(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 696 173**

(51) Int. CI.:

C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12P 13/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/KR2012/011328**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13095071**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12859882 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2796555**

(54) Título: **Método para producir L-lisina usando microorganismos que tienen capacidad de producir L-lisina**

(30) Prioridad:

21.12.2011 KR 20110139527

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.01.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

LEE, KWANG HO;
LIM, SANG JO;
MOON, JUN OK;
JANG, JAE WOO;
PARK, SU JIN y
PARK, SANG HEE

(74) Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

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 para producir L-lisina usando microorganismos que tienen capacidad de producir L-lisina

Antecedentes

1. Campo

La presente divulgación se refiere a un polinucleótido modificado, en que un codón de inicio está sustituido con ATG, un vector que comprende el mismo, un microorganismo que comprende el polinucleótido y un método para producir L-lisina usando el mismo.

2. Descripción de la técnica relacionada

Las cepas del género *Corynebacterium,* específicamente *Corynebacterium glutamicum,* son microorganismos grampositivos que se usan ampliamente para producir L-lisina. La L-lisina se usa para piensos para animales, medicinas y cosméticos para seres humanos, y se produce mediante fermentación de la cepa de *Corynebacterium*.

Convencionalmente, se conoce una cepa del género *Corynebacterium* que tiene genes de biosíntesis de lisina potenciados y un método de producción de L-lisina usando la misma. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.746.855 divulga un método para producir L-lisina cultivando *Corynebacterium* que tiene una expresión potenciada del gen *lysE* (gen del transportador de exportación de lisina) y adicionalmente genes introducidos seleccionados del grupo que consiste en un gen dapA, un gen *lysC*, un gen *pyc* y un gen *dapB*.

Otro método es amplificar genes en la ruta de biosíntesis de lisina o modificar un promotor. Por ejemplo, las solicitudes de patente coreana abiertas a inspección pública n.º 2009-0082702 y 2009-0084099 divulgan un método para producir L-lisina introduciendo promotores mejorados del operón ddh y lysC-asd en *Corynebacterium.* La solicitud de patente coreana abierta a inspección pública n.º 2008-0025355 divulga un método para mejorar la productividad de lisina amplificando el número de copias de los genes en la ruta de biosíntesis de lisina, que son *aspB, lysC, asd, dapA, dapB, lysA* y *pyc,* en el cromosoma.

Paralelamente, el codón de inicio que reconoce los ribosomas para iniciar la traducción en el cromosoma es habitualmente ATG. La traducción puede controlarse de acuerdo con el codón de inicio del gen, y la secuencia del codón de inicio es importante en la regulación de la actividad de la proteína. Sin embargo, aunque ATG es el codón de inicio común entre los genes de biosíntesis de lisina derivados de *Corynebacterium glutamicum,* el codón de inicio de los genes *lysC* y *pyc* es GTG, y TTG es para el gen *tkt* en la ruta de fosfato pentosa que contiene el codón de inicio de TTG (referencia: J. Biotechnol., 104: 5-).

BECKER JUDITH et al., ENGINEERING IN LIFE SCIENCES, vol. 10, n.º 5, octubre de 2010, páginas 430-438, divulgan el remplazo de codones de inicio naturales de diferentes enzimas en el metabolismo del carbono de *Corynebacterium glutamicum* para influir en su actividad hacia la producción mejorada del aminoácido lisina aportado. El remplazo del codón ATG natural por GTG reducía la actividad enzimática específica de la piruvato deshidrogenasa (PDH) y la fosfoglucoisomerasa en 60 y un 40 %, respectivamente. Viceversa, la actividad de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se aumentaba en un 40 % por la sustitución GTG en ATG.

El documento WO2011/158975 divulga un método que utiliza un microorganismo recombinante para la producción de aminoácidos derivados de aspartato y precursores de los mismos, en particular para la producción de L-lisina.

El n.º de acceso a EBI EM STD:AM747626, el n.º de acceso a la base de datos AM747626, divulga el gen *lysC Corynebacterium glutamicum* para la aspartocinasa, cepa HN2650 11.

El documento WO2006/069610 divulga un gen relacionado con la producción de valina, SEQ: 53931, para su uso en un proceso para la producción de un agente químico fino en un microorganismo.

El n.º de acceso a EBI GSN:AZN08069, n.º de acceso a la base de datos AZN08069 divulga "la secuencia del gen *trc-pyc C. glutamicum*, SEQ ID 27".

El documento US2009/0325244 divulga un método de aumento de la cantidad de al menos un polipéptido en una célula hospedadora expresando una secuencia de nucleótidos modificada que codifica un polipéptido en una célula hospedadora con dicha secuencia de nucleótidos modificada que se obtiene de una secuencia de nucleótidos no modificada diferente que codifica un polipéptido de secuencia de aminoácidos idéntica de modo que el uso de codones de la secuencia de nucleótidos modificada se ajuste al uso de codones de las proteínas abundantes en la célula hospedadora.

El documento WO2009/133114 divulga un método que utiliza un microorganismo con actividad isocitrato deshidrogenasa reducida para la producción de agentes químicos finos.

BECKER JUDITH et al., METABOLIC ENGINEERING, vol. 13, n.º 2, marzo de 2011, páginas 159-168, divulgan una cepa genéticamente definida de *Corynebacterium glutamicum* hiperproductora de L-lisina mediante ingeniería metabólica de sistemas del tipo silvestre.

JAKOBSEN OYVIND M et al., APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 75, n.º 3, 1 de febrero de 2009, páginas 652-661, divulgan la clonación de cuatro genes (asd, que codifica la aspartato semialdehído deshidrogenasa; dapA, que codifica la dihidrodipicolinato sintasa; dapG, que codifica AKI; e yclM, que codifica AKIII) de la ruta de aspartato en *Bacillus methanolicus* MGA3. Junto con el gen conocido de AKII lysC, dapG e yclM forman un conjunto de tres genes AK en este organismo. La sobreexpresión de dapG, lysC e yclM aumentaba la producción de L-lisina en la cepa de *B. methanolicus* de tipo silvestre MGA3 2, 10 y 60 veces (correspondiente a 11 g/litro), respectivamente, sin afectar de forma negativa a la tasa de crecimiento específica.

El n.º de acceso a EBI GSN:AWW23169, n.º de acceso a la base de datos AWW23169, divulga "la secuencia de ADN de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, SEQ ID: 9684".

El n.º de acceso a EBI GSN: AEE27731, n.º de acceso a la base de datos AEE27731, divulga "ADN genómico de *C. glutamicum*, SEQ ID NO 46".

El número de acceso a GenBank X57226.1 GI:40509, divulga los genes lysC-alfa, lysC-beta y asd de *C. glutamicum*.

Los autores de la presente invención han realizado muchos esfuerzos por hallar un método para mejorar la productividad de lisina, y como resultado, descubrieron que el codón de inicio de los genes *lysC,* tkt y *pyc* de tipo silvestre pueden sustituirse con ATG para potenciar las actividades de aspartato cinasa, transcetolasa y piruvato carboxilasa sobre sus actividades endógenas, completando de ese modo la presente divulgación.

Sumario

Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un polinucleótido modificado que codifica la aspartato cinasa (EC:2.7.2.4; a partir de ahora en este documento, mencionada como LysC), transcetolasa (EC:2.2.1.1; a partir de ahora en este documento, mencionada como Tkt) o piruvato carboxilasa (EC:6.4.1.1; a partir de ahora en este documento, mencionada como Pyc), en el que el codón de inicio del polinucleótido está sustituido con ATG.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un vector que comprende uno o más polinucleótidos modificados que codifican aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa, en que el codón de inicio del polinucleótido está sustituido con ATG.

Otro objetivo más de la presente divulgación es proporcionar un microorganismo, en que una o más de las enzimas tienen actividad potenciada en comparación con su actividad endógena.

Otro objetivo más de la presente divulgación es proporcionar un método para producir L-lisina, que comprende las etapas de cultivar el microorganismo y recuperar L-lisina del microorganismo cultivado o del caldo de cultivo.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido modificado que codifica aspartato cinasa (EC:2.7.2.4; a partir de ahora en este documento, mencionada como LysC), transcetolasa (EC:2.2.1.1; a partir de ahora en este documento, mencionada como Tkt) o piruvato carboxilasa (EC:6.4.1.1; a partir de ahora en este documento, mencionada como Pyc), en que el codón de inicio del polinucleótido está sustituido con ATG.

Cada polinucleótido que codifica aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa puede incluir también una sustitución, eliminación, inserción o adición parcial en el polinucleótido, siempre que cada una de ellas tenga la actividad enzimática, y puede tener un 70 % o más de homología, específicamente un 80 % o más de homología, más específicamente un 90 % o más de homología, y mucho más específicamente un 95 % o más de homología, y mucho más específicamente un 100 % o más de homología basándose en el polinucleótido conocido.

Como se usa en este documento, el término "homología (homólogo)" significa el grado de similitud entre secuencias de nucleótidos del gen *lysC*, del gen *tkt* o del gen *pyc* de las secuencias de tipo silvestre y de nucleótidos de los genes modificados correspondientes de las mismas, es decir, el gen *lysC*, el gen *tkt* o el gen *pyc* modificado, en que una parte de los polinucleótidos está sustituida, eliminada, insertada o añadida.

Como se usa en este documento, la expresión "codón de inicio" significa 3 nucleótidos correspondientes a un punto de inicio de la traducción cuando una secuencia codificante de ARNm (ARN mensajero) se traduce en una proteína. En general, los codones de inicio encontrados en el cromosoma de microorganismos son ATG (AUG en ARNm), GTG (GUG en ARNm) y TTG (UUG en ARNm) y existen en una relación de un 62,5 %~66,5 %, 23,1 %~24,3 % y 10,3 %~13,2 % de acuerdo con el resultado del análisis de la secuencia del genoma completo de *Corynebacterium glutamicum* (referencia: Handbook of Corynebacterium glutamicum, 40p, Lothar Eggeling & Michael Bott, 2005).

Entre los genes de biosíntesis de lisina derivados de *Corynebacterium* presentados hasta ahora, *lysC* y *pyc* tienen el codón de inicio de GTG, y *tkt* tiene el codón de inicio de TTG. El codón de inicio de estos genes no es ATG, que se considera una característica única de *Corynebacterium.*

El polinucleótido modificado de acuerdo con la presente divulgación se caracteriza porque el codón de inicio del gen *lysC, tkt* o *pyc* está sustituido con ATG, y estos polinucleótidos modificados que tienen dicho codón de inicio sustituido se han modificado por primera vez por los autores de la presente invención. Con más detalle, el codón de inicio GTG del polinucleótido que codifica aspartato cinasa (LysC) o piruvato carboxilasa (Pyc) está sustituido con ATG, y el codón de inicio TTG del polinucleótido que codifica transcetolasa (Tkt) está sustituido con ATG en la presente divulgación. Más específicamente, las secuencias de los genes *lysC, tkt,* y *pyc* son las SEQ ID NO. 13, 14 y 15, respectivamente, las secuencias de los genes que tienen el codón de inicio sustituido como ATG están representadas por las SEQ ID NO. 16, 17 y 18, respectivamente.

Las sustituciones de base de los codones de inicio pueden realizarse por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mutagénesis específica de sitio, recombinación homóloga, pero no se limitada a ellas.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector que comprende uno o más polinucleótidos modificados de los polinucleótidos modificados que codifican aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa, en que el codón de inicio del polinucleótido está sustituido con ATG.

Los polinucleótidos modificados que tienen el codón de inicio sustituido como ATG y que codifican aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa, que está comprendido en el vector de la presente divulgación, puede incluir aquellos en que una parte de los polinucleótidos está sustituida, eliminada, insertada o añadida, siempre que tenga actividad enzimática, y puede tener un 70 % o más de homología, específicamente un 80 % o más de homología, más específicamente un 90 % o más de homología, mucho más específicamente un 95 % o más de homología, y mucho más específicamente un 100 % de homología.

Además, los polinucleótidos modificados que tienen el codón de inicio sustituido como ATG y que codifican aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa, que está comprendido en el vector de la presente divulgación, también puede incluir únicamente una parte del gen que codifica aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa, siempre que tenga el codón de inicio sustituido como ATG.

Como se usa en este documento, el término "vector" se refiere a una construcción de ADN que contiene una secuencia de bases que está unida de forma funcional a una secuencia de control adecuada, para expresar un gen diana en una hospedador adecuado. Las secuencias de control pueden incluir un promotor para iniciar la transcripción, una determinada secuencia operadora para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma adecuado en el ARNm, y una secuencia para controlar la terminación de la transcripción y la traducción. El vector usado en la presente divulgación no está particularmente limitado, y puede ser cualquier vector conocido en la técnica, siempre que sea replicable en el hospedador. Por ejemplo, el vector puede ser un plásmido, una partícula fágica o un inserto genómico potencial, y es específicamente pDZ (patente coreana n.º 10-0924065), pero no se limita al mismo. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse o funcionar independientemente del genoma del hospedador, o puede integrarse en el propio genoma.

Específicamente, se adquirió una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO. 13, 14 o 15) que comprende el codón de inicio del gen *lysC, tkt* o *pyc*, y basándose en esta secuencia, se sintetizaron cebadores que tienen el codón de inicio sustituido como ATG. Se realizó PCR usando los cebadores y un ADN cromosómico de una cepa productora de L-lisina como molde, para obtener ADN del que se sustituye un extremo con ATG. Este fragmento de ADN así obtenido se clonó en un vector para obtener un vector recombinante final. Más específicamente, en la presente divulgación, se construyeron los vectores pDZ-lysC(ATG), pDZ-tkt(ATG) y pDZ-pyc(ATG), respectivamente.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un microorganismo que incluye uno o más polinucleótidos modificados que tienen el codón de inicio sustituido como ATG y que codifican una enzima seleccionada del grupo que consiste en aspartato cinasa, transcetolasa y piruvato carboxilasa, y después se mejoraron los niveles de traducción de los ARNm transcritos a partir de los polinucleótidos en proteínas, provocando actividades potenciadas de una o más de las enzimas en comparación con las actividades endógenas de las mismas. El microorganismo de la presente divulgación puede tener actividades potenciadas de aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa usando los polinucleótidos modificados en combinaciones de uno, dos o tres de los mismos, en que los polinucleótidos modificados codifican las enzimas correspondientes y están sustituidos con ATG en el codón de inicio.

Para sustituir ATG para los codones de inicio de los genes diana en el cromosoma del microorganismo, pueden usarse diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias del codón de inicio de los genes *lysC, tkt* y *pyc* endógenos en el microorganismo pueden sustituirse en el cromosoma. Como alternativa, los genes correspondientes que tienen las secuencias del codón de inicio sustituidas pueden introducirse en el microorganismo en forma de un plásmido.

El microorganismo puede ser cualquier cepa, siempre que tenga productividad de L-lisina. Específicamente, puede ser un microorganismo de *Corynebacterium* sp. o *Brevibacterium* sp. Los ejemplos de los microorganismos de *Corynebacterium* sp. o *Brevibacterium* sp. incluyen *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869. Además, pueden incluirse variantes productoras de L-lisina o cepas derivadas de las mismas, por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (este microorganismo se divulgó como KFCC10881, y se volvió a depositar en una autoridad de depósito internacional según el tratado de Budapest con el n.º de acceso KCCM11016P, patente coreana n.º 10-0159812, patente coreana n.º 10-0397322) y *Corynebacterium glutamicum* KFCC 11001. Además, puede ser *Corynebacterium glutamicum* con el n.º de acceso KCCM11016P.

Específicamente, *Corynebacterium glutamicum* con el n.º de acceso KCCM11016P se transformó con un vector que comprende el polinucleótido que codifica aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa, en la que el codón de inicio está sustituido con ATG, para obtener *Corynebacterium glutamicum* recombinante. Más específicamente, se introdujo el vector pDZ-lysC(ATG), pDZ-tkt(ATG) o pDZ-pyc(ATG) en *Corynebacterium glutamicum* con el n.º de acceso KCCM11016P, respectivamente para obtener cada *Corynebacterium glutamicum* recombinante.

Además, el microorganismo puede transformarse con un vector que comprende dos o más polinucleótidos de los polinucleótidos que codifican aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa y que tienen el codón de inicio sustituido como ATG. Específicamente, el vector pDZ-tkt(ATG) que comprende el gen del que se ha sustituido el codón de inicio con ATG y que codifica transcetolasa se transforma en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-lysC, en que el codón de inicio GTG de *lysC* está sustituido con ATG y mediante un segundo cruce, los codones de inicio de *lysC* y tkt en el cromosoma se sustituyen con ATG para obtener *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-lysC-tkt. Además, el vector pDZ-pyc(ATG) que comprende el polinucleótido del que se ha sustituido el codón de inicio con ATG y que codifica piruvato carboxilasa se transforma en KCCM11016P-lysC, en que el codón de inicio GTG de *lysC* está sustituido con ATG y mediante un segundo cruce, los codones de inicio de *lysC* y *pyc* en el cromosoma se sustituyen con ATG para obtener KCCM11016P-lysC-pyc. Además, el vector pDZ-tkt(ATG) se transforma en KCCM11016P-lysC-pyc preparado como anteriormente, en que el codón de inicio GTG de *lysC* y *pyc* se sustituye con ATG y mediante un segundo cruce, los codones de inicio de *lysC, pyc* y *tkt* en el cromosoma se sustituyen con ATG para obtener KCCM11016P-lysC-pyc-tkt. Se confirmó que los codones de inicio de *lysC, pyc* y tkt también pueden sustituirse con ATG en otras cepas productoras de lisina que pertenecen a *Corynebacterium glutamicum,* KFCC10750 (este microorganismo se divulgó como KFCC10750 y se volvió a depositar en una autoridad de depósito internacional según el tratado de Budapest con el n.º de acceso KCCM11347P, patente coreana n.º 10-0073610), KCCM10770P (patente coreana n.º 10-0924065), CJ3P (Genome Biology 2012, 13:R40) de la misma manera. Estos resultados sugieren que los polinucleótidos modificados de la presente divulgación pueden introducirse de forma estable en diversas cepas que pertenecen a *Corynebacterium* sp., aumentando de ese modo la productividad de L-lisina.

Específicamente, el transformante KCCM11016P-lysC-pyc-tkt, que se obtuvo introduciendo los vectores pDZ-lysC(ATG), pDZ-tkt(ATG) y pDZ-pyc(ATG) que incluye los polinucleótidos que codifican aspartato cinasa, transcetolasa y piruvato carboxilasa en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, se denominó *Corynebacterium glutamicum* CA01-2059 y se depositó el 2 de mayo de 2011 en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (a partir de ahora en este documento, abreviado como "KCCM"), que es una autoridad de depósito internacional según el tratado de Budapest, con el n.º de acceso KCCM11188P. Se deposita mediante una autoridad de depósito internacional según el tratado de Budapest.

El microorganismo de acuerdo con la presente divulgación se caracteriza por en que los codones de inicio de los genes de tipo silvestre que codifican las enzimas anteriores están sustituidos con ATG y, por lo tanto, el microorganismo tiene actividades potenciadas de aspartato cinasa, transcetolasa y piruvato carboxilasa en comparación con actividades endógenas de las mismas, que se producen por la notable mejora en los niveles de traducción de los ARNm transcritos a partir de los genes *lysC, tkt* y *pyc* en las proteínas.

Como se usa en este documento, la expresión "actividad endógena" significa la actividad de una enzima en un microorganismo natural y, por ejemplo, la actividad de aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa en un microorganismo natural que pertenece a *Corynebacterium* sp. La expresión "actividad endógena potenciada" significa que la actividad se mejora adicionalmente en comparación con la de la enzima natural.

Específicamente, cuando la actividad aspartato cinasa de la cepa en que se sustituyó el codón de inicio del gen *lysC* con ATG se comparaba con la de la cepa precursora KCCM11016P, se observaba un aumento de 2,73 veces en la actividad aspartato cinasa (tabla 4). Además, cuando la actividad transcetolasa de la cepa en que se sustituyó el codón de inicio del gen tkt con ATG se comparaba con la de la cepa precursora KCCM11016P, se observaba un aumento de 3,5 veces en la actividad transcetolasa (tabla 5). Además, cuando la actividad piruvato carboxilasa de la cepa en que se sustituyó el codón de inicio del gen *pyc* con ATG se comparaba con la de la cepa precursora KCCM11016P, se observaba un aumento de 1,89 veces en la actividad piruvato carboxilasa (tabla 6).

Se descubrió que la productividad de L-lisina del microorganismo puede aumentarse mejorando la actividad de aspartato cinasa, transcetolasa, piruvato carboxilasa o una combinación de las mismas.

En la presente divulgación, se midieron las cantidades de L-lisina producida en las cepas productoras de L-lisina, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-tkt, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-tkt, KCCM11016P-lysC-pyc y KCCM11016P-lysC-pyc-tkt y, como resultado, mostraron una mejora notable en la producción de L-lisina en comparación con la cepa precursora KCCM 11016P (tabla 7). Además, otras cepas productoras de lisina que pertenecen a *Corynebacterium glutamicum,* KFCC10750 (patente coreana n.º 10-0073610), KCCM10770P (patente coreana n.º 10-0924065) y CJ3P (Genome Biology 2012, 13:R40), en que se sustituyeron los codones de inicio de *lysC, pyc* y *tkt* con ATG, mostraron una mejora notable en la producción de L-lisina en comparación con la cepa precursora (tablas 8~10). Estos resultados sugieren que los microorganismos que tienen un tipo de polinucleótidos modificados que codifican LysC, Tkt o Pyc, o que tienen dos tipos de los polinucleótidos modificados que codifican las enzimas, o que tienen estos tipos de polinucleótidos modificados que codifican las enzimas y que tienen el codón de inicio sustituido como ATG en el cromosoma, también mostraron productividad notablemente mejorada de L-lisina en comparación con el microorganismo de tipo silvestre que tiene el codón de inicio GTG o TTG.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para producir L-lisina, que comprende las etapas de cultivar el microorganismo como se describe anteriormente; y recuperar L-lisina del microorganismo cultivado o el caldo de cultivo.

Para el cultivo, pueden usarse diversos métodos de producción de L-lisina usando un microorganismo que es ampliamente conocido en la técnica. El cultivo puede realizarse de acuerdo con el método ampliamente conocido, y las condiciones para el cultivo, incluyendo temperatura, tiempo, pH del medio, etc. pueden controlarse apropiadamente. Se proporciona una descripción detallada del cultivo en el siguiente documento [Chmiel; Bioprozesstechnik 1. Einfuhrung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), y Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)]. Además, el cultivo puede incluir cultivo discontinuo, cultivo continuo y cultivo semicontinuo. Específicamente, puede hacerse funcionar un proceso discontinuo, semicontinuo o semicontinuo repetido de una manera continua, pero la presente divulgación no se limita a los mismos.

Para su uso en el cultivo, un medio debe satisfacer los requisitos de una cepa particular empleada. Los medios de cultivo para microorganismos que pertenecen a *Corynebacterium* sp. son bien conocidos (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., EE. UU., 1981). Las fuentes de carbono a usar pueden incluir sacáridos y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; aceites y lípidos tales como aceite de soja, aceite de semillas de girasol, aceite de ricino y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estos materiales pueden usarse por separado o en combinación. Las fuentes de nitrógeno a usar pueden incluir peptona, extracto de levadura, caldo de carne, extracto de malta, destilado del macerado del maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden usarse por separado o en combinación. Las fuentes de fósforo a usar pueden incluir hidrogenofosfato de dipotasio, dihidrogenofosfato de potasio y sales de sodio correspondientes. Además, los medios de cultivo pueden contener sales metálicas tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro esenciales para el crecimiento. Finalmente, pueden usarse nutrientes esenciales tales como aminoácidos y vitaminas además de las sustancias anteriores. Además, pueden añadirse precursores apropiados al medio de cultivo. Estos materiales pueden añadirse apropiadamente en el cultivo durante los cultivos en un modo discontinuo o continuo.

El pH del medio de cultivo puede ajustarse con un compuesto básico tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoniaco, o un compuesto ácido tal como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. La generación de espuma puede restringirse usando un agente desespumante tal como éster de poliglicol de ácido graso. El medio de cultivo puede mantenerse en condiciones aeróbicas introduciendo oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) en el mismo. La temperatura de cultivo es típicamente entre 20 y 45 ℃ y específicamente entre 25 y 40 ℃. El cultivo se continúa hasta que se produce una cantidad máxima de L-lisina. A este respecto, puede conseguirse en 10 a 160 horas. Después de producirse, la L-lisina puede exportarse al medio de cultivo o puede permanecer dentro de las células.

Además, el método para producir L-lisina de la presente divulgación comprende la etapa de recuperar L-lisina del microorganismo cultivado o el caldo de cultivo. El método de recuperación de L-lisina del microorganismo o el caldo de cultivo es ampliamente conocido en la técnica. Los ejemplos del método de recuperación de L-lisina pueden incluir filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización y HPLC, pero no se limita a los mismos.

Ejemplos

A partir de ahora en este documento, la presente divulgación se describirá en más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son con fines ilustrativos únicamente, y no se pretende que la divulgación esté limitada por estos ejemplos.

En los ejemplos, se construyeron vectores recombinantes para sustituir el codón de inicio GTG o TTG por ATG del gen *lysC* que codifica aspartato cinasa, el gen tkt que codifica transcetolasa y el gen *pyc* piruvato carboxilasa derivados de la cepa productora de lisina, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P. El vector se transformó en la cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P para obtener una cepa que tuviera el codón de inicio sustituido en el cromosoma, preparando de ese modo una cepa que tiene productividad mejorada de lisina.

La cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P usada en la presente divulgación es una cepa que es resistente a S-(2-aminoetil) cisteína (a partir de ahora en este documento mencionada como AEC) y permeable a homoserina, preparada por mutación artificial usando *Corynebacterium glutamicum* de tipo silvestre (ATCC 13032) como cepa precursora (divulgada como KFCC10881. Véase la patente coreana n.º 10-0159812 y la patente coreana n.º 10-0397322). Además, la cepa KFCC10750 es una cepa de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-lisina que es auxótrofa para homoserina y resistente a un análogo de L-leucina, 4-azaleucina y un antibiótico, rifampicina, preparada por mutación artificial (patente coreana n.º 10-0073610), la cepa KCCM10770P es una cepa productora de L-lisina derivada de KCCM11016P, que retiene dos copias de 6 tipos de los genes que constituyen la ruta de biosíntesis de lisina en el cromosoma (patente coreana n.º 10-0924065) y la cepa CJ3P es una cepa de *Corynebacterium glutamicum* que tiene productividad de L-lisina mediante la introducción de cada una de las mutaciones P458S, V59A y T311I en tres tipos de genes *pyc, hom* y *lysC* del tipo silvestre, basándose en la descripción de Binder et al., (Genome Biology 2012, 13:R40).

Ejemplo 1: Construcción del vector recombinante (pDZ-lysC(ATG)) que tiene el codón de inicio ATG sustituido en *lysC*, derivado de *Corynebacterium glutamicum* y preparación de la cepa que tiene el codón de inicio sustituido

Se usó pDZ (véase la patente coreana n.º 10-0924065) como vector básico para el vector recombinante, que se construyó de la siguiente manera.

(1) Construcción del vector recombinante pDZ-lysC(ATG)

Para adquirir el gen *lysC* derivado de *Corynebacterium glutamicum,* se usó el ADN cromosómico de una cepa productora de lisina (*Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P) preparada por mutación artificial, como molde. Basándose en la genoteca del National Institutes of Health de Estados Unidos (NIH GenBank), se adquirió una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO. 13) que contiene la región del codón de inicio del gen *lysC* (n.º de acceso al NCBI NC_003450, Ncgl0247) y, basándose en esta secuencia, se sintetizaron dos pares de cebadores (tabla 1, SEQ ID NO. 1 ~ 4) para sustituir el codón de inicio GTG con ATG.

Se realizó PCR usando ADN cromosómico de KCCM11016P como molde y los cebadores de la siguiente tabla 1. Se usó la ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™ (Stratagene) como polimerasa, y se realizó la PCR con 30 ciclos de desnaturalización a 96 ℃ durante 30 segundos; hibridación a 55 ℃ durante 30 segundos; y polimerización a 72 ℃ durante 30 segundos. Se clonaron dos fragmentos de ADN así obtenidos en el vector pDZ tratado con la enzima de restricción XbaI usando un kit de clonación de PCR In-Fusion (Clontech) y, finalmente, se construyó un vector recombinante pDZ-lysC(ATG).

(2) Preparación de cepa

El vector pDZ-lysC(ATG) así construido se transformó en KCCM11016P mediante un método de impulso eléctrico (mediante el uso del método de transformación de acuerdo con Appl. Microbiol.Biotechnol. (1999) 52:541-545), y después las cepas en que se insertó el gen en el cromosoma mediante recombinación homóloga, se seleccionaron en un medio de selección que contenía 25 mg/l de canamicina. La inserción cromosómica satisfactoria del vector se confirmó mediante el color azul de las colonias en un medio sólido que contiene X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-(β-D-galactósido). La cepa con la primera inserción cromosómica se cultivó con agitación (30 ℃, 8 horas) en un medio nutritivo. Después, la cepa cultivada se diluyó en serie de 10^{-4} a 10^{-10}, y el cultivo diluido se sembró en placa en un medio sólido que contenía X-gal. La mayoría de las colonias mostraban color azul, mientras que las colonias blancas también existían a un nivel bajo. Seleccionando las colonias blancas, se seleccionaron las cepas en que la secuencia de nucleótidos en la región del codón de inicio de *lysC* estaba sustituido mediante un segundo cruce. La sustitución de nucleótidos del codón de inicio en la cepa seleccionada se confirmó finalmente por PCR usando los cebadores de la SEQ ID NO. 1 y 4 y después analizando la secuencia de nucleótidos del sitio diana.

[Tabla 1]

Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
lysC/ATG/FX	CCGGGGATCCTCTAGActtagggagccatcttttgg	1
lysC/ATG/R	CCAGGGCCATCTTTGTGC	2
lysC/ATG/F	GCACAAAGATGGCCCTGG	3

Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
lysC/ATG/RX	GCAGGTCGACTCTAGAAGTGACATCAACAATGCGTG	4

Ejemplo 2: Construcción del vector recombinante (pDZ-tkt(ATG)) que tiene el codón de inicio ATG sustituido en tkt derivado de *Corynebacterium glutamicum* y preparación de la cepa que tiene el codón de inicio sustituido

Hay dos codones que se espera que sean codón de inicio en la secuencia del gen tkt. Basándose en la distancia desde el RBS (sitio de unión al ribosoma) y la proteómica, se determinó el codón en dirección 3' como el codón de inicio en la presente divulgación.

(1) Construcción del vector recombinante pDZ-tkt(ATG)

Para adquirir el gen *tkt* derivado de *Corynebacterium glutamicum,* se usó el ADN cromosómico de KCCM11016P como molde. Basándose en la genoteca del National Institutes of Health de Estados Unidos (NIH GenBank), se adquirió una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO. 14) que contiene la región del codón de inicio del gen tkt (n.º de acceso al NCBI NC_003450, Ncgl 1512) y, basándose en esta secuencia, se sintetizaron dos pares de cebadores (tabla 2, SEQ ID NO. 5 ~ 8) para sustituir el codón de inicio TTG con ATG.

Se realizó PCR usando el ADN cromosómico de KCCM11016P como molde y los cebadores de la siguiente tabla 2 en las condiciones del ejemplo 1-1. Se clonaron dos fragmentos de ADN así obtenidos en el vector pDZ tratado con la enzima de restricción XbaI usando un kit de clonación de PCR In-Fusion (Clontech) y, finalmente, se construyó un vector recombinante pDZ-tkt(ATG).

(2) Preparación de cepa

El vector pDZ-tkt(ATG) así construido se transformó en la cepa productora de lisina KCCM11016P de la misma manera que en el ejemplo 1-2, y se obtuvo KCCM11016P-tkt, en que el codón de inicio de tkt en el cromosoma estaba sustituido con ATG mediante un segundo cruce. La sustitución de nucleótidos del codón de inicio en la cepa seleccionada se confirmó finalmente por PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO. 5 y 8 y después analizando la secuencia de nucleótidos del sitio diana.

[Tabla 2]

Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
tkt/ATG/FX	CCGGGGATCCTCTAGAGAAATAGATGGGTGTAGACG	5
tkt/ATG/R4	GTGACAGCGTCATGGTGGTCAAT	6
tkt/ATG/F4	ATTGACCACC**ATG**ACGCTGTCAC	7
tkt/ATG/RX	GCAGGTCGACTCTAGACGCAGAGCCTTCAGGTCATC	8

Ejemplo 3: Construcción del vector recombinante (pDZ-pyc(ATG)) que tiene el codón de inicio ATG sustituido en *pyc* derivado de *Corynebacterium glutamicum* y preparación de la cepa que tiene el codón de inicio sustituido

(1) Construcción del vector recombinante pDZ-pyc(ATG)

Para adquirir el gen *pyc* derivado de *Corynebacterium glutamicum,* se usó el ADN cromosómico de KCCM11016P como molde. Basándose en la genoteca del National Institutes of Health de Estados Unidos (NIH GenBank), se adquirió una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO. 15) que contiene la región del codón de inicio del gen *pyc* (n.º de acceso al NCBI NC_003450, Ncgl0659) y, basándose en esta secuencia, se sintetizaron dos pares de cebadores (tabla 3, SEQ ID NO. 9 ~ 12) para sustituir el codón de inicio GTG con ATG.

Se realizó PCR usando el ADN cromosómico de KCCM11016P como molde y los cebadores de la siguiente tabla 3 en las condiciones del ejemplo 1-1. Se clonaron dos fragmentos de ADN así obtenidos en el vector pDZ tratado con la enzima de restricción XbaI usando un kit de clonación de PCR In-Fusion (Clontech) y, finalmente, se construyó un vector recombinante pDZ-pyc(ATG).

(2) Preparación de cepa

El vector pDZ-pyc(ATG) así construido se transformó en la cepa productora de lisina KCCM11016P de la misma manera que en el ejemplo 1-2, y se obtuvo KCCM11016P-pyc, en que el codón de inicio de *pyc* en el cromosoma estaba sustituido con ATG mediante un segundo cruce. La sustitución de nucleótidos del codón de inicio en la cepa

seleccionada se confirmó finalmente por PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO. 9 y 12 y después analizando la secuencia de nucleótidos del sitio diana.

[Tabla 3]

Cebador	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
pyc/ATG/FX	CCGGGGATCCTCTAGATTTTGGGGAAAA GTGCAAAG	9
pyc/ATG/R	GAGTCGACAtTAGAGTAAT	10
pyc/ATG/F	ATTACTCTAaTGTCGACTC	11
pyc/ATG/RX	GCAGGTCGACTCTAGAGGGCATTTTCAGACAGGAAG	12

Ejemplo 4: Medición de la actividad enzimática de aspartato cinasa en la cepa que tiene el codón de inicio ATG sustituido en el gen *lysC*

Las células en la fase exponencial se recogieron por centrifugación (5000 rpm, 15 minutos) y se lavaron tres veces con tampón Tris.HCl al 0,1 % (pH 8,0), y después se suspendieron en el mismo tampón para una turbidez a 610 nm de 160. Las células se disgregaron durante 6 minutos usando una batidora de microesferas después de añadir microesferas de vidrio a 1,25 g/1,5 ml de la suspensión. El sobrenadante se recogió por centrifugación (15 000 rpm, 20 minutos), y se midió cuantitativamente para el contenido de proteína mediante un método de Bradford (Bradford, M.M 1976. Anal. Biochem. 72:248-254) y se usó como solución de proteína en bruto para medir la actividad enzimática de aspartato cinasa (LysC). Para cuantificar la actividad enzimática de LysC, se añadieron aproximadamente 0,05 ml de la solución de proteína en bruto a una solución de reacción que contenía Tris.HCl 0,1 M (pH 8,0), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) 0,01 M, hidroxilamina.HCl 0,6 M (pH 7,0), ATP 4 mM y aspartato 0,2 M para iniciar la reacción. Se permitió que la mezcla reaccionara a 30 ℃ durante 30 minutos, y se añadió una solución de parada ($FeCl_2$ al 10 %, TCA al 3,3 %, HCl 0,7 N) para terminar la reacción. El sobrenadante se recogió por centrifugación y se midió la absorbancia a 540 nm. La unidad (U) de la actividad enzimática de LysC se definió como nanomoles de hidroxamato aspartato producidos por 1 mg de proteína durante 1 minuto.

Se observó que la cepa KCCM11016P-lysC tiene actividad LysC 2,73 veces mayor que la de la cepa precursora KCCM11016P (tabla 4).

[Tabla 4]

Actividad enzimática de LysC	
Cepa	Actividad enzimática (Factor)
	LysC
KCCM11016P	1,00
KCCM11016P-lysC	2,73

Ejemplo 5: Medición de actividad enzimática de transcetolasa en la cepa que tiene el codón de inicio ATG sustituido en el gen *tkt*

Las células en la fase exponencial se recogieron por centrifugación (5000 rpm, 15 minutos) y se lavaron tres veces con tampón Tris.HCl al 0,1 % (pH 7,5), y después se suspendieron en el mismo tampón para una turbidez a 610 nm de 160. Las células se disgregaron durante 6 minutos usando una batidora de microesferas después de añadir microesferas de vidrio a 1,25 g/1,5 ml de la suspensión. El sobrenadante se recogió por centrifugación (15 000 rpm, 20 minutos), y se midió cuantitativamente para el contenido de proteína mediante un método de Bradford y se usó como solución de proteína en bruto para medir la actividad enzimática de transcetolasa (Tkt). Para cuantificar la actividad enzimática de Tkt, la solución de proteína en bruto se añadió a una solución de reacción que contenía Tris.HCl 0,1 M (pH 7,5), D-R5P 10 mM, D-Xu5P 2 mM, ThDP 10 µM, $MgCl_2$ 1,2 mM, NADH 100 µM, 1 unidad de triosafosfato isomerasa, 1 unidad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa por 1 ml para iniciar la reacción. Se permitió que la mezcla reaccionara a 30 ℃ durante 20~30 minutos, y se midió la absorbancia a 340 nm. La unidad (U) de la actividad enzimática de Tkt se definió como la cantidad (mg) de la enzima que cataliza la producción de 1 µmol de gliceraldehído 3-fosfato durante 1 minuto, y la actividad específica se definió como unidades/mg (Biochem.J. (2004)382, 759-767).

Se observó que la cepa KCCM11016P-tkt tiene actividad Tkt 3,5 veces mayor que la de la cepa precursora KCCM11016P (tabla 5).

[Tabla 5]

Actividad enzimática de Tkt	
Cepa	Actividad enzimática (Factor)
	Tkt
KCCM11016P	1,00
KCCM11016P-tkt	3,5

Ejemplo 6: Medición de la actividad enzimática de piruvato carboxilasa en la cepa que tiene el codón de inicio ATG sustituido en el gen *pyc*

Las células en la fase exponencial se recogieron por centrifugación (5000 rpm, 15 minutos) y se lavaron dos veces con tampón Tris.HCl 50 mM (pH 6,3) que contenía cloruro de sodio (NaCl) 50 mM, y después se suspendieron en tampón HEPES 100 mM (pH 7,5) que contenía glicerol al 20 %. Se añadió CTAB a la suspensión hasta una concentración de un 0,3 %, y se dejó en hielo durante 1 minuto. Las células se recogieron por centrifugación (5000 rpm, 10 minutos) y después se suspendieron tampón Tris.HCl 100 mM (pH 7,3). El contenido de proteína se midió cuantitativamente mediante un método de Bradford y se usó como una solución de proteína en bruto para medir la actividad enzimática de piruvato carboxilasa (Pyc). Para cuantificar la actividad enzimática de Pyc, la solución de proteína en bruto se añadió a una solución de reacción que contenía $NaHCO_3$ 25 mM, $MgCl_2$ 5 mM, piruvato 3 mM y ATP 4 mM para iniciar la reacción. Se permitió que la mezcla reaccionara a 30 ℃ durante 1,5 minutos, y se añadieron 80 µl de una solución de parada (ácido o-fosfórico al 30 %) para terminar la reacción. El sobrenadante se recogió por centrifugación (12 000 rpm, 15 min, 4 ℃). Se añadieron 50 µl del sobrenadante, Tris.HCl 150 mM (pH 7,8), NADH 150 µM y 2,5 U de lactato deshidrogenasa por 1 ml y se midió la absorbancia a 340 a 37 ℃. La unidad (U) de la actividad enzimática de Pyc se definió como nanomoles del lactato producidos por 1 mg de proteína durante 1 minuto.

Se observó que la cepa KCCM11016P-pyc tenía actividad Pyc 1,89 veces mayor que la de la cepa precursora KCCM11016P (tabla 6).

[Tabla 6]

Actividad enzimática de Pyc	
Cepa	Actividad enzimática (Factor)
	Pyc
KCCM11016P	1,00
KCCM11016P-pyc	1,89

Ejemplo *7:* Desarrollo de cepas derivadas de KCCM11016P que tienen codones de inicio ATG sustituidos en dos o más genes entre los genes *lysC,* tkt y *pyc*

Como vectores recombinantes, se usaron pDZ-lysC(ATG) pDZ-tkt(ATG) pDZ-pyc(ATG) preparados en los ejemplos 1, 2 y 3, y el proceso de preparación es el siguiente.

El vector pDZ-tkt(ATG) se transformó en KCCM11016P-lysC del ejemplo 1, en que el codón de inicio GTG de *lysC* estaba sustituido con ATG, y mediante un segundo cruce, se sustituyeron los codones de inicio de *lysC* y *tkt* en el cromosoma con ATG para obtener KCCM11016P-lysC-tkt. La sustitución de nucleótidos del codón de inicio en la cepa seleccionada se confirmó finalmente por PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO. 5 y 8 y después analizando la secuencia de nucleótidos del sitio diana.

De la misma manera que en el ejemplo 1, el vector pDZ-pyc (ATG) se transformó en KCCM11016P-lysC del ejemplo 1, en que el codón de inicio GTG de *lysC* estaba sustituido con ATG, y mediante un segundo cruce, los codones de inicio de *lysC* y *pyc* en el cromosoma se sustituyeron con ATG para obtener KCCM11016P-lysC-pyc. La sustitución de nucleótidos del codón de inicio en la cepa seleccionada se confirmó finalmente por PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO. 9 y 12 y después analizando la secuencia de nucleótidos del sitio diana.

El vector pDZ-tkt(ATG) se transformó en KCCM11016P-lysC-pyc del presente ejemplo, en que el codón de inicio GTG de *lysC* y *pyc* está sustituido con ATG, y mediante un segundo cruce, se sustituyeron los codones de inicio de *lysC, pyc* y *tkt* en el cromosoma con ATG para obtener KCCM11016P-lysC-pyc-tkt. La sustitución de nucleótidos del codón de inicio en la cepa seleccionada se confirmó finalmente por PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO. 5 y 8 y después analizando la secuencia de nucleótidos del sitio diana.

Las combinaciones anteriores de los genes son con fines ilustrativos únicamente.

Ejemplo 8: Producción de lisina en la cepa que tiene el codón de inicio ATG sustituido

Se cultivaron KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-tkt, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-tkt, KCCM11016P-lysC-pyc, KCCM11016P-lysC-pyc-tkt preparados finalmente en los ejemplos 1, 2, 3 y 7 para la producción de L-lisina mediante el siguiente método.

Las cepas precursoras KCCM11016P y KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-tkt, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-tkt, KCCM11016P-lysC-pyc, KCCM11016P-lysC-pyc-tkt se inocularon en los respectivos matraces con deflectores en ángulo de 250 ml que contenían 25 ml del medio de siembra descrito a continuación, y el resultante se cultivó a 30 ℃ con agitación a 200 rpm durante 20 horas. Se inoculó 1 ml del caldo de cultivo de siembra resultante en un matraz con deflectores en ángulo de 250 ml que contenía 24 ml del medio de producción descrito a continuación, y se cultivaron a 30 ℃ con agitación (200 rpm) durante 120 horas.

Después de completarse el cultivo, se midió la cantidad de L-lisina producida por HPLC. Los resultados de medir la L-lisina en los caldos de cultivo de KCCM11016P y KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-tkt, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-tkt, KCCM11016P-lysC-pyc, KCCM11016P-lysC-pyc-tkt se muestran en la siguiente tabla 7.

[Tabla 7]

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	45,2	44,7	45,6
KCCM11016P-lysC	47,5	46,2	47,9
KCCM11016P-tkt	47,4	48,5	47,0
KCCM11016P-pyc	47,9	46,3	47,8
KCCM11016P-lysC-tkt	49,7	49,3	49,2
KCCM11016P-lysC-pyc	50,1	48,9	49,6
KCCM11016P-lysC-pyc-tkt	50,7	50,2	51,1

Medio de siembra (pH 7,0)

20 g de azúcar sin procesar, 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 1,5 g de urea, 4 g de KH_2PO_4, 8 g de K_2HPO_4, 0,5 g de $MgSO_4$ $7H_2O$, 100 µg de biotina, 1000 µg de tiamina-HCl, 2000 µg de pantotenato de calcio, 2000 µg de nicotinamida (en 1 litro de agua destilada)

Medio de producción (pH 7,0)

100 g de glucosa, 40 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2,5 g de proteína de soja, 5 g de sólidos de macerado del maíz, 3 g de urea, 1 g de KH_2PO_4, 0,5 g de $MgSO_4$ $7H_2O$, 100 µg de biotina, 1000 µg de tiamina-HCl, 2000 µg de pantotenato de calcio, 3000 µg de nicotinamida, 30 g de $CaCO_3$ (en 1 litro de agua destilada)

Como se muestra en la tabla 7, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-lysC, KCCM11016P-tkt, KCCM11016P-pyc, KCCM11016P-lysC-tkt y KCCM11016P-lysC-pyc que tienen el codón de inicio ATG sustituido mostraban un aumento de un 4~9 % en la productividad de L-lisina, en comparación con la cepa precursora KCCM11016P. En particular, se descubrió que KCCM11016P-lysC-pyc-tkt en la que se han introducido los tres genes mostraba un aumento en la productividad de L-lisina tan elevada como de un 12 %, en comparación con la cepa precursora KCCM11016P.

Ejemplo 9: Desarrollo de cepa derivada de KFCC10750 que tiene codones de inicio ATG sustituidos en los genes *lysC, tkt,* y *pyc* y comparación de la productividad de lisina

Para examinar si la sustitución de los codones de inicio con ATG en los genes *lysC, pyc* y *tkt* también afecta a la productividad de lisina en otras cepas productoras de lisina que pertenecen a *Corynebacterium glutamicum,* se introdujeron los tres genes en la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750 (patente coreana n.º 10-0073610), que mostró el mejor efecto de todos de aumento de la productividad de lisina en el ejemplo 8 para preparar una cepa recombinante, que se llamó KFCC10750-lysC-pyc-tkt. La cepa se cultivó de la misma manera que en el ejemplo 8 y se analizó la concentración de L-lisina (tabla 8).

[Tabla 8]

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KFCC10750	38,3	38	38,5
KFCC10750-lysC-pyc-tkt	44,1	43,8	44,5

Como se muestra en la tabla 8, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10750-lysC-pyc-tkt con los tres genes introducidos mostró un aumento de un 15 % en la productividad de lisina, en comparación con la cepa precursora KFCC10750.

Ejemplo 10: Desarrollo de cepa derivada de KCCM10770P que tiene codones de inicio ATG sustituidos en los genes *lysC, tkt, pyc* y comparación de la productividad de lisina

Se introdujeron los tres genes en otra cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (patente coreana n.º 10-0924065), que mostró el mejor efecto de todos de aumento de la productividad de lisina en el ejemplo 8 para preparar una cepa recombinante, que se llamó KCCM10770P-lysC-pyc-tkt. La cepa se cultivó de la misma manera que en el ejemplo 8 y se analizó la concentración de L-lisina (tabla 9).

[Tabla 9]

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM10770P	47,8	47,2	47,5
KCCM 10770P-lysC-pyc-tkt	52,8	52,8	52,4

Como se muestra en la tabla 9, *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P-lysC-pyc-tkt con los tres genes introducidos mostró un aumento de un 11 % en la productividad de lisina, en comparación con la cepa precursora KCCM10770P.

Ejemplo 11: Desarrollo de cepa derivada de CJ3P que tiene codones de inicio ATG sustituidos en los genes *lysC, tkt, pyc* y comparación de la productividad de lisina

Se introdujeron los tres genes en otra cepa productora de L-lisina más *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder et al., Genome Biology 2012, 13:R40) que mostró el mejor efecto de todos de aumento de la productividad de lisina en el ejemplo 8 para preparar una cepa recombinante, que se llamó CJ3P-lysC-pyc-tkt. La cepa se cultivó de la misma manera que en el ejemplo 8 y se analizó la concentración de L-lisina (tabla 10).

[Tabla 10]

Cepa	Lisina (g/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
CJ3P	8,3	8	8,4
CJ3P-lysC-pyc-tkt	9,7	9,6	10,0

Como se muestra en la tabla 10, *Corynebacterium glutamicum* CJ3P-lysC-pyc-tkt con los tres genes introducidos mostró un aumento de un 18 % en la productividad de lisina, en comparación con la cepa precursora CJ3P.

Efecto

La presente divulgación proporciona un microorganismo de *Corynebacterium* sp. que tiene productividad mejorada de L-lisina, en que los codones de inicio de uno o más genes que codifican aspartato cinasa, transcetolasa o piruvato carboxilasa están sustituidos para potenciar las actividades de las enzimas correspondientes, en comparación con sus actividades endógenas en un microorganismo natural.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Método de producción de L-lisina usando microorganismo que tienen capacidad de producir L-lisina

<130> OPA12190/PCT

<150> KR10-2011-0139527
<151> 21/12/2011

<160> 18

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 36
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador lysC/ATG/FX

<400> 1
ccggggatcc tctagactta gggagccatc ttttgg 36

<210> 2
<211> 18
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador lysC/ATG/R

<400> 2
ccagggccat ctttgtgc 18

<210> 3
<211> 18
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador lysC/ATG/F

<400> 3
gcacaaagat ggccctgg 18

<210> 4
<211> 36
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador lysC/ATG/RX

<400> 4
gcaggtcgac tctagaagtg acatcaacaa tgcgtg 36

<210> 5
<211> 36
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador tkt/ATG/FX

<400> 5
ccggggatcc tctagagaaa tagatgggtg tagacg 36

<210> 6
<211> 23
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador tkt/ATG/R4

<400> 6
gtgacagcgt catggtggtc aat 23

<210> 7
<211> 23
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador tkt/ATG/F4

<400> 7
attgaccacc atgacgctgt cac 23

<210> 8
<211> 36
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador tkt/ATG/RX

<400> 8
gcaggtcgac tctagacgca gagccttcag gtcatc 36

<210> 9
<211> 36
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador pyc/ATG/FX

<400> 9
ccggggatcc tctagatttt ggggaaaagt gcaaag 36

<210> 10
<211> 19
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador pyc/ATG/R

<400> 10
gagtcgacat tagagtaat 19

<210> 11
<211> 19
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador pyc/ATG/F

<400> 11
attactctaa tgtcgactc 19

<210> 12
<211> 36
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador pyc/ATG/RX

<400> 12
gcaggtcgac tctagagggc attttcagac aggaag 36

<210> 13
<211> 1266
< 212> ADN
<213> lysC de *Corynebacterium glutamicum*

<400> 13

gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggt tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60

aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120

tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180

ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc taacgctctc 240

gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300

ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggtcgt 360

gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca gggtgttaat 420

aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggtt ctgacaccac tgcagttgcg 480

ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cggtgtgtat 540

accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600

atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt tgaatacgct 660

cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720

attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780

gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840

aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900

tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960

cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020

gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080

accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140

tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200

ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260

cgctaa 1266

<210> 14
<211> 2094
< 212> ADN
<213> tkt de *Corynebacterium glutamicum*

<400> 14

```
ttgacgctgt cacctgaact tcaggcgctc actgtacgca ttacccctc tgattggtcc        60
gatgtggaca ccaaggctgt agacactgtt cgtgtcctcg ctgcagacgc tgtagaaaac       120
tgtggctccg gccacccagg caccgcaatg agcctggctc cccttgcata caccttgtac       180
cagcgggtta tgaacgtaga tccacaggac accaactggg caggccgtga ccgcttcgtt       240
ctttcttgtg gccactcctc tttgacccag tacatccagc tttacttggg tggattcggc       300
cttgagatgg atgacctgaa ggctctgcgc acctgggatt ccttgacccc aggacaccct       360
gagtaccgcc acaccaaggg cgttgagatc accactggcc ctcttggcca gggtcttgca       420
tctgcagttg gtatggccat ggctgctcgt cgtgagcgtg gcctattcga cccaaccgct       480
gctgagggcg aatccccatt cgaccaccac atctacgtca ttgcttctga tggtgacctg       540
caggaaggtg tcacctctga ggcatcctcc atcgctggca cccagcagct gggcaacctc       600
atcgtgttct gggatgacaa ccgcatctcc atcgaagaca acactgagat cgctttcaac       660
gaggacgttg ttgctcgtta caaggcttac ggctggcaga ccattgaggt tgaggctggc       720
gaggacgttg cagcaatcga agctgcagtg gctgaggcta agaaggacac caagcgacct       780
```

accttcatcc gcgttcgcac catcatcggc ttcccagctc caactatgat gaacaccggt 840

gctgtgcacg gtgctgctct tggcgcagct gaggttgcag caaccaagac tgagcttgga 900

ttcgatcctg aggctcactt cgcgatcgac gatgaggtta tcgctcacac ccgctccctc 960

gcagagcgcg ctgcacagaa gaaggctgca tggcaggtca agttcgatga gtgggcagct 1020

gccaaccctg agaacaaggc tctgttcgat cgcctgaact cccgtgagct tccagcgggc 1080

tacgctgacg agctcccaac atgggatgca gatgagaagg gcgtcgcaac tcgtaaggct 1140

tccgaggctg cacttcaggc actgggcaag acccttcctg agctgtgggg cggttccgct 1200

gacctcgcag gttccaacaa caccgtgatc aagggctccc cttccttcgg ccctgagtcc 1260

atctccaccg agacctggtc tgctgagcct tacggccgta acctgcactt cggtatccgt 1320

gagcacgcta tgggatccat cctcaacggc atttccctcc acggtggcac ccgcccatac 1380

ggcggaacct tcctcatctt ctccgactac atgcgtcctg cagttcgtct tgcagctctc 1440

atggagaccg acgcttacta cgtctggacc cacgactcca tcggtctggg cgaagatggc 1500

ccaacccacc agcctgttga aaccttggct gcactgcgcg ccatcccagg tctgtccgtc 1560

ctgcgtcctg cagatgcgaa cgagaccgcc caggcttggg ctgcagcact tgagtacaag 1620

gaaggcccta agggtcttgc actgacccgc cagaacgttc ctgttctgga aggcaccaag 1680

gagaaggctg ctgaaggcgt tcgccgcggt ggctacgtcc tggttgaggg ttccaaggaa 1740

accccagatg tgatcctcat gggctccggc tccgaggttc agcttgcagt taacgctgcg 1800

aaggctctgg aagctgaggg cgttgcagct cgcgttgttt ccgttccttg catggattgg 1860

ttccaggagc aggacgcaga gtacatcgag tccgttctgc ctgcagctgt gaccgctcgt 1920

gtgtctgttg aagctggcat cgcaatgcct tggtaccgct tcttgggcac ccagggccgt 1980

gctgtctccc ttgagcactt cggtgcttct gcggattacc agaccctgtt tgagaagttc 2040

ggcatcacca ccgatgcagt cgtggcagcg gccaaggact ccattaacgg ttaa 2094

<210> 15
<211> 3423
< 212> ADN
<213> pyc de *Corynebacterium glutamicum*

<400> 15

gtgtcgactc acacatcttc aacgcttcca gcattcaaaa agatcttggt agcaaaccgc 60

ggcgaaatcg cggtccgtgc tttccgtgca gcactcgaaa ccggtgcagc cacggtagct 120

atttaccccc gtgaagatcg gggatcattc caccgctctt ttgcttctga agctgtccgc 180

attggtaccg aaggctcacc agtcaaggcg tacctggaca tcgatgaaat tatcggtgca 240

gctaaaaaag ttaaagcaga tgccatttac ccgggatacg gcttcctgtc tgaaaatgcc 300

cagcttgccc gcgagtgtgc ggaaaacggc attactttta ttggcccaac cccagaggtt 360

cttgatctca ccggtgataa gtctcgcgcg gtaaccgccg cgaagaaggc tggtctgcca 420

gttttggcgg aatccacccc gagcaaaaac atcgatgaga tcgttaaaag cgctgaaggc 480

cagacttacc ccatctttgt gaaggcagtt gccggtggtg gcggacgcgg tatgcgtttt 540

gttgcttcac ctgatgagct tcgcaaatta gcaacagaag catctcgtga agctgaagcg 600

gctttcggcg atggcgcggt atatgtcgaa cgtgctgtga ttaaccctca gcatattgaa 660

gtgcagatcc ttggcgatca cactggagaa gttgtacacc tttatgaacg tgactgctca 720

ctgcagcgtc gtcaccaaaa agttgtcgaa attgcgccag cacagcattt ggatccagaa 780

ctgcgtgatc gcatttgtgc ggatgcagta aagttctgcc gctccattgg ttaccagggc 840

gcgggaaccg tggaattctt ggtcgatgaa aagggcaacc acgtcttcat cgaaatgaac 900

ccacgtatcc aggttgagca caccgtgact gaagaagtca ccgaggtgga cctggtgaag 960

gcgcagatgc gcttggctgc tggtgcaacc ttgaaggaat tgggtctgac ccaagataag 1020

atcaagaccc acggtgcagc actgcagtgc cgcatcacca cggaagatcc aaacaacggc 1080

ttccgcccag ataccggaac tatcaccgcg taccgctcac caggcggagc tggcgttcgt 1140

cttgacggtg cagctcagct cggtggcgaa atcaccgcac actttgactc catgctggtg 1200

aaaatgacct gccgtggttc cgactttgaa actgctgttg ctcgtgcaca gcgcgcgttg 1260

gctgagttca ccgtgtctgg tgttgcaacc aacattggtt tcttgcgtgc gttgctgcgg 1320

gaagaggact tcacttccaa gcgcatcgcc accggattca ttgccgatca cccgcacctc 1380

cttcaggctc cacctgctga tgatgagcag ggacgcatcc tggattactt ggcagatgtc 1440

accgtgaaca agcctcatgg tgtgcgtcca aaggatgttg cagctcctat cgataagctg 1500

cctaacatca aggatctgcc actgccacgc ggttcccgtg accgcctgaa gcagcttggc 1560

ccagccgcgt ttgctcgtga tctccgtgag caggacgcac tggcagttac tgataccacc 1620

ttccgcgatg cacaccagtc tttgcttgcg acccgagtcc gctcattcgc actgaagcct 1680

gcggcagagg ccgtcgcaaa gctgactcct gagcttttgt ccgtggaggc ctggggcggc 1740

gcgacctacg atgtggcgat gcgtttcctc tttgaggatc cgtgggacag gctcgacgag 1800

ctgcgcgagg cgatgccgaa tgtaaacatt cagatgctgc ttcgcggccg caacaccgtg 1860

ggatacaccc cgtacccaga ctccgtctgc cgcgcgtttg ttaaggaagc tgccagctcc 1920

ggcgtggaca tcttccgcat cttcgacgcg cttaacgacg tctcccagat gcgtccagca 1980

atcgacgcag tcctggagac caacaccgcg gtagccgagg tggctatggc ttattctggt 2040

gatctctctg atccaaatga aaagctctac accctggatt actacctaaa gatggcagag 2100

gagatcgtca agtctggcgc tcacatcttg gccattaagg atatggctgg tctgcttcgc 2160

ccagctgcgg taaccaagct ggtcaccgca ctgcgccgtg aattcgatct gccagtgcac 2220

```
gtgcacaccc acgacactgc gggtggccag ctggcaacct actttgctgc agctcaagct      2280
ggtgcagatg ctgttgacgg tgcttccgca ccactgtctg gcaccacctc ccagccatcc      2340
ctgtctgcca ttgttgctgc attcgcgcac acccgtcgcg ataccggttt gagcctcgag      2400
gctgtttctg acctcgagcc gtactgggaa gcagtgcgcg gactgtacct gccatttgag      2460
tctggaaccc caggcccaac cggtcgcgtc taccgccacg aaatcccagg cggacagttg      2520
tccaacctgc gtgcacaggc caccgcactg ggccttgcgg atcgtttcga actcatcgaa      2580
gacaactacg cagccgttaa tgagatgctg ggacgcccaa ccaaggtcac cccatcctcc      2640
aaggttgttg gcgacctcgc actccacctc gttggtgcgg gtgtggatcc agcagacttt      2700
gctgccgatc cacaaaagta cgacatccca gactctgtca tcgcgttcct gcgcggcgag      2760
cttggtaacc ctccaggtgg ctggccagag ccactgcgca cccgcgcact ggaaggccgc      2820
tccgaaggca aggcacctct gacggaagtt cctgaggaag agcaggcgca cctcgacgct      2880
gatgattcca aggaacgtcg caatagcctc aaccgcctgc tgttcccgaa gccaaccgaa      2940
gagttcctcg agcaccgtcg ccgcttcggc aacacctctg cgctggatga tcgtgaattc      3000
ttctacggcc tggtcgaagg ccgcgagact ttgatccgcc tgccagatgt gcgcacccca      3060
ctgcttgttc gcctggatgc gatctctgag ccagacgata agggtatgcg caatgttgtg      3120
gccaacgtca acggccagat ccgcccaatg cgtgtgcgtg accgctccgt tgagtctgtc      3180
accgcaaccg cagaaaaggc agattcctcc aacaagggcc atgttgctgc accattcgct      3240
ggtgttgtca ccgtgactgt tgctgaaggt gatgaggtca aggctggaga tgcagtcgca      3300
atcatcgagg ctatgaagat ggaagcaaca atcactgctt ctgttgacgg caaaatcgat      3360
cgcgttgtgg ttcctgctgc aacgaaggtg gaaggtggcg acttgatcgt cgtcgtttcc      3420
taa                                                                   3423
```

<210> 16
<211> 1266
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> lysC con el codón de inicio sustituido

<400> 16

atggccctgg tcgtacagaa atatggcggt tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60

aacgtcgctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120

tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180

ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc taacgctctc 240

gtcgccatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300

ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggtcgt 360

gtgcgtgaag cactcgatga gggcaagatc tgcattgttg ctggtttcca gggtgttaat 420

aaagaaaccc gcgatgtcac cacgttgggt cgtggtggtt ctgacaccac tgcagttgcg 480

ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cggtgtgtat 540

accgctgacc cgcgcatcgt tcctaatgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600

atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttggtgc tgcgcagtgt tgaatacgct 660

cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720

attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tgtcgcaacc 780

gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840

aaggttttcc gtgcgttggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900

tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc cgacggccgc 960

cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggaccaa tgtgctttac 1020

gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080

accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140

tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200

ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260

cgctaa 1266

<210> 17
<211> 2094
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> tkt con el codón de inicio sustituido

<400> 17

```
atgacgctgt cacctgaact tcaggcgctc actgtacgca attacccctc tgattggtcc      60
gatgtggaca ccaaggctgt agacactgtt cgtgtcctcg ctgcagacgc tgtagaaaac     120
tgtggctccg gccacccagg caccgcaatg agcctggctc cccttgcata caccttgtac     180
cagcgggtta tgaacgtaga tccacaggac accaactggg caggccgtga ccgcttcgtt     240
ctttcttgtg gccactcctc tttgacccag tacatccagc tttacttggg tggattcggc     300
cttgagatgg atgacctgaa ggctctgcgc acctgggatt ccttgacccc aggacaccct     360
gagtaccgcc acaccaaggg cgttgagatc accactggcc ctcttggcca gggtcttgca     420
tctgcagttg gtatggccat ggctgctcgt cgtgagcgtg gcctattcga cccaaccgct     480
gctgagggcg aatccccatt cgaccaccac atctacgtca ttgcttctga tggtgacctg     540
```

caggaaggtg tcacctctga ggcatcctcc atcgctggca cccagcagct gggcaacctc 600

atcgtgttct gggatgacaa ccgcatctcc atcgaagaca acactgagat cgctttcaac 660

gaggacgttg ttgctcgtta caaggcttac ggctggcaga ccattgaggt tgaggctggc 720

gaggacgttg cagcaatcga agctgcagtg gctgaggcta agaaggacac caagcgacct 780

accttcatcc gcgttcgcac catcatcggc ttcccagctc caactatgat gaacaccggt 840

gctgtgcacg gtgctgctct tggcgcagct gaggttgcag caaccaagac tgagcttgga 900

ttcgatcctg aggctcactt cgcgatcgac gatgaggtta tcgctcacac ccgctccctc 960

gcagagcgcg ctgcacagaa gaaggctgca tggcaggtca agttcgatga gtgggcagct 1020

gccaaccctg agaacaaggc tctgttcgat cgcctgaact cccgtgagct tccagcgggc 1080

tacgctgacg agctcccaac atgggatgca gatgagaagg gcgtcgcaac tcgtaaggct 1140

tccgaggctg cacttcaggc actgggcaag acccttcctg agctgtgggg cggttccgct 1200

gacctcgcag gttccaacaa caccgtgatc aagggctccc cttccttcgg ccctgagtcc 1260

atctccaccg agacctggtc tgctgagcct tacggccgta acctgcactt cggtatccgt 1320

gagcacgcta tgggatccat cctcaacggc atttccctcc acggtggcac ccgcccatac 1380

ggcggaacct tcctcatctt ctccgactac atgcgtcctg cagttcgtct tgcagctctc 1440

atggagaccg acgcttacta cgtctggacc cacgactcca tcggtctggg cgaagatggc 1500

ccaacccacc agcctgttga aaccttggct gcactgcgcg ccatcccagg tctgtccgtc 1560

ctgcgtcctg cagatgcgaa cgagaccgcc caggcttggg ctgcagcact tgagtacaag 1620

gaaggcccta agggtcttgc actgacccgc cagaacgttc ctgttctgga aggcaccaag 1680

gagaaggctg ctgaaggcgt tcgccgcggt ggctacgtcc tggttgaggg ttccaaggaa 1740

accccagatg tgatcctcat gggctccggc tccgaggttc agcttgcagt taacgctgcg 1800

aaggctctgg aagctgaggg cgttgcagct cgcgttgttt ccgttccttg catggattgg 1860

ttccaggagc aggacgcaga gtacatcgag tccgttctgc ctgcagctgt gaccgctcgt 1920

gtgtctgttg aagctggcat cgcaatgcct tggtaccgct tcttgggcac ccagggccgt 1980

gctgtctccc ttgagcactt cggtgcttct gcggattacc agaccctgtt tgagaagttc 2040

ggcatcacca ccgatgcagt cgtggcagcg gccaaggact ccattaacgg ttaa 2094

<210> 18
<211> 3423
< 212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> pyc con el codón de inicio sustituido

<400> 18

atgtcgactc acacatcttc aacgcttcca gcattcaaaa agatcttggt agcaaaccgc 60

ggcgaaatcg cggtccgtgc tttccgtgca gcactcgaaa ccggtgcagc cacggtagct 120

atttaccccc gtgaagatcg gggatcattc caccgctctt ttgcttctga agctgtccgc 180

attggtaccg aaggctcacc agtcaaggcg tacctggaca tcgatgaaat tatcggtgca 240

gctaaaaaag ttaaagcaga tgccatttac ccgggatacg gcttcctgtc tgaaaatgcc 300

cagcttgccc gcgagtgtgc ggaaaacggc attactttta ttggcccaac cccagaggtt 360

cttgatctca ccggtgataa gtctcgcgcg gtaaccgccg cgaagaaggc tggtctgcca 420

gttttggcgg aatccacccc gagcaaaaac atcgatgaga tcgttaaaag cgctgaaggc 480

cagacttacc ccatctttgt gaaggcagtt gccggtggtg gcggacgcgg tatgcgtttt 540

gttgcttcac ctgatgagct tcgcaaatta gcaacagaag catctcgtga agctgaagcg 600

gctttcggcg atggcgcggt atatgtcgaa cgtgctgtga ttaaccctca gcatattgaa 660

gtgcagatcc ttggcgatca cactggagaa gttgtacacc tttatgaacg tgactgctca 720

ctgcagcgtc gtcaccaaaa agttgtcgaa attgcgccag cacagcattt ggatccagaa 780

ctgcgtgatc gcatttgtgc ggatgcagta aagttctgcc gctccattgg ttaccagggc 840

gcgggaaccg tggaattctt ggtcgatgaa aagggcaacc acgtcttcat cgaaatgaac 900

ccacgtatcc aggttgagca caccgtgact gaagaagtca ccgaggtgga cctggtgaag 960

gcgcagatgc gcttggctgc tggtgcaacc ttgaaggaat tgggtctgac ccaagataag 1020

atcaagaccc acggtgcagc actgcagtgc cgcatcacca cggaagatcc aaacaacggc 1080

ttccgcccag ataccggaac tatcaccgcg taccgctcac caggcggagc tggcgttcgt 1140

cttgacggtg cagctcagct cggtggcgaa atcaccgcac actttgactc catgctggtg 1200

aaaatgacct gccgtggttc cgactttgaa actgctgttg ctcgtgcaca gcgcgcgttg 1260

gctgagttca ccgtgtctgg tgttgcaacc aacattggtt tcttgcgtgc gttgctgcgg 1320

gaagaggact tcacttccaa gcgcatcgcc accggattca ttgccgatca cccgcacctc 1380

cttcaggctc cacctgctga tgatgagcag ggacgcatcc tggattactt ggcagatgtc 1440

accgtgaaca agcctcatgg tgtgcgtcca aaggatgttg cagctcctat cgataagctg 1500

cctaacatca aggatctgcc actgccacgc ggttcccgtg accgcctgaa gcagcttggc 1560

ccagccgcgt ttgctcgtga tctccgtgag caggacgcac tggcagttac tgataccacc 1620

ttccgcgatg cacaccagtc tttgcttgcg acccgagtcc gctcattcgc actgaagcct 1680

gcggcagagg ccgtcgcaaa gctgactcct gagcttttgt ccgtggaggc ctggggcggc 1740

gcgacctacg atgtggcgat gcgtttcctc tttgaggatc cgtgggacag gctcgacgag 1800

ctgcgcgagg cgatgccgaa tgtaaacatt cagatgctgc ttcgcggccg caacaccgtg 1860

ggatacaccc cgtacccaga ctccgtctgc cgcgcgtttg ttaaggaagc tgccagctcc 1920

ggcgtggaca tcttccgcat cttcgacgcg cttaacgacg tctcccagat gcgtccagca 1980

atcgacgcag tcctggagac caacaccgcg gtagccgagg tggctatggc ttattctggt 2040

gatctctctg atccaaatga aaagctctac accctggatt actacctaaa gatggcagag 2100

gagatcgtca agtctggcgc tcacatcttg gccattaagg atatggctgg tctgcttcgc 2160

ccagctgcgg taaccaagct ggtcaccgca ctgcgccgtg aattcgatct gccagtgcac 2220

gtgcacaccc acgacactgc gggtggccag ctggcaacct actttgctgc agctcaagct 2280

ggtgcagatg ctgttgacgg tgcttccgca ccactgtctg gcaccacctc ccagccatcc 2340

ctgtctgcca ttgttgctgc attcgcgcac acccgtcgcg ataccggttt gagcctcgag 2400

gctgtttctg acctcgagcc gtactgggaa gcagtgcgcg gactgtacct gccatttgag 2460

tctggaaccc caggcccaac cggtcgcgtc taccgccacg aaatcccagg cggacagttg 2520

tccaacctgc gtgcacaggc caccgcactg ggccttgcgg atcgtttcga actcatcgaa 2580

gacaactacg cagccgttaa tgagatgctg ggacgcccaa ccaaggtcac cccatcctcc 2640

aaggttgttg gcgacctcgc actccacctc gttggtgcgg gtgtggatcc agcagacttt 2700

gctgccgatc cacaaaagta cgacatccca gactctgtca tcgcgttcct gcgcggcgag 2760

cttggtaacc ctccaggtgg ctggccagag ccactgcgca cccgcgcact ggaaggccgc 2820

tccgaaggca aggcacctct gacggaagtt cctgaggaag agcaggcgca cctcgacgct 2880

gatgattcca aggaacgtcg caatagcctc aaccgcctgc tgttcccgaa gccaaccgaa 2940

gagttcctcg agcaccgtcg ccgcttcggc aacacctctg cgctggatga tcgtgaattc 3000

ttctacggcc tggtcgaagg ccgcgagact ttgatccgcc tgccagatgt gcgcacccca 3060

ctgcttgttc gcctggatgc gatctctgag ccagacgata agggtatgcg caatgttgtg 3120

gccaacgtca acggccagat ccgcccaatg cgtgtgcgtg accgctccgt tgagtctgtc 3180

accgcaaccg cagaaaaggc agattcctcc aacaagggcc atgttgctgc accattcgct 3240

ggtgttgtca ccgtgactgt tgctgaaggt gatgaggtca aggctggaga tgcagtcgca 3300

atcatcgagg ctatgaagat ggaagcaaca atcactgctt ctgttgacgg caaaatcgat 3360

cgcgttgtgg ttcctgctgc aacgaaggtg gaaggtggcg acttgatcgt cgtcgtttcc 3420

taa 3423

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo productor de lisina que tiene actividad potenciada de aspartato cinasa (LysC) en comparación con la actividad endógena de la misma,
y actividades potenciadas de una o más enzimas seleccionadas de transcetolasa (Tkt) y piruvato carboxilasa (Pyc) en comparación con las actividades endógenas de las mismas,
en el que el codón de inicio de una combinación de polinucleótidos que codifican (i) LysC y (ii) Tkt y/o Pyc están sustituidos por ATG,
y en el que el microorganismo es *Corynebacterium* sp.

2. El microorganismo productor de lisina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo de *Corynebacterium* sp. es *Corynebacterium glutamicum.*

3. Un método para producir L-lisina, que comprende las etapas de cultivar el microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2; y recuperar L-lisina del microorganismo cultivado o el caldo de cultivo.

4. El microorganismo productor de lisina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que, antes de la sustitución con ATG, el codón de inicio del polinucleótido que codifica aspartato cinasa (LysC) o piruvato carboxilasa (Pyc) es GTG y el codón de inicio del polinucleótido que codifica transcetolasa (Tkt) es TTG.

5. El microorganismo productor de lisina de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos que codifican enzimas cuyo codón de inicio está sustituido con ATG están representados por una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente.