

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 582**

51 Int. Cl.:

**C12P 13/08** (2006.01)

**C12N 15/70** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/61** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2014 PCT/CN2014/070228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14121669**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2014 E 14748825 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2824186**

54 Título: **Método de generación de L-lisina por medio de bacterias fermentadoras que poseen un gen de aconitasa y/o un elemento regulador modificado**

30 Prioridad:

**08.02.2013 CN 201310050196**  
**08.02.2013 CN 201310050144**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.06.2018**

73 Titular/es:

**NINGXIA EPPEN BIOTECH CO. LTD (100.0%)**  
**Yanghe Industry Garden Yongning Yinchuan**  
**Ningxia 750100, CN**

72 Inventor/es:

**MA, JIYIN;**  
**WEN, TINGYI;**  
**CHEN, JINLONG;**  
**LIANG, YONG;**  
**LIU, SHUWEN;**  
**WEI, AIYING;**  
**YANG, LIPENG;**  
**REN, RUI;**  
**MENG, GANG;**  
**ZHAO, CHUNGUANG;**  
**ZHANG, YUN;**  
**SHANG, XIULING y**  
**GUO, XIAOWEI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 673 582 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

Método de generación de L-lisina por medio de bacterias fermentadoras que poseen un gen de aconitasa y/o un elemento regulador modificado

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere al campo de la fermentación de aminoácidos y, específicamente, se refiere a un método para producir L-lisina mediante fermentación y a métodos y usos derivados del método, así como a bacterias empleadas en estos métodos y usos.

**Técnica anterior**

- 10 La producción de L-lisina mediante fermentación con bacterias productoras de L-lisina (por ejemplo, *E. coli* del género *Escherichia* y bacterias del género *Corynebacterium*) se ha utilizado mucho en la industria. Estas bacterias pueden aislarse a partir del entorno natural y/o pueden obtenerse mediante mutagénesis o modificación genética. La técnica anterior se centra en modificaciones genéticas de genes, tales como *pnt*, *dap*, *ppc* y similares, y no ha tomado en cuenta los elementos reguladores de los genes que codifican una aconitasa (por ejemplo, aconitasa A de *Escherichia coli*, una aconitasa de *Corynebacterium glutamicum* o *Corynebacterium pekinense*) para la producción
- 15 de L-lisina. Por ejemplo, Mitsuhashi *et al.*, 2006, analizan la alteración de la malato:quinona oxidoreductasa, el documento US5766925 analiza la modificación del gen que codifica la aspartoquinasa, y el documento US 2002/0072099 analiza los genes que codifican *sucC* y *sucD* para aumentar la producción de L-lisina. Además, la técnica anterior analiza el aumento de la actividad de la acetohidroxiácido sintasa para aumentar la producción de la biosíntesis de valina en *Corynebacterium glutamicum* (Ruklisha *et al.*, 2007).

- 20 La aconitasa es una enzima del ciclo de los ácidos tricarbóxicos que cataliza reacciones químicas en dos etapas: la transformación del ácido cítrico en ácido aconítico, y la transformación del ácido aconítico en ácido isocítrico. En la conocida bacteria *Escherichia*, el gen *acnA*, cuya secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO:1, codifica la aconitasa A. Sin embargo, quizá debido a que su metabolito está muy lejano del producto final de L-lisina, así como por sus muchas y complejas ramificaciones del metabolismo de los intermedios, no se ha sugerido su papel en la
- 25 fermentación de la L-lisina. No existen informes acerca de los efectos de una aconitasa procedente de otras bacterias productoras de L-lisina, tales como *Corynebacterium glutamicum* y similares, sobre la fermentación de la L-lisina. Las aconitasas descritas en documentos, tales como las patentes chinas CN1289368A y CN101631871A, se refieren a la fermentación del ácido L-glutámico y no indican ningún efecto sobre la fermentación de la L-lisina.

- 30 Después de largas investigaciones y prácticas, y en especial debido a la suerte, los inventores han descubierto, de modo fortuito, que una modificación de un gen de aconitasa y un elemento regulador de este conduce a un aumento en el rendimiento de la L-lisina.

- Además, en la técnica anterior, la cantidad de expresión y/o la actividad enzimática aumentan por medio del aumento en el número de copias y la introducción de una mutación dirigida a sitio de un gen de enzima útil, o una actividad enzimática y/o una cantidad de expresión se eliminan por medio de la inactivación de un gen de una
- 35 enzima perjudicial. Sin embargo, los inventores han descubierto que un gen de aconitasa y un elemento regulador de este son diferentes de los que aparecen en la técnica anterior y no pueden ser simplemente aumentados o inactivados. En especial, la eliminación de la expresión del gen *acnA* por la inactivación provoca un crecimiento lento de las bacterias y dificulta su uso práctico, de modo que se inventó un nuevo método para modificar un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este para aumentar el rendimiento de la L-lisina.

- 40 Además, el método no interfiere con los sitios de modificación en los cromosomas de una gran cantidad de bacterias productoras de L-lisina modificadas según la técnica anterior, para aumentar aún más el efecto y ser útil para producir, de modo práctico, L-lisina empleando una gran diversidad de bacterias.

**Descripción de la invención**

- 45 El problema que resuelve la invención es proporcionar un nuevo método para producir L-lisina mediante fermentación y métodos relacionados, que incluyen un método para aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina comparado con una bacteria no modificada, el uso de una bacteria modificada para producir L-lisina mediante fermentación, el uso de una bacteria modificada para aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina comparado con una bacteria no modificada y/o un método para modificar una bacteria. Además, la descripción también proporciona un polinucleótido, un vector y/o una bacteria empleados en los métodos mencionados
- 50 anteriormente.

De modo específico, en un primer aspecto, la invención proporciona un método para producir L-lisina mediante fermentación, que comprende las etapas de:

(1) modificar un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este en un cromosoma de una bacteria, de modo que la actividad y/o la cantidad de expresión de la aconitasa de la bacteria se reduce, pero no se elimina; y

(2) producir L-lisina mediante fermentación con la bacteria obtenida mediante la modificación de la etapa (1), en el que la modificación del gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este incluye:

(i) una sustitución de GTG en el codón de inicio de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 del gen de aconitasa en el cromosoma de una *Escherichia coli* productora de L-lisina por GTG;

5 (ii) una sustitución de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:4 de un promotor del gen de aconitasa en el cromosoma de una *Escherichia coli* productora de L-lisina por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3;

(iii) una sustitución de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:6 de un promotor del gen de aconitasa en el cromosoma de una *Corynebacterium glutamicum* o *Corynebacterium pekinense* productora de L-lisina por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:5;

10 (iv) una delección de 90 nucleótidos antes del codón de fin en la secuencia de nucleótidos del gen de aconitasa de SEQ ID NO:1 en el cromosoma de una *Escherichia coli* productora de L-lisina; o

(v) una adición en la secuencia de nucleótidos de un represor de la transcripción (SEQ ID NO:7) del gen de aconitasa, preferiblemente una adición de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:8 y 7 en tándem.

15 El término "modificación" empleado en la presente significa un cambio de un objeto que debe modificarse y que produce cierto efecto. Las técnicas de modificación de un gen o de un elemento regulador en un cromosoma incluyen, pero no se limitan a mutagénesis, mutación dirigida a sitio y/o recombinación homóloga, preferiblemente las dos últimas. La modificación de un gen o un elemento regulador en un cromosoma es una adición, una delección o una sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen o del elemento regulador. Estas técnicas se describen a fondo en documentos de la biología molecular y de la microbiología, y muchas están disponibles en el mercado. En las realizaciones de la descripción, la modificación puede realizarse según el principio de la recombinación homóloga empleando el plásmido pKOV disponible en el mercado en Addgene o empleando el plásmido pK18mobsacB, de modo que un gen de aconitasa no modificado y/o un elemento regulador de este en un cromosoma bacteriano se modifica para convertirse en un nuevo gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este, y la cantidad de expresión y/o la actividad enzimática de la aconitasa en la bacteria modificada se reduce, pero no se elimina. Por tanto, preferiblemente la modificación empleada en la presente es una modificación mediante recombinación homóloga.

20 Después de largas investigaciones, los inventores han descubierto que, en *Escherichia coli*, en bacterias del género *Corynebacterium* y similares, la eliminación de la expresión de una aconitasa empleando técnicas tales como la inactivación de un gen, provoca el crecimiento lento de las bacterias e incluso no se producen aminoácidos. Por tanto, la modificación de la invención reduce, pero no elimina la cantidad de expresión de la aconitasa de la bacteria obtenida mediante la modificación, comparado con la bacteria sin la modificación. Preferiblemente, la cantidad de expresión de la aconitasa A de la bacteria obtenida mediante la modificación se reduce en 20%-95%, más preferiblemente en 50%-90%, por ejemplo, en 65%, 70% o 80%.

35 Por consiguiente, la descripción también proporciona otros usos o métodos. Por ejemplo, en un segundo aspecto, la invención proporciona un método para aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina, que comprende las etapas de:

(1) modificar un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este en un cromosoma de una bacteria, de modo que la actividad y/o la cantidad de expresión de la aconitasa de la bacteria se reduce, pero no se elimina; y

(2) producir L-lisina mediante fermentación con la bacteria obtenida mediante la modificación de la etapa (1).

40 La L-lisina es un metabolito importante de las bacterias, y la mayoría de las bacterias pueden generar una cantidad mayor o menor de L-lisina. Aunque las bacterias productoras de L-lisina con un bajo rendimiento no son adecuadas para producir L-lisina de modo eficaz y barato, los métodos de la invención pueden provocar un aumento en la L-lisina y pueden emplearse en un área que no se vea afectada por el coste. Sin duda, una bacteria preferida empleada en la presente es una bacteria productora de L-lisina con alto rendimiento, y su rendimiento puede aumentar aún más empleando los métodos de la invención. Además, en los métodos o usos de la invención, excepto por la modificación en el gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este en un cromosoma de una bacteria, no se realizan más modificaciones. Por ejemplo, un gen de aconitasa en un cromosoma bacteriano puede no modificarse, mientras que un elemento regulador del gen de aconitasa sí se modifica, y viceversa. Por ejemplo, puede modificarse solo uno de un gen de aconitasa y un elemento regulador de este en un cromosoma de una bacteria, en especial una bacteria productora de L-lisina con alto rendimiento.

55 Por ejemplo, en un tercer aspecto, la descripción proporciona el uso de una bacteria obtenida mediante una modificación para producir L-lisina mediante fermentación, en el que la modificación consiste en modificar un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este en un cromosoma de una bacteria, y la actividad enzimática y/o la cantidad de expresión de la aconitasa de la bacteria obtenida mediante la modificación se reduce, pero no se elimina.

La bacteria obtenida mediante la modificación puede emplearse sola, con otras bacterias productoras de L-lisina, o con otros medios para producir L-lisina mediante fermentación. A menos que se indique lo contrario (por ejemplo, sin que aparezca la definición de "obtenida mediante la modificación"), el término "bacteria" empleado en la presente significa una bacteria no modificada o una bacteria sin la modificación, un gen de aconitasa y un elemento regulador localizado alrededor del locus del gen en un cromosoma, que son un gen de aconitasa y un elemento regulador que no presentan la disminución de la actividad enzimática y/o la cantidad de expresión de la aconitasa, por ejemplo, un gen de aconitasa y un elemento regulador de una bacteria de tipo salvaje.

Por ejemplo, en un cuarto aspecto, la descripción proporciona el uso de una bacteria obtenida mediante una modificación para aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina, en el que la modificación consiste en modificar un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este en un cromosoma de una bacteria, y la actividad enzimática y/o la cantidad de expresión de la aconitasa de la bacteria obtenida mediante la modificación se reduce, pero no se elimina.

Tal como se emplea en la presente, la bacteria puede ser una bacteria productora de L-lisina, por ejemplo, una bacteria del género *Escherichia* o *Corynebacterium*. En un aspecto preferible, la bacteria puede ser una bacteria del género *Escherichia*, más preferiblemente *Escherichia coli*, por ejemplo, cepas filiales de *Escherichia coli* K-12, que incluyen cepas derivadas de la cepa W3110. En otro aspecto preferible, la bacteria puede ser una bacteria del género *Corynebacterium*, más preferiblemente *Corynebacterium glutamicum* o *Corynebacterium pekinense*. Debido a que pocos documentos de la técnica anterior sugieren un papel de un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este procedente de una bacteria en la producción/fermentación de la L-lisina y se centran en loci tales como *pnt*, *dap*, *ppc* y similares, para modificar los genes en los cromosomas, no existen informes acerca de una modificación de un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este en bacterias productoras de L-lisina (en especial, bacterias del género *Escherichia* o *Corynebacterium*, por ejemplo, *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* o *Corynebacterium pekinense*) en la técnica anterior y, por tanto, las bacterias productoras de L-lisina sustancialmente poseen genes de aconitasa y sus elementos reguladores de tipo salvaje. Por tanto, pueden ser modificadas empleando los métodos de la invención para aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina. En las realizaciones de la invención, todas las bacterias productoras de L-lisina con alto o bajo rendimiento pueden modificarse empleando los métodos de la invención para aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina.

Sustancialmente, en un quinto aspecto, la descripción proporciona un método para modificar una bacteria, que comprende la etapa de modificar un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este en un cromosoma de una bacteria, de modo que la actividad y/o la cantidad de expresión de la aconitasa de la bacteria obtenida mediante la modificación se reduce, pero no se elimina.

La bacteria obtenida mediante el método del quinto aspecto de la descripción puede emplearse para producir o generar L-lisina mediante fermentación. Por tanto, en un sexto aspecto, la descripción proporciona una bacteria obtenida mediante el método del quinto aspecto de la descripción.

Según los experimentos de los inventores, muchas secuencias de nucleótidos de genes de aconitasa (*acnA*) procedentes de bacterias del género *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*) se muestran en SEQ ID NO:1, mientras que muchas secuencias de nucleótidos de genes de aconitasa procedentes de bacterias del género *Corynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum* o *Corynebacterium pekinense*) se muestran en SEQ ID NO:2. La modificación de estos genes de aconitasa para reducir, pero no eliminar, la actividad enzimática y/o la expresión de las aconitasas en las bacterias modificadas puede aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina. Por tanto, en la invención, la secuencia de nucleótidos del gen de aconitasa se muestra en SEQ ID NO:1 o 2. Para otras bacterias, pueden obtenerse las secuencias de nucleótidos de genes de aconitasa de las bacterias mediante técnicas tales como secuenciación y comparando identidades de secuencias para la modificación de los métodos de la invención.

En la descripción, la etapa preferible de modificar un gen de aconitasa en un cromosoma de una bacteria es una adición, una delección o una sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen de aconitasa, con la condición de que la actividad enzimática y/o la cantidad de expresión de la aconitasa procedente de la bacteria modificada se reduzca, pero no se elimine.

Según la experiencia de los inventores, aunque habitualmente es difícil aumentar la actividad y/o la cantidad de expresión de una enzima bacteriana porque la bacteria ha ido evolucionando a lo largo de mucho tiempo y los sitios de modificación para el aumento deben investigarse cada uno en concreto, la investigación para la disminución de la actividad y/o de la cantidad de expresión de la enzima es mucho más fácil. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos extraída de los dominios de una enzima puede mutarse. En la descripción, la etapa preferible de modificar un gen de aconitasa en un cromosoma de una bacteria puede ser la sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen de aconitasa. Para la invención, la sustitución es en el codón de inicio del gen de aconitasa y es una sustitución de GTG. Puede realizarse en *Escherichia coli*. Además, en la descripción, la etapa preferible de modificar un gen de aconitasa en un cromosoma de una bacteria puede ser la delección de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen de aconitasa. Para la invención, la delección es una delección de 90 nucleótidos antes del codón de fin en la secuencia de nucleótidos del gen de aconitasa. Puede realizarse en *Escherichia coli*.

Tal como se emplea en la presente, un elemento regulador significa un polinucleótido localizado cadena arriba o cadena abajo de un gen (por ejemplo, un gen de aconitasa) que regula la transcripción y/o la expresión del gen para producir un efecto en la cantidad de expresión del gen. Puede incluir secuencias codificadoras y no codificadoras. Un elemento regulador puede ser un promotor, un potenciador, un represor u otro polinucleótido relacionado con el control de la transcripción y/o de la expresión. Un elemento regulador preferido puede ser un promotor. En la invención, la secuencia de nucleótidos del promotor se muestra en SEQ ID NO:4 o 6. Un elemento regulador preferido también puede ser un represor, por ejemplo, un represor de la transcripción. En la invención, la secuencia de nucleótidos del represor de la transcripción se muestra en SEQ ID NO:7. Mediante la modificación de un promotor y/o un represor, se reduce, pero no se elimina, una actividad enzimática y/o una cantidad de expresión de una aconitasa en una bacteria modificada.

En la descripción, la etapa preferible de modificar un elemento regulador de un gen de aconitasa en un cromosoma de una bacteria es una adición, una delección o una sustitución de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del elemento regulador del gen de aconitasa, con la condición de que la actividad enzimática y/o la cantidad de expresión de la aconitasa procedente de la bacteria modifica se reduzca, pero no se elimine.

Según la experiencia de los inventores, aunque habitualmente es difícil aumentar la actividad de transcripción de un promotor o potenciador de una bacteria porque la bacteria ha ido evolucionando a lo largo de mucho tiempo y los sitios de modificación para el aumento deben investigarse cada uno en concreto, la investigación para la disminución de la actividad de transcripción del promotor o potenciador es mucho más fácil. Por ejemplo, pueden añadirse una o varias secuencias de nucleótidos para aumentar la distancia entre un promotor y el codón de inicio de un gen, o el promotor original puede sustituirse por un promotor con una actividad de transcripción débil. En la descripción, la etapa preferible de modificar un elemento regulador de un gen de aconitasa en un cromosoma de una bacteria puede ser la sustitución de uno o más nucleótidos en un promotor del gen de aconitasa. Para la invención, la sustitución por un promotor con una actividad de transcripción débil es una sustitución con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:3 o 5.

Además, en la descripción, la etapa preferible de modificar un elemento regulador de un gen de aconitasa en un cromosoma de una bacteria puede ser la adición de la secuencia de nucleótidos de un represor de la transcripción para el gen de aconitasa, por ejemplo, la adición de la secuencia de nucleótidos de un nuevo represor de la transcripción o el aumento del número de copias de la secuencia de nucleótidos de un represor de la transcripción original. Un represor de la transcripción puede añadirse detrás de un promotor (en especial un promotor con una fuerte actividad de transcripción) para aumentar su cantidad de expresión e inhibir la transcripción de un gen de aconitasa con mayor eficacia. En la invención, se añade la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:8 y 7 en tándem.

Además, la descripción también proporciona productos intermedios, tales como un polinucleótido y/o vector empleado en los métodos mencionados anteriormente. Por ejemplo, en un séptimo aspecto, la descripción proporciona un polinucleótido, cuya secuencia de nucleótidos se selecciona de:

(a) la secuencia de nucleótidos obtenida mediante una sustitución (preferiblemente de GTG) en el codón de inicio de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1;

(b) la secuencia de nucleótidos obtenida mediante una delección (preferiblemente de 1-120 nucleótidos, más preferiblemente de 1-90 nucleótidos, lo más preferiblemente de 90 nucleótidos) en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 o 2, por ejemplo, una delección de 90 nucleótidos antes del codón de fin en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1 o 2; y

(c) la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:8 y 7 en tándem.

En un octavo aspecto, la descripción proporciona un vector que comprende el polinucleótido del séptimo aspecto de la descripción.

En un noveno aspecto, la descripción proporciona un uso del polinucleótido del séptimo aspecto de la descripción y/o el vector del octavo aspecto de la descripción en el método o el uso del primer, segundo, tercer y/o cuarto aspecto de la descripción. Es decir, en los métodos o usos del primer, segundo, tercer y/o cuarto aspecto de la descripción, se emplea el polinucleótido del séptimo aspecto de la descripción y/o el vector del octavo aspecto de la descripción.

En un décimo aspecto, la descripción proporciona un uso del polinucleótido del séptimo aspecto de la descripción y/o el vector del octavo aspecto de la descripción en la preparación de la bacteria del quinto aspecto de la descripción. Es decir, en el proceso de preparación de la bacteria del quinto aspecto de la descripción, se emplea el polinucleótido del séptimo aspecto de la descripción y/o el vector del octavo aspecto de la descripción.

Los efectos beneficiosos de la descripción incluyen las nuevas técnicas que se han inventado y probado para aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina cuando se emplean bacterias productoras de L-lisina con alto y bajo rendimiento, y no se interfiere en los sitios de modificación en los cromosomas de una gran cantidad de bacterias productoras de L-lisina con alto rendimiento modificadas según la técnica anterior, para aumentar aún más

el rendimiento, ser útiles para producir de modo práctico L-lisina mediante la fermentación de las bacterias, y ser fáciles de popularizar.

Para entender mejor la invención, esta se describirá a continuación con mayor detalle haciendo referencia a ejemplos específicos. Debe advertirse que los ejemplos solo ejemplifican la invención. Según la descripción de la invención, diversas modificaciones y alteraciones de la invención son obvias para los expertos en la técnica.

### Ejemplos

Las realizaciones de la invención se ejemplifican mediante los siguientes ejemplos. A menos que se indique lo contrario, las técnicas empleadas en los ejemplos son muy conocidas por los expertos en la técnica y emplean dispositivos y reactivos disponibles en el mercado (véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª edición), Science Press, *Microbiology Experiments* (4ª edición), Higher Education Press, y las instrucciones de los fabricantes de los dispositivos y reactivos).

#### Ejemplo 1: Sustitución del codón de inicio ATG de la aconitasa por GTG

El cromosoma genómico de la cepa de tipo salvaje de *Escherichia coli*, *E. coli* K12 W3110 (disponible en el mercado en Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NITE Biological Resource Center, NBRC)), se extrajo como molde para la amplificación por PCR empleando los cebadores P1/P2 y P3/P4, respectivamente. Se obtuvieron dos fragmentos de ADN de 510 pb y 620 pb y se denominaron los fragmentos Up1 y Down1, respectivamente. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 30 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos. Las secuencias de los cebadores se muestran como sigue:

P1: 5'-CGCGGATCCGGAGTCGTCACCATTATGCC-3'

P2: 5'-TCTCGTAGGGTTGACGACACAGCTCCTCCTTAATGACAGG-3'

P3: 5'-CCTGTCATTAAGGAGGAGCTGTGTCGTC AACCTACGAGA-3'

P4: 5'-ATTGCGGCCGCTCCATTCACCGTCCTGCAAT-3'

Los dos fragmentos de ADN se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se mezclaron como moldes para la amplificación por PCR de solapamiento empleando los cebadores P1/P4. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1200 pb y se denominó el fragmento Up-Down1. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 60 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos.

El fragmento Up-Down1 purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y el plásmido pKOV (disponible en el mercado en Addgene) se digirieron respectivamente con *Bam* HI/*Not* I. Los productos de la digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se acoplaron para producir un vector pKOV-Up-Down1 para la posterior transformación. Se determinó que el vector pKOV-Up-Down1, mediante la secuenciación del vector en una empresa de secuenciación, poseía la mutación puntual correcta (A-G) en el fragmento génico de *acnA*, y se conservó para su uso posterior.

El plásmido construido pKOV-Up-Down1 se transformó mediante electroporación en la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *E. coli* NRRL B-12185 (disponible en el mercado en Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL); véase también el documento US4346170A para su método de construcción), y la cepa productora de L-lisina con alto rendimiento *E. coli* K12 W3110  $\Delta$ 3 (disponible en el mercado en Microbiology, Chinese Academy of Sciences; la cepa es una cepa modificada productora de L-lisina mutagenizada y mutada a partir de *E. coli* K12 W3110), respectivamente. Se determinó mediante secuenciación que las dos cepas contenían en sus cromosomas el gen de tipo salvaje de *acnA* (concretamente, los sitios 1333855 a 1336530 del n.º de registro de GenBank U00096.2) y sus elementos cadena arriba y cadena abajo. Según las instrucciones del fabricante del plásmido pKOV de Addgene, los clones positivos a la recombinación homóloga se seleccionaron después de un cultivo de recuperación en medio LB bajo las condiciones de 30 °C y 100 rpm durante 2 h, y se determinó mediante secuenciación que contenían en sus cromosomas la mutación del codón de inicio ATG a GTG en el gen de tipo salvaje de *acnA*. Por último, se obtuvieron ambas cepas productoras de lisina *E. coli* con bajo y alto rendimiento que portan la mutación del codón de inicio de *acnA* y se denominaron YP-13633 e YP-13664, respectivamente. La cantidad de expresión de las aconitasas en las dos cepas modificadas se midió y resultó reducida en aproximadamente 75-85% (valores diferentes en medios diferentes).

#### Ejemplo 2: Mutación de la secuencia del gen de aconitasa para la disminución de la actividad de la aconitasa

(1) Construcción de las cepas de *E. coli*

Se delecionaron 90 nucleótidos antes del codón de terminación en el gen *acnA* de *E. coli* para disminuir la actividad aconitasa. De modo específico, el cromosoma genómico de la cepa de tipo salvaje de *Escherichia coli*, *E. coli* K12

W3110, se extrajo como molde para la amplificación por PCR empleando los cebadores P5/P6 y P7/P8, respectivamente. Se obtuvieron dos fragmentos de ADN de 752 pb y 657 pb y se denominaron los fragmentos Up2 y Down2, respectivamente. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 30 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos. Las secuencias de los cebadores se muestran como sigue:

P5: 5'-CGCGGATCCCGTCACACGATCCGATACCT-3'

P6: 5'-CGGCAAGCAAATAGTTGTTATACGACTTCCTGGCTACCAT -3'

P7: 5'-ATGGTAGCCAGGAAGTCGTATAACAACACTATTTGCTTGCCG-3'

P8: 5'-ATTGCGGCCGC CATGGGGCGATTCCTGATG-3'

10 Los dos fragmentos de ADN se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se mezclaron como moldes para la amplificación por PCR de solapamiento empleando los cebadores P5/P8. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1400 pb y se denominó el fragmento Up-Down2. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 60 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos.

15 El fragmento Up-Down2 purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y el plásmido pKOV (disponible en el mercado en Addgene) se digirieron respectivamente con *Bam* HI/*Not* I. Los productos de la digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se acoplaron para producir un vector pKOV-Up-Down2 para la posterior transformación. Se determinó que el vector pKOV-Up-Down2, mediante la secuenciación del vector en una empresa de secuenciación, poseía la delección de 90 pb antes del codón de fin en el fragmento génico de *acnA*, y se conservó para su uso posterior.

25 Según las instrucciones del fabricante del plásmido pKOV de Addgene, el plásmido construido pKOV-Up-Down2 se transformó mediante electroporación en la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *E. coli* NRRL B-12185 (véase también el documento US4346170A para su método de construcción), y la cepa productora de L-lisina con alto rendimiento *E. coli* K12 W3110  $\Delta$ 3, respectivamente. Se determinó mediante secuenciación que las dos cepas contenían en sus cromosomas el gen de tipo salvaje de *acnA* y sus elementos cadena arriba y cadena abajo. Se seleccionaron los clones positivos a la secuenciación homóloga y se determinó, mediante secuenciación, que poseían la delección de 90 pb antes del codón de fin en el gen de *acnA* en sus cromosomas. Por último, se obtuvieron ambas cepas productoras de lisina *E. coli* con bajo y alto rendimiento, en las que las actividades enzimáticas de *acnA* están reducidas, y se denominaron YP-13675 e YP-13699, respectivamente. Las actividades de aconitasa en las dos cepas modificadas se midieron y resultaron reducidas en aproximadamente 60-80% (valores diferentes en medios diferentes).

## (2) Construcción de cepas de *Corynebacterium*

35 Se deleccionaron 90 nucleótidos antes del codón de terminación en el gen *acn* de *Corynebacterium* para disminuir la actividad aconitasa. El proceso de construcción fue sustancialmente el mismo que el de la etapa (1) mencionada anteriormente, excepto que se empleó el genoma de *Corynebacterium pekinense* AS1.299 (que es similar a *Corynebacterium glutamicum* y a veces se considera, de forma errónea, que es *Corynebacterium glutamicum*; disponible en el mercado en China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC)) como molde para una amplificación empleando los cebadores P9-P12 como sigue (que se corresponden con los cebadores P4-P8 mencionados anteriormente, respectivamente), y se obtuvo un fragmento de 542 pb (Up2), un fragmento de 527 pb (Down2), y un fragmento de aproximadamente 1069 pb (Up-Down). Las secuencias de los cebadores se muestran como sigue:

P9: 5'-CGGGATCCTGCAGCTCAGTACTTGGAT-3'

P10: 5'-AAAGTCTTCTAATTAC TTA CTGCGT CGAACTCGACG-3'

P11: 5'-GTTTCGACGCAGTAAGTAATTAGAAGACTTTTGAT-3'

45 P12: 5'-TCCCCGGGGAATACCGGGTTCGGTGCG-3'

50 Después el fragmento Up-Down2 purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y el plásmido pK18mobsacB (disponible en el mercado en American Type Culture Collection (ATCC)) se digirieron respectivamente con *Bam* HI/*Sma* I. Los productos de la digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se acoplaron para producir un vector recombinante pK18mobsacB-Up-P-Down que tiene una delección de 90 pb antes del codón de fin en el gen *acn*. El plásmido construido pK18mobsacB-Up-Down2 se verificó mediante secuenciación y se transformó, respectivamente, mediante electroporación en la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *Corynebacterium pekinense* AS1.299, la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (disponible en el mercado en ATCC), y la cepa productora de L-lisina con alto rendimiento *Corynebacterium pekinense* AS1.563 (disponible en el mercado en China General Microbiological

Culture Collection Center). Se determinó mediante secuenciación que las dos últimas cepas contienen en sus cromosomas el gen *acn* de *Corynebacterium pekinense* AS1.299, cuya secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO:2. Se seleccionaron los clones positivos a la recombinación homóloga después de un cultivo de recuperación en medio BHIS bajo las condiciones de 30 °C y 120 rpm durante 2 h, y se verificaron mediante secuenciación. Por último, se obtuvieron tres cepas productoras de L-lisina de *Corynebacterium* con rendimiento bajo, bajo y alto, respectivamente, que portan la mutación del gen *acn* y se denominaron YP-14808, YP-14852 e YP-14837.

**Ejemplo 3: Sustitución del promotor del gen de aconitasa por un promotor con una actividad de transcripción débil**

10 (1) Construcción de las cepas de *E. coli*

Mediante el análisis de la secuencia cadena arriba de *acnA* en *E. coli* K12 W3110, los inventores proporcionan un promotor con actividad de transcripción débil (cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO:3) para reemplazar la región del promotor de tipo salvaje (cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO:4) cadena arriba del ORF del gen *acnA* para disminuir la expresión del gen *acnA* de tipo salvaje.

15 De modo específico, el cromosoma genómico de la cepa de tipo salvaje de *Escherichia coli*, *E. coli* K12 W3110, se extrajo como molde para la amplificación por PCR empleando los cebadores P13/P14 y P15/P16, respectivamente. Se obtuvieron dos fragmentos de ADN de 580 pb y 618 pb y se denominaron los fragmentos Up3 y Down3, respectivamente. Se empleó un plásmido que comprende el promotor con actividad de transcripción débil mencionado anteriormente como molde para la amplificación por PCR empleando P17/P18, y se obtuvo un  
20 fragmento de promotor de 161 pb con actividad de transcripción débil y se denominó fragmento P. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 30 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos.

25 Los tres fragmentos de ADN mencionados anteriormente se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Después, los fragmentos Up3 y P se mezclaron como moldes para la amplificación por PCR de solapamiento empleando los cebadores P13/P18. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 716 pb y se denominó el fragmento Up-P. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 60 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos.

30 Los fragmentos Up-P y Down3 purificados mediante electroforesis en gel de agarosa se mezclaron como moldes para la amplificación por PCR de solapamiento empleando los cebadores P13/P16. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1334 pb y se denominó el fragmento Up-P-down. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 60 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos.

Las secuencias de los cebadores mencionados anteriormente se muestran como sigue:

- 35 P13: 5'-CGCGGATCCGAAGAAATTGAGGTCATGTT -3'  
 P14: 5'-GGTTTCTTAGACGTCGGATTCGTTTCGTTTCTGTTTCATT-3'  
 P15: 5'-ATCAGCAGGACGCACTGACCCATTAAGGAGGAGCTATGTCTG -3'  
 P16: 5'-ATTGCGGCCGCTCCATTCACCGTCCTGCAATT -3'  
 P17: 5'-AATGAAACAGAAACGAAACGCAATCCGACGTCTAAGAAACC -3'  
 40 P18: 5'-CGACATAGCTCCTCCTTAATGGGTCAGTGCCTGCTGAT -3'

45 El fragmento Up-P-down purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y el plásmido pKOV (disponible en el mercado en Addgene) se digirieron respectivamente con *Bam* HI/Not I. Los productos de la digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se acoplaron para producir un vector pKOV-Up-P-Down para la posterior transformación. Se determinó que el vector pKOV-Up-P-Down, mediante la secuenciación del vector en una empresa de secuenciación, poseía la secuencia correcta del promotor con actividad de transcripción débil y se conservó para su uso posterior.

50 El plásmido pKOV-Up-P-Down construido se transformó mediante electroporación en la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *E. coli* NRRL B-12185, y la cepa productora de L-lisina con alto rendimiento *E. coli* K12 W3110 Δ3, respectivamente. Se determinó mediante secuenciación que las dos cepas contenían en sus cromosomas el gen de tipo salvaje de *acnA* y sus elementos cadena arriba y cadena abajo, en las que el promotor cadena arriba comprende los sitios desde 2102518 a 2102713 del n.º de registro de GenBank CP004009.1. Según las instrucciones del fabricante del plásmido pKOV de Addgene, los clones positivos a la recombinación homóloga se seleccionaron después de un cultivo de recuperación en medio LB bajo las condiciones de 30 °C y 100 rpm durante 2 h, y se determinó mediante secuenciación que contenían en sus cromosomas la sustitución del promotor con



actividad de transcripción débil por el promotor de tipo salvaje cadena arriba del gen *acnA*. Por último, se obtuvieron ambas cepas productoras de lisina *E. coli* con bajo y alto rendimiento que portan la mutación promotor de *acnA* y se denominaron YP-13627 e YP-13682, respectivamente. La cantidad de expresión de las aconitasas en las dos cepas modificadas se midió y resultó reducida en aproximadamente 65-80% en diferentes medios.

## 5 (2) Construcción de cepas de *Corynebacterium*

Mediante el análisis de la secuencia cadena arriba de *acn* en *Corynebacterium*, los inventores proporcionan un promotor con actividad de transcripción débil (cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO:5) para reemplazar la región de 166 pb del promotor de tipo salvaje (cuya secuencia se muestra en SEQ ID NO:6) cadena arriba del ORF del gen *acn* de *Corynebacterium*. El proceso de construcción fue sustancialmente el mismo que el de la etapa (1) mencionada anteriormente, excepto que:

se empleó el genoma de *Corynebacterium pekinense* AS1.299 (disponible en el mercado en China General Microbiological Culture Collection Center) como molde para una amplificación empleando los cebadores P19-P24 como sigue (que se corresponden con los cebadores P13-P18 mencionados anteriormente, respectivamente), y se obtuvo un fragmento de 573 pb (Up3), un fragmento de 581 pb (Down3), un fragmento de 130 pb (P), y un fragmento de aproximadamente 1284 pb (Up-P-down). Las secuencias de los cebadores se muestran como sigue:

P19: 5'-CGGGATCCGCCAAAGCAACCAACCCC -3'

P20: 5'-CTTTTTAGTTTTCAACGGTCGGATTTGCTCGAAAT-3'

P21: 5'-GCCGAAAC AAAGTAGCCGAAGCAGACGCCGTCG -3'

P22: 5'-CGGAATTCTGACCTGGTGGACGATAC-3'

20 P23: 5'-CGAGCAAATCCGACCGTTGAAAATAAAAAGCTGG-3'

P24: 5'-GCGTCTGCTTCGGCTACTTTGTTTCGGCCACCC-3'

Después, el fragmento Up-P-down purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y el plásmido pK18mobsacB se digirieron respectivamente con *Bam* HI/*Eco* RI. Los productos de la digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se acoplaron para producir un vector recombinante pK18mobsacB-Up-P-Down para la posterior sustitución del promotor. El plásmido construido pK18mobsacB-Up-P-Down se verificó mediante secuenciación y se transformó, respectivamente, mediante electroporación en la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *Corynebacterium pekinense* AS1.299, la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, y la cepa productora de L-lisina con alto rendimiento *Corynebacterium pekinense* AS1.563. Se determinó mediante secuenciación que las dos últimas cepas contenían en sus cromosomas el gen *acn* y sus elementos cadena arriba y cadena abajo de *Corynebacterium pekinense* AS1.299. Se seleccionaron los clones positivos a la recombinación homóloga después de un cultivo de recuperación en medio BHIS bajo las condiciones de 30 °C y 120 rpm durante 2 h, y se verificaron mediante secuenciación. Por último, se obtuvieron tres cepas productoras de L-lisina de *Corynebacterium* con rendimiento bajo, bajo y alto, respectivamente, que portan la mutación del promotor de *acn* y se denominaron YP-14755, YP-14732 e YP-14780.

## 35 **Ejemplo 4: Aumento del número de copias del gen *acnR* que codifica el represor de la transcripción del gen de aconitasa**

Se aumentó el número de copias del gen *acnR* que codifica el represor de la transcripción de *acn* para disminuir el nivel de transcripción del gen *acn*. De modo específico, se empleó el genoma de *Corynebacterium pekinense* AS1.299 como molde para la amplificación por PCR empleando los cebadores P25/P26 y P27/P28, respectivamente. Se obtuvieron dos fragmentos de ADN de 715 pb y 797 pb y se denominaron los fragmentos Up4 y Down4. Se empleó el molde o una amplificación por PCR usando los cebadores P29/P30. Se obtuvo un fragmento de 567 pb de *acnR* y se denominó el fragmento R, cuya secuencia de nucleótidos se muestra en in SEQ ID NO:7. Además, se empleó el plásmido de expresión pXMJ19 (disponible en el mercado en Biovector Science Lab, Inc) como molde para la amplificación por PCR empleando los cebadores P31/P32. Se obtuvo un promotor de 164 pb  $P_{tac}$  con fuerte actividad de transcripción y se denominó el fragmento  $P_{tac}$ , cuya secuencia de nucleótidos se muestra en in SEQ ID NO:8. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 30 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos.

Las secuencias de los cebadores mencionados anteriormente se muestran como sigue:

50 P25: 5'-CGGGATCCTTCGCAACCGATAGAGCA-3'

P26: 5'-CACGAATTATGCAGAATAAGCCTTTAAGTAACAA-3'

P27: 5'-TAAACGCGACTAAGCGTGACCATTA AAAAGGCT-3'

P28: 5'-CGGAATTCAAAAGCCTATTAAGTGTC-3'

P29: 5'-TTCACACAGGAAAGTGTCCGTAGCGGCAGGCGA-3'

P30: 5'-TTTAATGGTCACGC TTAGTCGCGTTTACGGACAG-3'

P31: 5'-TTAAAGGCTTATTCTGCATAATTCGTGTGCTC-3'

5 P32: 5'-GCCGCTACGGACACTTTCCTGTGTGAAATTGTTA-3'

Los fragmentos R y  $P_{tac}$  se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se mezclaron como moldes para la amplificación por PCR de solapamiento empleando los cebadores P31/P30. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 731 pb y se denominó el fragmento  $P_{tac}$ -R. Los fragmentos Up4 y  $P_{tac}$ -R se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se mezclaron como moldes para la amplificación por PCR de solapamiento empleando los cebadores P25/P30. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1446 pb y se denominó el fragmento Up4- $P_{tac}$ -R. Los fragmentos Up4- $P_{tac}$ -R y Down4 se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se mezclaron como moldes para la amplificación por PCR de solapamiento empleando los cebadores P25/P28. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 2243 pb y se denominó el fragmento Up- $P_{tac}$ -R-Down. El proceso de la amplificación por PCR se muestra como sigue: desnaturalización durante 30 s (segundos) a 94 °C, reasociación durante 30 s (segundos) a 52 °C, extensión durante 60 s (segundos) a 72 °C, y realización de 30 ciclos.

Después, el fragmento Up- $P_{tac}$ -R-Down purificado mediante electroforesis en gel de agarosa y el plásmido pK18mobsacB se digirieron respectivamente con *Bam* HI/*Eco* RI. Los productos de la digestión se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se acoplaron para producir un vector recombinante pK18mobsacB-Up- $P_{tac}$ -R-Down para la posterior inserción de copias adicionales de *acnR* en una región no codificadora de un cromosoma. Se determinó que el vector pK18mobsacB-Up- $P_{tac}$ -R-Down, mediante la secuenciación del vector en una empresa de secuenciación, poseía los fragmentos génicos  $P_{tac}$ -*acnR* y se conservó para su uso posterior.

El plásmido construido pK18mobsacB-Up- $P_{tac}$ -R-Down se transformó, respectivamente, mediante electroporación en la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *Corynebacterium pekinense* AS1.299, la cepa productora de L-lisina con bajo rendimiento *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, y la cepa productora de L-lisina con alto rendimiento *Corynebacterium pekinense* AS1.563. Se seleccionaron los clones positivos a la recombinación homóloga después de un cultivo de recuperación en medio BHIS bajo las condiciones de 30 °C y 100 rpm durante 2 h, y se verificaron mediante secuenciación. Por último, se obtuvieron tres cepas productoras de L-lisina de *Corynebacterium* con rendimiento bajo, bajo y alto, respectivamente, en cuyas regiones no codificadoras de los cromosomas se insertaron copias adicionales del gen *acnR* y se denominaron YP-14857, YP-14896 e YP-14860.

### 30 Ejemplo 5: Experimentos de fermentación de L-lisina

Para la fermentación de *E. coli*, se inocularon 25 ml del medio de siembra mostrado en la tabla 1 en cada una de las cepas de *E. coli* K12 W3110 Δ3, *E. coli* NRRL B-12185 y *E. coli* construidas mediante los ejemplos 1-3, respectivamente, y se cultivaron bajo las condiciones de 37 °C y 220 rpm durante 9 h. Después se inocularon 25 ml del medio de fermentación mostrado en la tabla 1 con 1 ml del producto del cultivo del medio de siembra, y se cultivó bajo las condiciones de 37 °C y 220 rpm durante 48 h. Se midió el rendimiento de la L-lisina mediante HPLC después del proceso del cultivo.

Tabla 1 - Medio de cultivo para *E. coli*

	Medio de siembra	Medio de fermentación
(Ingrediente)	(g/l)	(g/l)
glucosa	15	40
sulfato de amonio	4	10
dibifosfato de potasio	3	1,6
sulfato de magnesio heptahidrato	0,4	1
sulfato ferroso heptahidrato	0,01	0,03
sulfato de manganeso monohidrato	0,01	0,03
extracto de levadura	2,0	4,0
carbonato de calcio		25

ES 2 673 582 T3

KOH	pH 7,0	pH 7,0
L-tirosina		0,1
L-metionina		0,5
L-treonina		0,1
L-isoleucina		0,05

- 5 Para la fermentación de *Corynebacterium*, se inocularon 30 ml del medio de fermentación mostrado en la tabla 2 a cada una de las cepas de *Corynebacterium* AS1.299, ATCC13032, AS1.563 y las cepas de *Corynebacterium* construidas en los ejemplos 2-4, respectivamente, y se cultivaron bajo las condiciones de 30 °C y 220 rpm durante 8 h. Después se inocularon 30 ml del medio de fermentación mostrado en la tabla 2 con 1 ml del producto del cultivo del medio de siembra, y se cultivó bajo las condiciones de 30 °C y 220 rpm durante 48 h. Se midió el rendimiento de la L-lisina mediante HPLC después del proceso del cultivo.

Tabla 2 - Medio de cultivo para *Corynebacterium*

	Medio de siembra	Medio de fermentación
(Ingrediente)	(g/l)	(g/l)
glucosa	20	40
sulfato de amonio	5	20
dibifosfato de potasio	1	1,6
sulfato de magnesio heptahidrato	0,7	0,8
sulfato ferroso heptahidrato	0,01	0,01
sulfato de manganeso monohidrato	0,01	0,01
extracto de levadura	5,0	4,0
carbonato de calcio		20
KOH	pH 7,0	pH 7,0

- 10 Los resultados se muestran en la tabla 3. La mutación (por ejemplo, delección o sustitución) de la estructura de la aconitasa de las cepas de *Escherichia coli* y *Corynebacterium* para disminuir la actividad de la enzima, o la modificación (por ejemplo, sustitución e inserción) de los elementos reguladores de los genes de aconitasa de las cepas de *Escherichia coli* y *Corynebacterium* para disminuir la cantidad de expresión de la enzima, conduce al aumento del rendimiento de la L-lisina.
- 15 Tabla 3 - Rendimiento de L-lisina según las cepas

Cepa	Rendimiento de L-lisina (g/l)	Proporción de aumento de rendimiento (%)
<i>E. coli</i> NRRL B-12185	1,5	-
YP-13633	2,1	40
YP-13675	1,8	20
YP-13627	2,0	33
<i>E. coli</i> K12 W3110 Δ3	10,2	-
YP-13664	16,1	57,8
YP-13699	12,5	22,5

ES 2 673 582 T3

YP-13682	14,1	38,2
<i>Corynebacterium</i> AS1.299	1,2	-
YP-14808	1,6	33
YP-14755	1,9	58
YP-14857	1,4	17
<i>Corynebacterium</i> ATCC 13032	1,1	-
YP-14852	1,5	36
YP-14732	2,0	82
YP-14896	1,3	18
<i>Corynebacterium</i> AS1.563	23,5	-
YP-14837	27,4	16,6
YP-14780	31,2	32,8
YP-14860	25,6	8,9

**Listado de secuencias**

<110> Ningxia EPPEN Biotech Co., Ltd

<120> Método para producir L-lisina modificando el gen de aconitasa y/o elementos reguladores del mismo

5 <130> P064607EP

<140> EP14748825.8

<141> 2014-09-26

<150> CN 201310050196.0

<151> 2013-02-08

10 <150> CN 201310050144.3

<151> 2013-02-08

<160> 8

<170> SeqWin2010, versión 1.0

<210> 1

15 <211> 2676

<212> ADN

<213> Escherichia coli

<400> 1

ES 2 673 582 T3

atgtcgtcaa	ccctacgaga	agccagtaag	gacacgttgc	aggccaaaga	taaaacttac	60
cactactaca	gctgcccgt	tgctgctaaa	tactggggcg	atataccccg	tctaccaag	120
tcactcaaag	ttttgctcga	aaacctgctg	cgctggcagg	atggtaactc	ggttaccgaa	180
gaggatatcc	acgcgctggc	aggatggctg	aaaaatgccc	atgctgaccg	tgaaattgcc	240
taccgcccgg	caaggggtgct	gatgcaggac	tttaccggcg	tacctgccgt	tgttgatctg	300
gcggaatgc	gcgaagcggg	taaacgcctc	ggcggcgata	ctgcaaaggt	taaccgcctc	360
tcaccggtcg	acctgggcat	tgaccactcg	gtgaccgctg	atcgttttgg	tgatgatgag	420
gcatttgaag	aaaacgtacg	cctggaaatg	gagcgaacc	acgaacgta	tgtgttcctg	480
aatgggggaa	agcaagcggt	cagtcggttt	agcgtogtgc	cgccaggcac	aggcatttgc	540
catcagggta	acctcgaata	tctcggcaaa	gcagtgtgga	gtgaattgca	ggacggtgaa	600
tggattgctt	atccggatac	actcgttggg	actgactcgc	acaccaccat	gatcaacggc	660
cttgccgtgc	tgggggtggg	cgtttggggg	atcgaagcag	aagccgcaat	gtaggcccag	720
ccggtttcca	tgcttatccc	ggatgtagtg	ggcttcaaac	ttaccggaaa	attacgtgaa	780
ggtattaccg	ccacagacct	ggttctcact	gttacccaaa	tgctgcgcaa	acatggcgtg	840
gtggggaaat	tcgtcgaatt	ttatggtgat	ggtctggatt	cactaccggt	ggcggatcgc	900
gccaccattg	ccaatatgtc	gccagaatat	ggtgccacct	gtggcttctt	cccaatcgat	960
gctgtaaccc	tcgattacat	gcgtttaagc	ggcgcagcgc	aagatcaggt	cgagtgggtc	1020
gaaaaatatg	ccaagcgcga	gggcatgtgg	cgtaaccgcg	gcgatgaacc	aatttttacc	1080
agtacgttag	aactggatat	gaatgacggt	gaagcagagc	tggcagggcc	taaacgccca	1140
caggatcgcg	ttgcaactgcc	cgatgtacca	aaagcatttg	ccgccagtaa	cgaactggaa	1200
gtgaatgcca	cgcataaaga	tcgccagccg	gtcgattatg	ttatgaacgg	acatcagtat	1260
cagttacctg	atggcgctgt	ggctattgct	gcgataacct	cgtagcacc	cacctctaac	1320
ccaagtgtgc	tgatggccgc	aggcttgctg	gcgaaaaaag	ccgtaactct	gggcctcaag	1380
cggcaaccat	gggtcaaagc	gtcgtggca	ccgggttcga	aagtcgtttc	tgattatctg	1440
gcaaaagcga	aactgacacc	gtatctcgac	gaactggggg	ttaaccttgt	gggatacggg	1500
tgtaccacct	gtattggtaa	ctctgggccc	ctgcccgatc	ctatcgaaac	ggcaatcaaa	1560
aaaagcgatt	taaccgctcg	tgccggtgctg	tccggcaacc	gtaactttga	aggccgtatc	1620
catccgctgg	ttaaaactaa	ctggctggcc	tcgccccgcg	tgggtggttg	ctatgcgctg	1680
gcgggaaata	tgaatatcaa	cctggcttct	gagcctatcg	gccatgatcg	caaaggcgat	1740
ccggtttatc	tgaagatat	ctggccatcg	gcacaagaaa	ttgcccgctg	ggtagaacaa	1800
gtctccacag	aatgttccg	caaagagtac	gcagaagttt	ttgaaggcac	agcagagtgg	1860
aagggaaata	acgtcacacg	atccgatacc	tacggttggc	aggaggactc	aacctatatt	1920
cgcttatcgc	ctttctttga	tgaaatgcag	gcaacaccag	caccagtgga	agatattcac	1980
ggtgcgcgga	tcctcgaat	gctgggggat	tcagtcacca	ctgacatata	ctctccggcg	2040
ggcagtatta	agcccgcag	cccagcgggt	cgatatctac	aaggtcgggg	tgttgagcga	2100
aaagacttta	actcctacg	ttcgcggcgt	ggtaaccatg	aagtgatgat	gcgcggcacc	2160
ttcgccaata	ttcgcacccg	taatgaaatg	gtgcctggcg	ttgaaggggg	gatgacgcgg	2220
catttacctg	acagcgacgt	agtctctatt	tatgatgctg	cgatgcgcta	taagcaggag	2280
caaacgcgcg	tggcgggtgat	tgccgggaaa	gagtatggat	caggctccag	tcgtgactgg	2340
gcgcgaaaag	gtccgcgctc	gcttggatt	cgtgtgggta	ttgccgaatc	gtttgaacga	2400
attcaccggt	cgaatttaat	tggcatgggc	atcctgccgc	tggaaatttc	gcaaggcgta	2460
acgcgtaaaa	cgtagggct	aaccgggaa	gagaagattg	atattggcga	tctgcaaaac	2520
ctacaacccg	gcgcgacggg	tccggtgacg	cttacgcgcg	cggatggtag	ccaggaagtc	2580
gtaccctgcc	gtgtcgtat	cgacaccgcg	acggagttga	cctactacca	gaacgacggc	2640
atthtgcatt	atgtcattcg	taatatgttg	aagtaa			2676

<210> 2

5 <211> 2832

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

ES 2 673 582 T3

ttggagctca	ctgtgactga	aagcaagaac	tccttcaatg	ctaagagcac	ccttgaagtt	60
ggcgacaagt	cctatgacta	cttcgccctc	tctgcagtgc	ctggcatgga	gaagctgccg	120
tactcctca	aggttctcgg	agagaacctt	cttcgtaccg	aagacggcgc	aaacatcacc	180
aacgagcaca	ttgaggctat	cgccaactgg	gatgcatctt	ccgatccaag	catcgaaatc	240
cagttcacc	cagcccgtgt	tctcatgcag	gacttcaccg	gtgtcccttg	tgtagttgac	300
ctcgcaacca	tgcgtgaggg	agttgtctga	ctcggtgggc	accctaacga	cgtcaacc	360
ctgaaccag	ccgagatggt	cattgaccac	tccgtcatcg	tggaggcttt	cggccgccca	420
gatgactgg	ctaagaacgt	tgagatcgag	tacgagcgca	acgaggagcg	ttaccagttc	480
ctgcgttggg	gttcogagtc	cttctccaac	ttcccggttg	ttcctccagg	aaccggtatc	540
gtccaccagg	tcaacattga	gtacttggct	cgcgtcgtct	tcgacaacga	gggccttgca	600
taccagata	cctgcatcgg	taccgactcc	cacaccacca	tggaaaacgg	cctgggcatc	660
ctgggctggg	gcgttgggtg	cattgaggct	gaagcagcaa	tgctcggcca	gccagtgtcc	720
atgctgatcc	ctcgcgttgt	tggtctcaag	ttgaccggcg	agatcccagt	aggcgttacc	780
gcaactgac	ttgtgctgac	catcaccgaa	atgctgcgcg	accacggcgt	cgtccagaag	840
ttcgttgagt	tctacggctc	cggtgttaag	gctgttccac	tggctaaccg	tgcaaccatc	900
ggcaacatgt	ccccagagtt	gggctccacc	tgtgcgatgt	tcccaatcga	cgaggagacc	960
accaagtacc	tgcgcctcac	cggccgccca	gaagagcagg	tgactcgtgt	cgaggcttac	1020
gccaaggcgc	agggcatgtg	gctcgacgag	gacaccggtg	aagctgagta	ctccgagtac	1080
ctcgagctgg	acctgtccac	cgttgttctt	tccatcgctg	gccctaagcg	cccacaggac	1140
cgcatccttc	tctccgaggg	aaaggagcag	ttccgtaagg	atctgccaac	ctacaccgac	1200
gacgctgttt	ccgtagacac	ctccatccct	gcaaccgcga	tggttaacga	aggtggcggg	1260
cagcctgaag	gcggcgctga	agctgacaac	tacaacgctt	cctgggctgg	ctccggcgag	1320
tccttggcta	ctggcgcaga	aggacgtcct	tccaagccag	tcaccgttgc	atccccacag	1380
ggtggcgagt	acaccatcga	ccacggcatg	gttgcaattg	catccatcac	ctcttgacc	1440
aacacctcta	accatccgtt	gatgatcggc	gctggcctga	tcgcacgtaa	ggcagcagaa	1500
aagggcctca	agtccaagcc	ttgggttaag	accatctgtg	caccaggttc	ccaggttgtc	1560
gacggctact	accagcgcgc	agacctctgg	aaggaccttg	aggccatggg	cttctacctc	1620
tccggcttcg	gctgcaccac	ctgtattggt	aactcoggcc	cactgccaga	ggaaatctcc	1680
gctgcgatca	acgagcacga	cctgaccgca	accgcagttt	tgtccggtaa	ccgtaacttc	1740
gagggacgta	tctcccctga	cgtaagatg	aactacctgg	catccccaat	catggtcatt	1800
gcttacgcaa	tcgctggcac	catggacttc	gacttcogaga	acgaagctct	tggacaggac	1860
caggacggca	acgacgtcct	cctgaaggac	atctggcctt	ccaccgagga	aatcgaagac	1920
accatccagc	aggcaatctc	ccgtgagctt	tacgaagctg	actacgcaga	tgtcttcaag	1980
ggtgacaagc	agtggcagga	actcgatggt	cctaccggtg	acacctcga	gtgggacgag	2040
aactccaact	acatccgcaa	ggcaccttac	ttcgacggca	tgctgtcga	gccagtggca	2100
gtcacccgaca	tccagggcgc	acgcgttctg	gctaagctcg	gcgactctgt	caccaccgac	2160
cacatctccc	ctgcttctct	cattaagcca	ggtaccctct	cagctcagta	cttggatgag	2220
cacggtgtgg	aacgccacga	ctacaactcc	ctgggttcca	ggcgtggtaa	ccacgaggtc	2280
atgatgcggy	gcaccttcgc	caacatccgc	ctccagaacc	agctggttga	catcgcaggt	2340
ggctacaccc	gcgacttcac	ccaggagggt	gctccacagg	cgttcatcta	cgacgcttcc	2400
gtcaactaca	aggctgctgg	cattccgctg	gtcgtcttgg	gcggcaagga	gtacggcacc	2460
ggttcttccc	gtgactgggc	agctaagggc	actaacctgc	tcggaattcg	cgcagttatc	2520
accgagtctt	tcgagcgtat	tcaccgctcc	aacctcatcg	gtatggcgtg	tgtcccactg	2580
cagttccctg	caggcgaatc	ccacgagtc	ctgggccttg	acggcaccga	gaccttcgac	2640
atcacccggac	tgaccgcact	caacgagggc	gagactccta	agactgtcaa	ggtcacccgca	2700
accaaggaga	acggcgacgt	cgctcagttc	gacgcagttg	tccgcatcga	cacccaggt	2760

gaggctgact	actaccgcca	ggcgcgcatc	ctgcagtagc	tgctgcgtca	gatggctgct	2820
tcttctaagt	aa					2832

- <210> 3
- <211> 161
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

<400> 3						
caatccgacg	tctaagaaac	cattattatc	atgacattaa	cctataaaaa	taggcgtatc	60
acgaggccct	ttcgtcttca	cctcgagtcc	ctatcagtga	tagagatgga	catccctatc	120
agtgatagag	atactgagca	catcagcagc	acgcactgac	c		161

- <210> 4
- <211> 454
- <212> ADN
- <213> Escherichia coli

<400> 4

ES 2 673 582 T3

```

ggaatgttcc gtcggttattc cagacgactg gcaactaaca tcgcagcagc aagcctttat 60
agaactgttt gctgaagatg atcagccgaa acaataatta tcatcattct tattaccoat 120
ttttaatgaa ttaaagggct tttaatcac cgcagcaata acagcttgag ttatctcaac 180
acaaaataat aaccgttaag ggtgtagcct atgatcaaca caaatatgaa atattggtcc 240
tggatgggcg cgttttctct gtcgatgctc ttctgggccc aactcctctg gatcattact 300
cactgatcct tgaccccgct gcggcggggt tgtcatttgc tttgccacaa ggtttctcct 360
cttttatcaa tttgggttgt tatcaaatcg ttacgcgatg tttgtgttat ctttaaatatt 420
caccctgaag agaatcaggg cttcgcgaacc ctgt 454

<210> 5
<211> 130
<212> ADN
5 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 5
ccggtgaaaa ctaaaaagct ggggaaggtga atcgaatttc ggggctttaa agcaaaaatg 60
aacagcttgg tctatagtgg ctaggtaccc tttttgtttt ggacacatgt aggggtggccc 120
aaacaaagta 130

<210> 6
<211> 166
10 <212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6
acgcgccaaag aaccccact ttcccgccag aacgcttgta ctgtaggat aatgaagacg 60
tagggtcctt ttccacagtt ctgtggaatg agaatccgat gtttttctca cgccggctca 120
gccgaagcag acgcgcgtgc gaaatctcac ctaaaaaag ttagaa 166

<210> 7
<211> 567
15 <212> ADN
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 7
gtgtccgtag cggcaggcga caaaccaaca aatagccgtc aagaaatcct cgaaggtgcc 60
cgacggtgct tcgctgagca cggctatgaa ggcgcaaccg tacgccgact ggaagaagca 120
acaggtaaat cacgcggagc gatctttcat cacttcggtg acaaagaaa cctgttccta 180
gccctcgcgc ggaagatgc agcccgatg gcggaggtgg tgtctgaaa tggcctcgtt 240
gaagtgatgc gaggaatgct ggaagatcct gaacgatatg actggatgtc agtacgcctg 300
gagatctcca agcagctgcg caccgaccgg gtattccgcg caaaatggat tgatcaccaa 360
agtgttctag acgaagctgt ccgcgtgctt ttgtcccga acgtggataa gggacaaatg 420
cgactgacg tcccgatcga agtgctgcac accttcttag agactgttct cgacggtttc 480
atctcccgtc ttgctaccgg cgcacccaca gaaggactgt ccgaagtatt ggatctggtc 540

20 gagggaactg tccgtaaacy cgactaa 567

<210> 8
<211> 164
<212> ADN
25 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 8
ctgcataatt cgtgtcgctc aaggcgcact cccgttctgg ataatgtttt ttgcgccgac 60
atcataacgg ttctggcaaa tattctgaaa tgagctgttg acaattaatc atcggctcgt 120
ataatgtgtg gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaa 164

```

**REIVINDICACIONES**

1.- Un método para producir L-lisina mediante fermentación o para aumentar el rendimiento de fermentación de la L-lisina, que comprende las etapas de:

5 (1) modificar un gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este en un cromosoma de una bacteria productora de L-lisina, de modo que la actividad y/o la cantidad de expresión de la aconitasa de la bacteria se reduce, pero no se elimina; y

(2) producir L-lisina mediante fermentación con la bacteria obtenida mediante la modificación de la etapa (1),

en el que la modificación del gen de aconitasa y/o un elemento regulador de este incluye:

10 (i) una sustitución del codón de inicio de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 del gen de aconitasa en el cromosoma de una *Escherichia coli* productora de L-lisina por GTG;

(ii) una sustitución de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:4 de un promotor del gen de aconitasa en el cromosoma de una *Escherichia coli* productora de L-lisina por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3;

15 (iii) una sustitución de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:6 de un promotor del gen de aconitasa en el cromosoma de una *Corynebacterium glutamicum* o *Corynebacterium pekinense* productora de L-lisina por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:5;

(iv) una delección de 90 nucleótidos antes del codón de fin en la secuencia de nucleótidos del gen de aconitasa de SEQ ID NO:1 en el cromosoma de una *Escherichia coli* productora de L-lisina; o

(v) una adición en la secuencia de nucleótidos de un represor de la transcripción (SEQ ID NO:7) del gen de aconitasa, preferiblemente una adición de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:8 y 7 en tándem.

20