222P::dapA-PaceA no era diferente de la de la cepa parental KCCM11222P.

- 30 Sin embargo, como se muestra en la Tabla 12, en presencia de acetato, la productividad de L-treonina de la cepa KCCM11222P::dapA-PaceA fue más del 50 % superior que la de la cepa parental KCCM11222P.

[Número de registro]

Nombre del centro de investigación: colección coreana de cultivos tipo (internacional)

Número de registro: KCCM11432P

Fecha de registro: 12 de junio de 2013

- 35 Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con una o más de las realizaciones anteriores de la presente invención, puede utilizarse un promotor inducible por acetato para producir de un modo eficaz L-aminoácidos, dado que un L-aminoácido diana puede producirse en un alto rendimiento debilitando la expresión de un gen diana añadiendo acetato a un tiempo apropiado.

- 40 Aunque se han descrito una o más realizaciones de la presente invención con referencia a las figuras, los expertos en la materia han de entender que pueden realizarse diversos cambios en cuanto a la forma y detalles en su interior sin alejarse del ámbito de la presente invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

ES 2 626 048 T3

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Procedimiento de producción de L aminoácidos

5 <130> PX047465OV

<150> KR 2013/0121090
<151> 11-10-2013

10 <150> KR 2014/0091307
<151> 19-07-2014

<160> 36

15 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
<211> 522
<212> ADN

20 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<221> gen
<222> (1)..(486)

25 <223> aceA

<400> 1

agcactctga ctacctctgg aatctaggtg ccactcttct ttcgatttca acccttatcg	60
tgtttggcga tgtgatcaga ctaagtgatc accgtcacca gcaaaagggg tttgcgaact	120
ttactaagtc attaaccccg cctaaccccg acttttatct aggtcacacc ttcgaaacct	180
acggaacggt gcggtgcctg cattttccca tttcagagca tttgcccagt acatccgtac	240
tagcaactcc cccgccact ttttctgcga agccagaact ttgcaaactt cacaacaggg	300
gtgaccacc cgcacaaaa cttaaaaacc caaacggatt gacgcaccaa tgcccgatgg	360
agcaatgtgt gaaccacgcc accacgcaa cccgatgcaca tcacgtcgaa acagtgacag	420
tgcattagct catactttgt ggtcggcacc gccattgcg aatcagcact taaggaagtg	480
actttgatgt caaacgttgg aaagccacgt accgcacagg aa	522

30 <210> 2
<211> 340
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

35 <220>
<221> gen
<222> (1)..(340)
<223> pta

40 <400> 2

ES 2 626 048 T3

	ctttgctggg gtcagatttg tcacgctgcg cgctttcata gaccccatta atgggggggtg	60
	aagagctgta aagtaccgct aaaaactttg caaagggtgc ttcgcaactt gtaaccgctc	120
	cgtattgttt tctacggcaa taagcatttg tgctgctcaa agcgtggaat tgagatcggg	180
	ttgaaaatta caaaataaaa ctttgcaaac cgggctgtac gcaaggcggg cgaacgctaa	240
	actatgtaag aatcacaac ctccctcat tagtgccagg aggcacaagc ctgaagtgtc	300
	atcaatgaga aggttcaggc tgaaattaga aaggcgatgt	340
5	<210> 3 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> aceE P1F	
	<400> 3 ccgggatcc tctagacctc cggccatac gttgc	35
15	<210> 4 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> aceE P1R	
	<400> 4 ttgagactag ttattcctca ggagcgttg	30
25	<210> 5 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> aceE P2F	
35	<400> 5 gaataactag tctcaaggga cagataaatc	30
40	<210> 6 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> aceE P2R	
	<400> 6 gcaggctgac tctagagacc gaaaagatcg tggcag	36
50	<210> 7 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> PaceA P3F	
55	<400> 7	

ES 2 626 048 T3

gtcccttgag actagtagca ctctgactac ctctg 35

5 <210> 8
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> PaceA P3R

<400> 8
ctgaggaata actagtttcc tgtgcggtac gtggc 35

15 <210> 9
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> aceE P4F

<400> 9
ccggggatcc tctagaggtc ccaggcgact acacc 35

25 <210> 10
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> aceE P4R

35 <400> 10
gagctactag tacgacgaat cccgccgcca gacta 35

40 <210> 11
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aceE P5F

45 <400> 11
gtcgtactag tagctctttt tagccgagga acgcc 35

50 <210> 12
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> aceE P5R

55 <400> 12
gcaggtcgac tctagacatg ctgttggatg agcac 35

60 <210> 13
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PaceA P6F

65 <400> 13

ES 2 626 048 T3

aaaaagagct actagtagca ctctgactac ctctg 35
 <210> 14
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> PaceA P6R
 10
 <400> 14
 gattcgtcgt actagtttcc tgtgcggtac gtggc 35
 <210> 15
 <211> 36
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Ppta P7F
 20
 <400> 15
 gtcccttgag actagtcttt gctgggggtca gatttg 36
 25 <210> 16
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Ppta P7R
 <400> 16
 35 ctgaggaata actagtacat cgcctttcta attc 35
 <210> 17
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> hom h1F
 <400> 17
 45 ccgggatcc tctagaccag gtgagtccac ctacg 35
 <210> 18
 <211> 35
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> hom h1R
 55 <400> 18
 gaggcggatc actagttag tcccttcga ggcgg 35
 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> hom h2F
 65 <400> 19

ES 2 626 048 T3

	actagtgatc cgctcgaaa gggac	25
5	<210> 20 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> hom h2R	
	<400> 20 gcaggctgac tctagagact gcggaatgtt gttgtg	36
15	<210> 21 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> PaceA h3F	
25	<400> 21 gaggcggatc actagtagca ctctgactac ctctg	35
30	<210> 22 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> PaceA h3R	
40	<400> 22 aagggactaa actagttcc tgtgcggtac gtggc	35
45	<210> 23 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> mur m1F	
55	<400> 23 ccgggatcc tctagaaacc ctcgttcaga ggtgc	35
60	<210> 24 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> mur m1R	
	<400> 24 ttgtgatcat ctcgagctat ccttctccg tagtaag	37
	<210> 25 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> mur m2F	
	<400> 25	

ES 2 626 048 T3

agctcgagat gatcacaatg acctctgg 28
 <210> 26
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> mur m2R
 10
 <400> 26
 gcaggtcgac tctagacatg agcataaatg tcagc 35
 <210> 27
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> mur m3F
 20
 <400> 27
 tcatcagcag cactctgact acctctg 27
 25 <210> 28
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> mur m3R
 <400> 28
 35 agaaggatag ctcgagttcc tgtgcggtac gtggc 35
 <210> 29
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> mur m4F
 <400> 29
 45 agagtctgctc tgatgatcct cgatttg 27
 <210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> mur m4R
 55 <400> 30
 ttgtgatcat ctcgagggtt ttctctctc cacagg 36
 <210> 31
 <211> 35
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> dapA d1F
 65 <400> 31

ES 2 626 048 T3

	ccgggatcc tctagatgtt tggcttgctt tgggc	35
5	<210> 32 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> dapA d1R	
	<400> 32 gttgatgcac tagttatag aactccagct tt	32
15	<210> 33 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> dapA d2F	
	<400> 33 ttctataaac tagtgcatca acgtaggaga tcc	33
25	<210> 34 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> dapA d2R	
35	<400> 34 gcaggtgcac tctagacggt ctggaaccc tgag	34
40	<210> 35 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> PaceA d3F	
	<400> 35 acgttgatgc actagtagca ctctgactac ctctg	35
50	<210> 36 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> PaceA d3R	
	<400> 36 agttctataa actagtttcc tgtgcggtac gtggc	35

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de L-aminoácidos, comprendiendo el procedimiento

- 5 1) cultivar un microorganismo corineforme recombinante capaz de producir L-aminoácidos, en el que el microorganismo corineforme recombinante tiene un promotor inducible por acetato cadena abajo de un codon de terminación de un gen diana en un cromosoma; y
2) añadir acetato durante el cultivo para debilitar la expresión del gen diana, y para intensificar la capacidad de producción de L-aminoácidos del microorganismo corineforme recombinante,

en el que el promotor inducible por acetato está en una dirección opuesta a la transcripción del gen diana.

10 2. El procedimiento de producción de L-aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cadena abajo del codón de terminación está entre el codón de terminación y la cadena arriba de un terminador de transcripción del gen diana.

3. El procedimiento de producción de L-aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el promotor inducible por acetato se representa por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

15 4. El procedimiento de producción de L-aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el gen diana es al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en un gen que codifica una subunidad E1 de la piruvato deshidrogenasa, un gen que codifica una homoserina deshidrogenasa, un gen que codifica un gen UDP-N-acetilmuramoilalanil-D-glutamato-2,6-diaminopimelato ligasa y un gen que codifica una dihidrodipicolinato sintasa.

5. El procedimiento de producción de L-aminoácidos de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el L-aminoácido es L-lisina o L-treonina.

20

FIG. 1

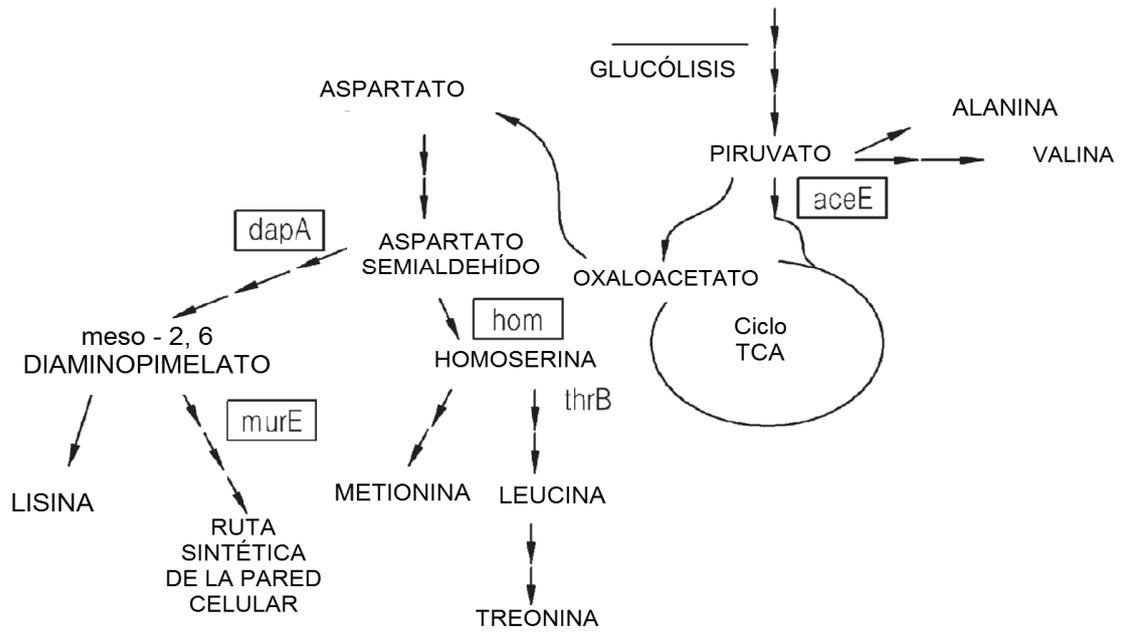


FIG. 2A

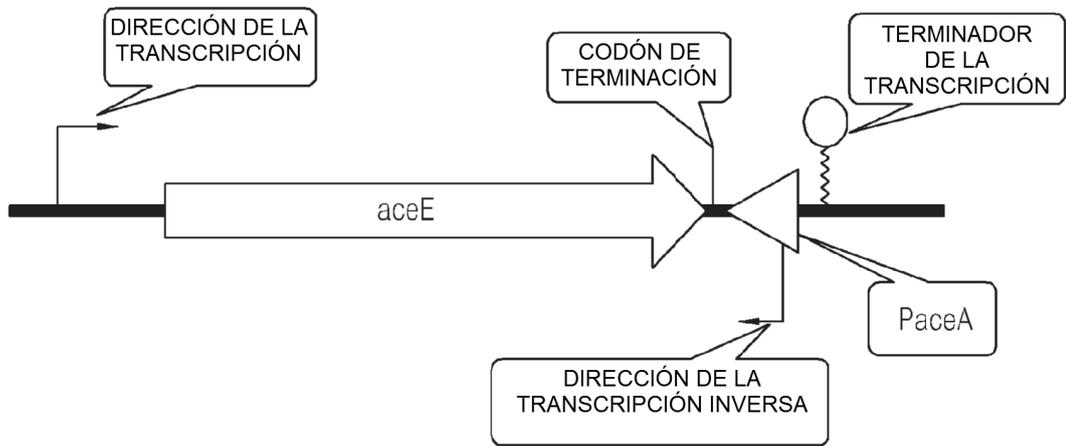


FIG. 2B

