

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 422**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/77** (2006.01)

**C12P 13/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2009 E 15184909 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2993233**

54 Título: **Promotor mejorado y un procedimiento de producción de L-lisina mediante el uso del mismo**

30 Prioridad:

**31.01.2008 KR 20080010073**

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

**19.02.2020**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
500 Namdaemunro 5-ga, Jung-gu  
Seoul 100-749, KR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 743 422 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Promotor mejorado y un procedimiento de producción de L-lisina mediante el uso del mismo

5 La presente invención se refiere a un promotor mejorado y a un procedimiento de producción de L-lisina mediante el uso del mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico de origen *Corynebacterium glutamicum* que contiene un promotor modificado del gen ddh con ID de gen del NCBI NCgl2528, dicha molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. El promotor modificado contenido en este ácido nucleico muestra una actividad promotora mejorada cuando  
10 está operativamente unido a un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa. Además, la presente invención se refiere a un vector que contiene la molécula de ácido nucleico, un transformante con el vector introducido en el mismo, y un procedimiento de producción de L-lisina usando el transformante.

15 Las bacterias corineformes son microorganismos tradicionalmente industriales que se utilizan más ampliamente para la producción de una variedad de materiales químicos útiles en la alimentación animal, la medicina y las industrias alimentarias, incluidos los aminoácidos, tales como L-lisina, L-treonina, L-arginina y ácido glutámico, y materiales relacionados con el ácido nucleico. Estos microorganismos son Gram-positivos y requieren biotina para su crecimiento. Se dividen por dislocación y su pobre capacidad para degradar los metabolitos que producen se puede utilizar de manera ventajosa. Ejemplos representativos de bacterias corineformes incluyen el  
20 género *Corynebacterium*, como *Corynebacterium glutamicum*, el género *Brevibacterium*, como *Brevibacterium flavum*, *Athrobacter spp.* y *Microbacterium spp.* etc.

25 La L-lisina es un L-aminoácido comercialmente importante que se usa como un aditivo para piensos en la nutrición animal gracias a su capacidad de ayudar al cuerpo a absorber otros aminoácidos, mejorando así la calidad del alimento. Para el cuerpo, la L-lisina se usa como ingrediente de una solución de inyección, y también encuentra aplicaciones en el campo farmacéutico. Por lo tanto, la producción industrial de L-lisina es un procedimiento industrial económicamente importante.

30 El rendimiento de producción de lisina se correlaciona con la actividad enzimática en la ruta de biosíntesis que puede mejorarse usualmente amplificando uno o más genes en la ruta de biosíntesis de lisina o empleando un promotor modificado para los genes. Las cepas de *Corynebacterium* con genes asociados a la biosíntesis de lisina mejorados en las mismas y la producción de L-lisina mediante el uso de las mismas son bien conocidas. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 6,746,855 divulga un procedimiento para la producción de L-lisina fermentando una corinebacteria productora de L-lisina con el gen lysE mejorado (gen portador de exportación de  
35 lisina), en el que adicionalmente se mejoran los genes seleccionados del grupo que consiste en un gen dapA, un gen lysC, un gen pyc y un gen dapB. La Patente de Estados Unidos N.º 6,221,636 divulga corinebacterias transformadas con un ADN recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una aspartoquinasa en la que la inhibición por retroalimentación por parte de la L-lisina y la L-treonina está sustancialmente desensibilizada y una secuencia de nucleótidos que codifica una diaminopimelato  
40 descarboxilasa.

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

50 La Patente Coreana N.º 10-0345592 describe una cepa de *Escherichia* en la que se introducen dapA y lysC, ambos modificados para eliminar la inhibición de retroalimentación por parte de L-lisina y en los que se amplifican los genes dapB y ddh, y un procedimiento para la producción de L-lisina mediante el uso de los mismos.

55 Para el desarrollo de la bacteria corineforme en variantes capaces de producir productos diana a altos títulos, se necesita una técnica de ingeniería genética o metabólica mediante la cual los genes implicados en el metabolismo puedan controlarse selectivamente. Para este fin, es importante modificar una actividad promotora, una región de ADN reguladora que proporciona un sitio de unión inicial seguro para la ARN polimerasa para controlar la transcripción de genes regulados.

60 Los promotores modificados que se originan a partir de la bacteria corineforme se encuentran en muchas patentes. Por ejemplo, los promotores de la corinebacteria se describen en la Patente de Estados Unidos N.º 5,700,661 titulada "ADN regulador de la expresión génica", la Patente de Estados Unidos N.º 5,965,391 titulada "ADN que regula la expresión génica en la bacteria corineforme", la Patente de Estados Unidos N.º 7,141,388 "Secuencias de nucleótidos para regulación transcripcional en *corynebacterium glutamicum*", y la Patente Coreana N.º 10-0653742 titulada "Novedoso promotor inducible por L-lisina", y un promotor de *Corynebacterium ammoniagenes* se describe en la Publicación de Patente Coreana N.º 10-2006-0068505 titulada "Novedoso  
65 ácido nucleico promotor que se origina de bacterias del género *Corynebacterium*, casete de expresión que comprende el promotor y vector que comprende el casete, célula huésped que comprende el vector y

procedimiento para expresar un gen usando la célula".

5 Sin embargo, hasta ahora, no se ha divulgado ninguna de las bacterias corineformes que se mejoran en cuanto a la actividad de ddh (diaminopimelato deshidrogenasa) que juega un papel crítico en la ruta de biosíntesis de lisina, con un promotor mejorado para la enzima sustituida por la endógena en el genoma de la célula huésped.

10 Conduciendo a la presente invención, una investigación intensiva y exhaustiva hacia la producción de L-lisina, dio como resultado el hallazgo de que, cuando se transforma con un promotor del gen ddh, modificado en bases particulares, en el genoma de *Corynebacterium*, un microorganismo del género *Corynebacterium* muestra actividad de diaminopimelato deshidrogenasa mejorada sobre la actividad endógena.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una molécula de ácido nucleico que se origina de *Corynebacterium glutamicum* que exhibe una actividad promotora mejorada.

15 Es otro objeto de la presente invención proporcionar un vector que contiene la molécula de ácido nucleico que exhibe una actividad promotora mejorada.

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

20 Es todavía un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento de producción de L-lisina fermentando el transformante.

25 La presente invención está definida por las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferentes de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes. Por consiguiente, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que contiene un promotor modificado del gen ddh con ID de gen del NCBI NCgl2528, dicho ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 y un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. La invención además se refiere a una célula huésped que es una bacteria corineforme, dicha célula huésped se transforma con el vector, y en la que el promotor de ddh modificado contenido en la molécula de ácido nucleico de la invención se sustituye por el promotor de ddh endógeno mediante recombinación homóloga, de modo que pueda potenciar el nivel de ARNm de un gen ddh. La invención también proporciona un procedimiento de producción de lisina que comprende fermentar la célula huésped de la invención.

35 Cuando se une operativamente a un gen ddh, la molécula de ácido nucleico que se origina de *Corynebacterium glutamicum*, que muestra una actividad promotora mejorada, de acuerdo con la presente invención muestra una mayor actividad promotora que el promotor de tipo salvaje, y por lo tanto puede aumentar la diaminopimelato deshidrogenasa actividad. Por lo tanto, la cepa productora de lisina transformada con la molécula de ácido nucleico puede producir lisina con mayor rendimiento.

40 Las figuras adjuntas muestran:

La Figura 1 es un diagrama que muestra un mapa genético del vector pDZ para la integración en un genoma de *Corynebacterium*.

45 La Figura 2 es un diagrama que muestra un mapa genético del vector pDZ-ddhP1 para el reemplazo del promotor.

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

55 El término "promotor", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una región de ADN que contiene un sitio de unión inicial para la ARN polimerasa y facilita la transcripción de un gen particular aguas abajo de la misma. Es decir, un promotor es una secuencia de nucleótidos no traducida, aguas arriba de una región de codificación, a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen, y usualmente se encuentra cerca de los genes que regula, en la misma cadena y aguas arriba (hacia la región 5' de la cadena homosen sentido).

60 La molécula de ácido nucleico de la presente invención, que se origina de *Corynebacterium glutamicum*, que tiene una actividad promotora, está operativamente unida a un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa. El gen ddh que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa juega un papel importante en la ruta de biosíntesis de lisina en *Corynebacterium spp.*

65 El término "operativamente unido", como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende referirse a un

enlace entre la secuencia de nucleótidos que tiene una actividad promotora de acuerdo con la presente invención y la secuencia promotora en una relación funcional tal que el promotor puede servir para iniciar y mediar en la transcripción de un gen que codifica la diaminopimelato deshidrogenasa. Es decir, cuando está operativamente unida a un gen ddh, la secuencia de nucleótidos que tiene una actividad promotora de acuerdo con la presente invención puede controlar la actividad de transcripción del gen ddh.

La secuencia de nucleótidos que tiene una actividad promotora de acuerdo con la presente invención, que se origina de un promotor del gen ddh de tipo salvaje de *Corynebacterium glutamicum*, se modifica para garantizar una actividad enzimática superior a la actividad endógena. La actividad endógena significa una actividad de enzima en la bacteria corineforme de tipo salvaje. La modificación para garantizar una mayor actividad promotora se puede lograr utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, preferentemente induciendo una mutación en la secuencia de nucleótidos del promotor del gen ddh mediante delección, inserción, sustitución conservativa o no conservativa o una combinación de las mismas.

La molécula de ácido nucleico que tiene una actividad promotora de acuerdo con la presente invención se puede aislar o preparar usando una técnica biológica estándar. Por ejemplo, la PCR se puede realizar para aislamiento en presencia de cebadores adecuados. Alternativamente, se puede sintetizar con una técnica biológica estándar utilizando un sintetizador de ADN automatizado. En una realización, con base en una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que contiene una región promotora de un gen ddh (ID de gen del NCBI: NCgl2528) obtenida de los datos del NIH GenBank, se sintetizaron cuatro cebadores (SEQ ID NO: 3 ~ 6). En presencia de los cebadores, se realizó una PCR para dar una molécula de ácido nucleico que contiene promotor que tenía modificaciones en posiciones de base particulares (SEQ ID NO: 2), con el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 como plantilla.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico que tiene una actividad promotora de *Corynebacterium glutamicum* de acuerdo con la presente invención es útil como un promotor para la expresión génica en procariotas, especialmente *E. coli* o bacterias corineformes. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "bacteria corineforme" se refiere a un microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium* o al género *Brevibacterium*. Los ejemplos de bacterias corineformes útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 y mutantes o cepas productoras de L-aminoácidos que se originan de las mismas, como *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 y *Corynebacterium glutamicum* KFCC11001, con preferencia por *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10881.

Según otro aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un vector en el que se encuentra la molécula de ácido nucleico que tiene una actividad promotora mejorada.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "vector" se refiere a un constructo de ADN en el que un gen de interés está operativamente unido a un elemento regulador para que el gen pueda expresarse en un huésped apropiado que ancla el vector en el mismo. El elemento regulador incluye un promotor para iniciar la transcripción, un operador para controlar la transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión al ribosoma de ARNm y una secuencia para controlar la terminación de la transcripción y la traducción.

Siempre que sea replicable en los huéspedes, cualquier vector conocido en la técnica puede emplearse en la presente invención, sin limitaciones particulares. Por ejemplo, el vector útil en la presente invención puede ser un plásmido, una partícula de fago o simplemente un inserto genómico potencial, pero la presente invención no está limitada por los mismos. Un vector preferente es pACYC177 (New England Biolab, número de acceso de GenBank # X06402). Después de transformarse en un huésped adecuado, el vector puede replicarse o realizar su función independientemente del genoma del huésped o puede integrarse en el genoma mismo.

En mayor detalle, cuando el vector según la presente invención se introduce en una célula huésped, la molécula de ácido nucleico que tiene la actividad promotora en el vector puede sufrir una recombinación homóloga con una región promotora para un gen ddh endógeno en el genoma del huésped, lo que resulta en la integración del vector en el cromosoma de la célula huésped. Por lo tanto, el vector según la presente invención puede comprender además un marcador de selección para indicar la inserción del vector en el cromosoma del huésped. Adaptado para indicar una célula transformada con el vector, es decir, si se inserta un gen de interés en el genoma de la célula huésped, el marcador de selección puede dotar a la célula de la capacidad de mostrar resistencia a fármacos, resistencia a agentes citotóxicos, auxotrofia o seleccionable expresión de fenotipo tal como la expresión de una proteína de superficie. En presencia de un agente selectivo, las células transformadas se pueden seleccionar ya que solo las células que expresan el marcador de selección sobreviven o muestran otro fenotipo. Preferentemente, el vector puede comprender un gen lacZ como marcador de selección.

En una realización de la presente invención, se construye un vector para contener un promotor de ddh modificado mejorado en actividad que puede ser sustituido por el promotor de ddh endógeno de *Corynebacterium glutamicum* mediante recombinación homóloga. Para este fin, primero, el vector pACYC177 para la clonación de *E. coli* se digiere con enzimas de restricción y tiene extremos romos con el fragmento

Klenow. Por separado, una secuencia de nucleótidos que comprende un gen lacZ y su promotor se amplifica a partir del ADN genómico de *E. coli* K12W3110 a través de PCR. Estos dos fragmentos de ADN obtenidos de este modo se ligan a cada uno para dar una molécula circular de ácido nucleico, seguido de la inserción de una secuencia adaptadora que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción en la molécula circular de ácido nucleico para proporcionar el vector pDZ para su inserción en el cromosoma de *Corynebacterium* (Figura 1). Posteriormente, se inserta un promotor del gen ddh modificado en bases particulares para mostrar una alta actividad en la secuencia adaptadora del vector pDZ para dar el vector pDZ-ddhP1 que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 (Figura 2).

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped que se transforma con el vector de la invención, en el que el promotor de ddh modificado contenido en la molécula de ácido nucleico de la invención se sustituye por el promotor de ddh endógeno mediante recombinación homóloga, de modo que pueda potenciar el nivel de ARNm de un gen ddh.

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

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

Siempre que se use para introducir el vector de la presente invención en una célula huésped, se puede emplear cualquier técnica en la presente invención. Dependiendo de una célula huésped, se puede seleccionar una técnica estándar adecuada, por ejemplo, entre electroporación, precipitación con fosfato de calcio (CaPO<sub>4</sub>), precipitación con cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), microinyección, una técnica de polietilenglicol (PEG), una técnica DEAE-dextrano, una técnica de liposomas catiónicos y una técnica de acetato de litio-DMSO.

Es útil usar una célula huésped que sea altamente eficiente en la absorción y expresión de materiales de ADN extraños, y puede ser aplicable a todos los microorganismos, incluidos los procariontes y eucariontes. Preferentemente, se puede usar *E. coli* o bacteria corineforme, y más preferente es *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881.

En las células transformadas con el vector de la presente invención, el promotor modificado que tiene una actividad mejorada se sustituye por el promotor endógeno mediante recombinación homóloga, potenciando el nivel de ARNm del gen ddh. Como resultado, el transformante tiene una mayor actividad de diaminopimelato deshidrogenasa que el tipo salvaje.

En una realización de la presente invención, el vector pDZ-ddhP1, en el que se albergó el promotor que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 de acuerdo con la presente invención, se transformó en *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 para dar un transformante (KFCC10881-ddhP1), denominado CA01-0136, que muestra una actividad mejorada de diaminopimelato deshidrogenasa, que luego se depositó en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (en lo sucesivo denominado como "KCCM") con el Número de Acceso KCCM10920P el día 18 de enero de 2008.

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

En comparación con el tipo salvaje, el transformante según la presente invención se mejora en la actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa. Debido a que la diaminopimelato deshidrogenasa es la enzima más esencial en la ruta de biosíntesis de la lisina, la fermentación del transformante conduce a la producción de lisina con mayor rendimiento.

En la presente invención, la fermentación del transformante se puede realizar usando un procedimiento bien conocido, y las condiciones para la fermentación, que incluyen temperatura, tiempo, pH, etc., pueden controlarse adecuadamente. Se proporciona una descripción detallada de la fermentación en el siguiente documento [Chmiel; Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), and Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)]. La fermentación se puede lograr mediante cultivo discontinuo, cultivo continuo o cultivo alimentado por lotes. Preferentemente, se usa un procedimiento alimentado por lote o alimentado por lotes repetido de manera continua para la fermentación, pero la presente invención no se limita a ello.

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

Además, los medios de cultivo pueden contener sales metálicas esenciales para el crecimiento de las células (por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato ferroso) y pueden complementarse con nutrientes esenciales para estimular el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas. Además, se pueden agregar precursores adecuados a los medios de cultivo. Los nutrientes o suplementos se pueden agregar por completo una vez o en separación durante la fermentación.

El pH de los medios de cultivo se puede ajustar con un compuesto alcalino (por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco) o un compuesto ácido (por ejemplo, ácido fosfórico o ácido sulfúrico). La generación de espumas en medios de cultivo puede restringirse usando un agente antiespumante tal como el éster poliglicólico de ácido graso. Los medios de cultivo se pueden mantener en condiciones aeróbicas mediante la introducción de oxígeno o una mezcla de gases que contienen oxígeno en el mismo. En cuanto a la temperatura de cultivo, usualmente está entre 20 y 45 °C y preferentemente entre 25 y 40 °C. La fermentación continúa hasta que se produce una cantidad máxima de L-aminoácido. En este sentido, se puede lograr dentro de 10 a 160 horas. Después de su producción, la L-lisina puede exportarse a los medios de cultivo o puede permanecer dentro de las células.

Como alternativa, el procedimiento para la producción de lisina de acuerdo con la presente invención puede comprender además recoger la lisina producida. La L-lisina se puede aislar de medios de cultivo o células usando un procedimiento bien conocido. Los ejemplos del procedimiento de recolección útil en la presente invención incluyen filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización y HPLC, pero no se limitan a los mismos.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona un procedimiento de producción de lisina, dicho procedimiento comprende la fermentación de la célula huésped de la presente invención y opcionalmente comprende además la recolección de la lisina producida. Con una actividad promotora mayor que la del tipo salvaje, como se describió hasta ahora, la molécula de ácido nucleico que contiene el promotor de origen de *Corynebacterium glutamicum* de acuerdo con la presente invención puede emplearse para mejorar la actividad de diaminopimelato deshidrogenasa, aumentando de este modo la eficiencia de biosíntesis de lisina. Por consiguiente, la célula huésped de la presente invención puede producir L-lisina, un aminoácido industrialmente importante, con alto rendimiento.

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

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

La *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881, mutada artificialmente a partir de una cepa de tipo salvaje de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032), útil en la presente invención fue resistente a la S-(2-aminoetil) cisteína (en lo sucesivo denominada "AEC") y la fuga de homoserina (Patentes Coreanas N.º 0159812 y 0397322).

#### **EJEMPLO 1: Construcción de un vector recombinante que contiene un promotor mejorado**

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

En este ejemplo, pDZ, un vector que se integrará en el genoma de *Corynebacterium*, se construyó con base en pACYC177 (New England Biolab, número de acceso de GenBank # X06402), un vector para su uso en *E. coli*.

5 Después de ser tratado con AclI y BanI, el vector pACYC177 tenía extremos romos y terminó con un fragmento Klenow. Para el uso como marcador de selección, se preparó un gen lacZ que se origina de *E. coli* amplificando un ADN genómico de *E. coli* K12 W3110 que comprende el gen y su promotor a través de PCR, seguido del tratamiento del producto de PCR con polimerasa y polinucleótido de ADN T4 quinasa para fosforilar en el extremo 5' y hacer que los extremos opuestos sean romos, respectivamente. Los dos fragmentos de ADN  
10 obtenidos de este modo se ligaron entre sí para dar una molécula circular de ácido nucleico en la que se insertó una secuencia adaptadora sintetizada artificialmente que contenía una pluralidad de sitios de enzimas de restricción para proporcionar el vector pDZ para su inserción en el cromosoma de *Corynebacterium*. En la Figura 1, se ilustra esquemáticamente el vector pDZ para la integración en el cromosoma de *Corynebacterium*.

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

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

20 Con base en los datos del NIH GenBank, en primer lugar, se obtuvo una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) que comprende una región promotora para el gen ddh (ID del NCBI No. NCgl2528). A partir de esta secuencia de nucleótidos se preparó un fragmento de ADN que fue mutado en posiciones de bases particulares. Cada secuencia promotora modificada se diseñó con base en una típica secuencia promotora de consenso encontrada en microorganismos.

25 Para su uso en la preparación de las secuencias promotoras modificadas, se sintetizaron cuatro cebadores (SEQ ID NO: 3 ~ 6, Tabla 1) con base en las secuencias de bases.

**TABLA 1**

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

45 Se preparó una secuencia promotora para el gen ddh de *Corynebacterium glutamicum* mediante PCR usando conjuntos de los cebadores de la Tabla 1 en presencia de *PfuUltra*<sup>TM</sup> ADN Polimerasa de Alta Fidelidad (Stratagene) con el ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 que sirve como plantilla. La PCR se realizó con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, recocido a 53 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Como resultado, el producto de PCR tenía un fragmento de  
50 ADN de 300 pb de largo con la porción de sustitución ubicada en una región terminal. El ddhP1-1 se amplificó con un conjunto de cebadores de la SEQ ID NO: 3 y 6, y el ddhP1-2 con un conjunto de cebadores de la SEQ ID NO: 5 y 4. El producto de PCR se digirió con XbaI y se clonó en pDZ usando un kit de clonación en fusión (TAKARA) para proporcionar el vector recombinante pDZ-ddhP1.

55 La Figura 2 es un mapa del vector pDZ-ddhP1 que contiene la secuencia promotora de la SEQ ID NO: 2 que está integrada en el genoma de *Corynebacterium*.

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

60 En este ejemplo, el vector recombinante preparado anteriormente se introdujo en la cepa productora de lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10881, de modo que la secuencia promotora de ddh modificada en el vector se integró en el genoma de la célula mediante recombinación homóloga con el promotor de ddh endógeno en el genoma.

65 Con este fin, el vector recombinante pDZ-ddhP1 que contiene el fragmento de ADN correspondiente a la

secuencia promotora modificada se transformó en *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 usando un procedimiento de electroporación (basado en Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52: 541-545), seguido de seleccionar en un medio de selección que contiene kanamicina en una cantidad de 25 mg/l los transformantes en los que el promotor modificado se integró en el genoma mediante recombinación homóloga con el promotor endógeno.

El éxito en la inserción del vector en el genoma se identificó por la aparición de un color azul en la placa que contenía X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido). Los cruces individuales con el vector incorporado en el genoma del mismo se cultivaron en un caldo de nutrientes con agitación (30 °C, 8 horas) después de lo cual el cultivo se diluyó a una concentración de  $10^{-4}$  a  $10^{-10}$  antes de extenderse placas que contienen X-gal. Mientras que la mayoría de las colonias cultivadas en las placas parecían azules, solo una baja proporción de las colonias permanecían blancas. Las colonias blancas se seleccionaron como colonias de doble cruce que anclaban el promotor de ddh que estaba mutado en posiciones de bases particulares. Para confirmación, las cepas seleccionadas se examinaron para la sustitución de bases por PCR y se secuenciaron las bases. La cepa transformada con pDZ-ddhP1 se examinó para la sustitución de bases en el promotor, usando un conjunto de cebadores de la SEQ ID NO: 4 y 7, por PCR y secuenciación de bases.

La cepa productora de lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-ddhP1 en la que el promotor de ddh mutado en posiciones de base particulares se integró en el genoma del mismo finalmente se confirmó mediante doble cruce.

### **EJEMPLO 3: Ensayo de la cepa de ddh mejorada por promotor para la actividad de diaminopimelato deshidrogenasa**

La cepa madre *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 y la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-ddhP1 finalmente preparadas en el Ejemplo 2 se cultivaron, y las proteínas se aislaron de los cultivos y se analizaron para determinar la actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa, como se indica a continuación.

Cada uno de los cultivos que crecieron hasta la fase de logaritmo se inoculó en 50 ml del siguiente medio de siembra (I) para dar una OD<sub>600</sub> de 0,3, y luego se incubó hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó aproximadamente 15. Después de recogerse a través de centrifugación (5000 rpm, 15 min), la masa celular se lavó dos veces con Tris HCl 20 mM (pH 8,0) y se suspendió en el mismo tampón a una absorbancia óptica a 610 nm de turbidez 160. Las células se alteraron durante 6 min en un mezclador de vidrio con perlas de vidrio añadidas a 1,25 g/1,5 ml de la suspensión. Después de la centrifugación (15000 rpm, 20 min), se midió cuantitativamente el contenido de proteína en el sobrenadante mediante un procedimiento de Bradford (Bradford, MM 1976. Anal. Biochem. 72: 248-254) y se usó como una solución de proteína cruda para medir la actividad de diaminopimelato deshidrogenasa.

Para cuantificar la actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa, se mezclaron aproximadamente 0,01 ml de la solución de proteína cruda con una solución de reacción que contenía glicina/NaOH 0,2 M (pH 10,5), NADP 2 mM y meso-diaminopimelato 4 mM para dar un volumen total de 1 ml y se dejó reaccionar a 25 °C durante 10 minutos durante los cuales se monitorizaron las absorbancias a 340 nm. La actividad de la diaminopimelato deshidrogenasa se definió como  $\mu$ moles de NADPH reducidos por minuto en 1 mg de proteína y expresados en la unidad (U).

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

**TABLA 2**

Cepa	Diaminopimelato Deshidrogenasa (U)	Múltiplos
KFCC10881	25,2	1
KFCC10881-ddhP1	584,5	23,2

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

Glucosa 20 g, polipeptona 10 g, extracto de levadura 5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, urea 1,5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g, biotina 150  $\mu$ g, HCl de tiamina 1500  $\mu$ g, pantotenato de calcio 3000  $\mu$ g, amida de nicotina 3000  $\mu$ g (por litro de agua destilada)

### **EJEMPLO 4: Producción de lisina en la cepa de ddh mejorada por promotor**

La cepa madre *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 y la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-ddhP1 preparada en el Ejemplo 2 se fermentaron para producir L-lisina, como se indica

a continuación.

Se inocularon *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10881 y KFCC10881-ddhP1 en matraces deflectores de esquina de 250 ml, cada uno con 25 ml del siguiente medio de siembra (I), y se cultivaron a 30 °C durante 20 horas con agitación a 200 rpm. A 24 ml del siguiente medio de producción en un matraz deflector de esquina de 250 ml se añadió 1 ml del cultivo de siembra, seguido de incubación a 30 °C durante 120 horas con agitación (200 rpm).

Después de completar el cultivo, se realizó un análisis por HPLC para determinar las cantidades de L-lisina producidas por las cepas. Las concentraciones de L-lisina en los cultivos de *Corynebacterium glutamicum* KFCC-10881 y KFCC-10881-ddhP1 se resumen en la Tabla 3, a continuación.

**TABLA 3**

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

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

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

\* Medio de producción (pH 7,0)

Glucosa 100 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 g, proteína de soja 2,5 g, sólidos de maíz 5 g, urea 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0,5 g, biotina 100 µg, cloruro de tiamina 1000 µg, pantotenato de calcio 2000 µg, amida de nicotina 3000 µg, CaCO<sub>3</sub> 30 g (por litro de agua destilada)

Como se puede apreciar en la Tabla 3, se encontró que *Corynebacterium glutamicum* KFCC-ddhP1 con una actividad de diaminopimelato deshidrogenasa mejorada 23 veces aumenta la productividad de lisina en aproximadamente un 3%, en comparación con la cepa madre KFCC10881.

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> Promotor mejorado y procedimiento de producción de L-lisina mediante el uso del mismo

<130> Y1518 EP/2 S3

<150> KR10-2008-0010073

<151> 2008-01-31

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 603

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> gen

<222> (1)..(603)

<223> promotor de ddh y alguna porción del gen ddh

<400> 1

ES 2 743 422 T3

	gccgtgctg gcgagtttta caaagaaccc cacatcatca atgcctaaat ggcgggtatt	60
	ttcatccaaa cccaaccgcg catcattcca atgctgatcc accccatccg gataaaccac	120
5	catgaacggc aacggatcaa aagtccctgtt ggtgaagctg cgccccacag atcctgactg	180
	ctgggagcca tgaaaataga tcagcgcatac cgtggtggaa ccaaaaggct caacaatacg	240
10	aaacgttcgc tttcggtcct gatgaaagag atgtccctga atcatcatct aagtatgcat	300
	ctcggtaagc tcgaccagga cagtgccacc acaatthttgg aggattacaa gaacatgacc	360
	aacatccgcg tagctatcgt gggctacgga aacctgggac gcagcgtcga aaagcttatt	420
15	gccaaagcagc ccgacatgga ccttgttaga atcttctcgc gccggggccac cctcgacaca	480
	aagacgccag tctttgatgt cgccgacgtg gacaagcacg ccgacgacgt ggacgtgctg	540
20	ttcctgtgca tgggctccgc caccgacatc cctgagcagg caccaaagtt cgcgagttc	600
	gcc	603
25	<210> 2 <211> 603 <212> ADN <213> Corynebacterium glutamicum	
30	<220> <221> gen <222> (1)..(603) <223> promotor de ddhP1 y alguna porción del gen ddh	
35	<400> 2	
	gccgtgctg gcgagtttta caaagaaccc cacatcatca atgcctaaat ggcgggtatt	60
40	ttcatccaaa cccaaccgcg catcattcca atgctgatcc accccatccg gataaaccac	120
	catgaacggc aacggatcaa aagtccctgtt ggtgaagctg cgccccacag atcctgactg	180
45	ctgggagcca tgaaaataga tcagcgcatac cgtggtggaa ccaaaaggct caacaatacg	240
	aaacgttcgc tttcggtcct gatgaaagag atgtccctga atcatcatct aagtatgcat	300
	tgtggttaagc tcgaccagga cagtgccacc acaatthttgg aggattacaa gaacatgacc	360
50	aacatccgcg tagctatcgt gggctacgga aacctgggac gcagcgtcga aaagcttatt	420
	gccaaagcagc ccgacatgga ccttgttaga atcttctcgc gccggggccac cctcgacaca	480
55	aagacgccag tctttgatgt cgccgacgtg gacaagcacg ccgacgacgt ggacgtgctg	540
	ttcctgtgca tgggctccgc caccgacatc cctgagcagg caccaaagtt cgcgagttc	600
	gcc	603
60	<210> 3 <211> 38 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65		

ES 2 743 422 T3

<220>  
<223> cebador ddh/PF

5 <400> 3  
ccgggatcc tctagagtc gtggcgagtt ttacaaag 38

<210> 4  
<211> 37  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador ddh/PR

15 <400> 4  
gcaggctgac tctagaggcg aactgcgcga actttgg 37

<210> 5  
<211> 20  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> cebador ddh/P1F

25 <400> 5  
tatgcattgt ggtaagctcg 20

<210> 6  
30 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
35 <223> cebador ddh/P1R

<400> 6  
cgagcttacc acaatgcata 20

40 <210> 7  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> cebador ddh/P1mut

<400> 7  
50 ctaagtatgc attgt 15

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ácido nucleico que contiene un promotor modificado del gen *ddh* con ID de gen del NCBI NCgl2528, teniendo dicho ácido nucleico una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.
2. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
3. Una célula huésped que se transforma con el vector de la reivindicación 2, en la que el promotor de *ddh* modificado contenido en la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 se sustituye por el promotor de *ddh* endógeno a través de recombinación homóloga, con el fin de potenciar el nivel de ARNm de un gen *ddh*, en la que la célula huésped es una bacteria corineforme.
4. La célula huésped de la reivindicación 3, que pertenece al género *Corynebacterium* o al género *Brevibacterium*.
5. La célula huésped de la reivindicación 3 o 4, en la que dicha célula huésped es el transformante CA01-0136 tal como depositado con el Número de Acceso KCCM10920P.
6. Un procedimiento de producción de lisina que comprende fermentar la célula huésped de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. El procedimiento para la producción de lisina de la reivindicación 6, que además comprende recoger la lisina producida.

25

Figura 1

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

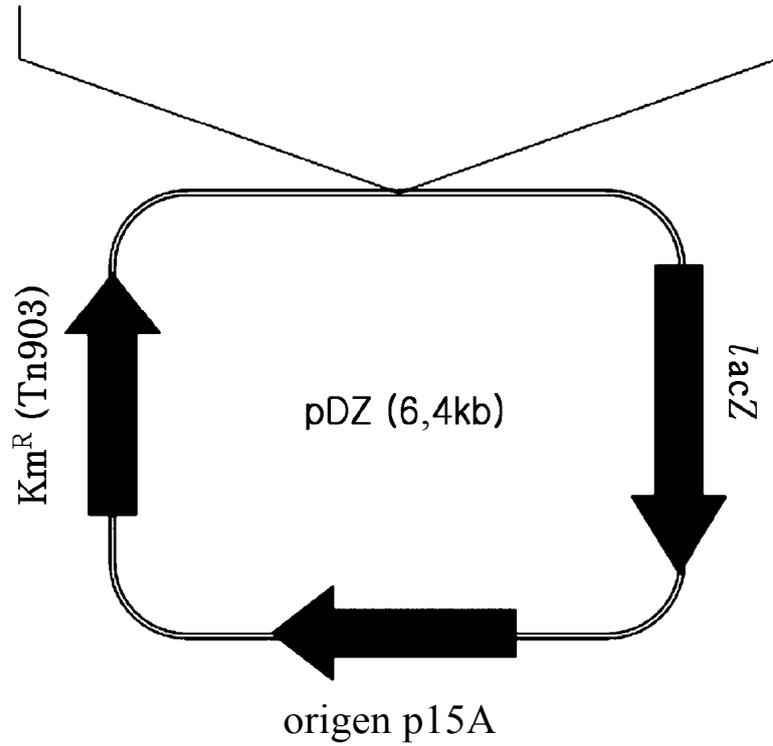


Figura 2

