

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 561**

51 Int. Cl.:

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2016 PCT/KR2016/002480**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16171392**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2016 E 16783326 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3287469**

54 Título: **Variante del represor de gluconato, microorganismo que produce L-lisina que comprende esta variante y un procedimiento para producir L-lisina mediante su uso**

30 Prioridad:

20.04.2015 KR 20150055495

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330, Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 04560 , KR**

72 Inventor/es:

**PARK, SANG HEE;
KIM, HYUNG JOON;
KIM, NAM HYUN;
MOON, JUN OK;
OH, JEONG SEOK;
RYU, SONG-GI y
CHOI, HYANG**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 745 561 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

Variante del represor de gluconato, microorganismo que produce L-lisina que comprende esta variante y un procedimiento para producir L-lisina mediante su uso

[Campo técnico]

- 5 La presente divulgación se refiere a una novedosa variante del represor del gluconato, a un microorganismo que contiene esta variante y a un procedimiento para producir L-lisina mediante su uso.

[Técnica anterior]

- 10 Para la producción en masa de productos útiles como por ej., aminoácidos, es muy importante la regulación de la absorción de glucosa y la trayectoria de fosforilación de pentosa en la cepa *Corynebacterium* (Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. 2005. 215-240).

El represor del gluconato (GntR) es una proteína reguladora importante que regula el flujo de carbono a través de la absorción de glucosa y de las trayectorias de fosforilación de pentosa. Se sabe que se hallaron dos represores del gluconato (GntR1 y GntR2) en la cepa del *Corynebacterium glutamicum*.

- 15 El GntR1 y el GntR2 inhiben, con fuerza, la expresión de los genes que codifican la gluconato permeasa (gntP), la gluconato quinasa (gntK) y la 6-fosfogluconato dehidrogenasa (gnd), las cuales se refieren al metabolismo del gluconato, y cumplen la función de inhibir débilmente la expresión del operón tkt-tal-zwf-opcA-devB, el cual es un gen principal de la trayectoria de fosforilación de pentosa. Mientras tanto, la expresión de los genes que codifican la enzima II del transportador específico de glucosa (ptsG) y la enzima II del transportador específico de sacarosa (ptsS) del sistema de fosfotransferasa (PTS), la cual es una trayectoria principal metabólica de infusión de azúcar de la cepa *Corynebacterium*, es promovida para que se involucre, significativamente, en la infusión de azúcar (Julia Frunzke, Verena Engels, Sonja Hasenbein, Cornelia Gatgens and Michael Bott, *Molecular Microbiology* (2008) 67(2), 305-322).
- 20

[Divulgación]

[Problema técnico]

- 25 Los presentes autores han tratado de hallar un gen que tenga un efecto eficaz sobre la productividad de L-lisina y desarrollaron una novedosa variante del represor del gluconato 1 (GntR1), y se confirmó que el microorganismo que lo contiene produce L-lisina, en comparación con el microorganismo que comprende el represor del gluconato 1 natural, el índice de consumo de azúcar mejorado y la productividad de L-lisina, y de este modo, los autores terminaron la divulgación.

[Solución técnica]

- 30 La presente invención es como se define en las reivindicaciones. La presente invención y otros aspectos de la presente divulgación se pueden entender completamente por referencia a la siguiente descripción.

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar una variante novedosa de la proteína represora del gluconato.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un polinucleótido que codifica la variante y un vector de expresión que comprende el polinucleótido.

- 35 Otro objeto adicional de la presente divulgación es proporcionar un microorganismo que produce L-lisina, el cual expresa una variante de la proteína represora del gluconato.

Otro objeto adicional de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento para producir L-lisina que comprende: (a) cultivar el microorganismo que produce L-lisina en un medio; y (b) recuperar la L-lisina del microorganismo cultivado o el medio en la etapa (a).

- 40 [Efectos ventajosos]

El microorganismo que contiene una variante del represor del gluconato que produce L-lisina, de acuerdo con la presente divulgación, exhibe un índice de consumo de azúcar mejorado en comparación con el microorganismo que no contiene la variante y puede provocar una producción eficaz de L-lisina. En particular, la L-lisina es un aminoácido

esencial del pienso y es necesario que sea producida en masa a nivel industrial, y cuando la L-lisina es producida con alta eficiencia, de acuerdo con la presente divulgación, también puede reducir el costo de la producción de pienso.

[Mejor modo]

En la presente memoria se divulga una variante novedosa de la proteína represora del gluconato.

5 Como se utiliza en la presente memoria, el término «proteína represora del gluconato» se refiere a una proteína reguladora que está involucrada en el metabolismo del gluconato o en la absorción de azúcar. La proteína represora del gluconato no está limitada en particular, pero puede ser un microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium*, específicamente, una proteína represora del gluconato que deriva de la *Corynebacteriumglutamicum*. Más específicamente, la proteína represora del gluconato puede ser la proteína GntR1 que deriva de la
10 *Corynebacteriumglutamicum*, pero no está limitada a esta. La proteína represora del gluconato puede ser, pero no está limitada, la GntR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 4. Por ejemplo, la proteína represora del gluconato puede ser una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 4 y que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente al menos 95 %, e incluso más específicamente al menos 99 %. Además, la proteína represora del gluconato que comprende la
15 secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 4 puede ser codificada por el gen gntR1 que comprende la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO.: 3, pero no está limitada a esto. Por ejemplo, puede ser una secuencia nucleotídica de la SEC ID NO.: 3 o puede ser una secuencia nucleotídica que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente al menos 95 %, e incluso más específicamente al menos 99 %.

20 Como se utiliza en la presente memoria, el término «homología» se refiere al porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o restos polipeptídicos. La homología entre las secuencias de un resto a otro resto puede ser determinada mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, la homología se puede determinar mediante la alineación de la información de la secuencia, y mediante la alineación directa de la información de la secuencia entre dos moléculas polinucleotídicas o dos moléculas polipeptídicas mediante el uso de un programa de computadora que ya está disponible. El programa de computadora puede ser BLAST (NCBI) Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR
25 Inc.), etc. Además, la homología entre los polinucleótidos se puede determinar mediante la hibridación de los polinucleótidos en condiciones que formen una hebra doble estable entre las regiones homólogas, posteriormente, mediante la resolución de las nucleasas específicas monocatenarias para determinar el tamaño del fragmento resuelto.

La variante de la proteína represora del gluconato puede ser un polipéptido en el cual la arginina (R), la cual es el 102° aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 4, está sustituida con un aminoácido que no es arginina.
30 Específicamente, la variante de la proteína represora del gluconato puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 1, en la que el aminoácido en la posición 102 está sustituido con cisteína (C).

Esta variante de la proteína represora del gluconato incluye no solo un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 1, sino además una variante que tiene una homología del 80 % o más, específicamente, 90 % o más, más específicamente 95 % o más, incluso más específicamente 99 % o más, y sustancialmente, es obvio que una secuencia de aminoácidos que tiene actividad biológica idéntica o que corresponde a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 1, incluso en casos donde algunas de las secuencias tienen supresión, modificación, sustitución o adición de secuencias de aminoácidos, esté incluida en el alcance de la presente divulgación.
35

40 Además, se divulga en la presente memoria un polinucleótido que codifica una variante de la proteína represora del gluconato y un vector de expresión que comprende el polinucleótido.

La proteína represora del gluconato y su variante son como se describieron anteriormente.

Específicamente, un polinucleótido que codifica una variante de la proteína represora del gluconato puede ser un polipéptido que codifica una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 1, o puede ser un polinucleótido que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente al menos 95 %, e incluso más específicamente al menos 99 %. El polinucleótido que codifica una variante de la proteína represora del gluconato puede tener, por ejemplo, la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO.: 2, pero no está limitada a esto.
45

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término «polinucleótido» se refiere a un polímero de nucleótidos en el cual la unidad nucleotídica está enlazada en una cadena larga mediante enlaces covalentes. En general, se refiere a las hebras de ADN o ARN más largas que una cierta longitud. El polinucleótido puede tener una variedad de secuencias nucleotídicas que codifican la misma secuencia de aminoácidos debido a la degeneración de código genético del código genético. Además, las secuencias optimizadas de codones se pueden emplear para optimizar la expresión que depende del tipo de células hospedadoras.

Como se utiliza en la presente memoria, el término «vector» se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico para la clonación y/o la transferencia de un polinucleótido a una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón que puede provocar la replicación de un fragmento unido de otro fragmento de ADN. Una «unidad de replicación» se refiere a cualquier unidad genética (por ej., plásmido, fago, cósmido, cromosoma y virus). En la presente divulgación, el vector no está limitado, en particular, en la medida que sea replicable en un hospedante, y se puede utilizar cualquier vector conocido en la técnica. El vector que se utiliza para construir el vector recombinante puede ser un plásmido, un cósmido, un virus y un bacteriófago en un estado natural o recombinante. Por ejemplo, se puede utilizar pWE15, M13, λEMBL3, λEMBL4, λFIXII, λDASHII, λZAPII, λgt10, λgt11, Charon4A, Charon21A, etc., como el vector fago o el vector cósmido, y como el vector plásmido se puede utilizar el vector pDZ, el sistema pBR, el sistema pUC, el sistema pBluescriptII, el sistema pGEM, el sistema pTZ, el sistema pCL, el sistema pET, etc. Los vectores disponibles no están limitados, en particular, y se pueden utilizar vectores de expresión conocidos. Específicamente, se puede utilizar el pDZ (Patente Coreana registrada No. 10-0924065), pero no está limitado a este.

Como se utiliza en la presente memoria, el término «transformación» se lleva a cabo mediante la introducción de un polinucleótido que codifica una variante de la proteína represora del gluconato dentro de una célula hospedadora, de modo que el polinucleótido se puede expresar en la célula hospedadora, y el polinucleótido que se transforma, en la medida que pueda expresarse en la célula hospedadora, incluye, sin limitación, aquellos que se insertan en un cromosoma o se localizan fuera del cromosoma.

El polinucleótido puede ser introducido en una célula hospedadora en la forma de un casete de expresión, el cual es una construcción que contiene todos los elementos esenciales necesarios para la autoexpresión. El casete de expresión puede incluir, en general, un promotor que se enlaza, de forma operativa, al gen, una señal de terminación de transcripción, un sitio de enlace al ribosoma y una señal de terminación de traducción. El casete de expresión puede estar en la forma de un vector de expresión capaz de autorreplicación. Además, el polinucleótido se puede introducir en la célula hospedadora como se encuentra o en la forma de un casete de expresión, y se enlaza, de forma operativa, a la secuencia esencial para su expresión en la célula hospedadora, pero no está limitado a esto.

También se divulga en la presente memoria un microorganismo que produce L-lisina, el cual expresa una variante de la proteína represora del gluconato.

La proteína represora del gluconato y su variante son como se han descrito anteriormente.

Como se utiliza en la presente memoria, el término «L-lisina» es un aminoácido esencial que no se sintetiza en el cuerpo como un α-aminoácido básico, y se refiere a una clase de L-aminoácido que tiene la fórmula química $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$. La L-lisina es biosintetizada a partir del ácido oxaloacético a través de la trayectoria biosintética de lisina, y la reductasa dependiente de NADPH cataliza el proceso intermedio para la biosíntesis de lisina. En el curso de la biosíntesis de L-lisina de una molécula, tres moléculas de NADPH se consumen directamente mediante las enzimas de azúcar, y una molécula de NADPH se utiliza indirectamente.

El microorganismo puede incluir las variantes de la proteína represora del gluconato por mutación o se puede transformar con un vector que comprende un polinucleótido que codifica una variante de la proteína represora del gluconato.

El microorganismo incluye una proteína que tiene actividad mutante de la proteína represora del gluconato o un microorganismo procarionta y un microorganismo eucariota si el microorganismo se transforma de modo que se expresa la proteína glucosiltransferasa. Por ejemplo, se pueden incluir las cepas del microorganismo como ejemplo del género *Escherichia*, del género *Erwinia*, del género *Serratia*, del género *Providencia*, del género *Enterobacteria*, del género *Salmonella*, del género *Streptomyces*, del género *Pseudomonas*, del género *Brevibacterium* o del género *Corynebacterium*, etc. Específicamente, pueden ser microorganismos que pertenecen al género *Corynebacterium*, y más específicamente, *Corynebacterium glutamicum*, pero no están limitados a esto.

Cuando la proteína mutante de la proteína represora del gluconato de la presente divulgación está contenida en el microorganismo que produce L-lisina, la capacidad de producción de L-lisina se puede incrementar mediante el consumo, de manera eficaz, del sacárido en comparación con el microorganismo que contiene la proteína represora del gluconato natural.

El microorganismo que produce L-lisina puede incluir cualquier tipo de microorganismo si tiene capacidad de producción de L-lisina, e incluye todas las formas de cepas naturales y cepas recombinantes.

El microorganismo del género *Corynebacterium* que puede tener capacidad de producción de L-lisina puede ser una cepa mutante resistente al análogo de L-lisina. Los análogos de L-lisina inhiben el crecimiento de los microorganismos Coryne, pero esta inhibición se elimina de manera completa o parcial cuando la L-lisina coexiste en el medio. Ejemplos de los análogos de L-lisina incluyen oxa L-lisina, L-lisina hidroxamato, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ-metil L-lisina,

5 α -clorocaprolactama, etc., pero no están limitados a esto. La variante que tiene resistencia a estos análogos de L-lisina se puede obtener mediante el tratamiento del microorganismo del género *Corynebacterium* con un tratamiento de mutagénesis convencional artificial, pero no está limitado a esto. Ejemplos no limitantes de esto incluyen *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, (Patente Coreana registrada No. 10-0159812), *Corynebacterium glutamicum* KFCC 11001 y *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (Patente Coreana registrada No. 10-0073610), pero no está limitado a esto.

10 Además, el microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene la capacidad de producir L-lisina puede ser modificado de modo que la actividad de la proteína relacionada con la biosíntesis de L-lisina es mejorada en comparación con las cepas no modificadas. Es decir, la expresión de uno o más tipos de genes relacionados con la biosíntesis de L-lisina es mejorada. Esta mejora de la expresión puede incluir, pero sin estar limitada, la amplificación génica, el reemplazo o la alteración de secuencias como por ej., promotores o codones de iniciación, la introducción de modificaciones para mejorar la expresión, etc. Ejemplos no limitantes de esto incluyen *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder et al. Genome Biology 2012, 13:R40), pero sin estar limitado a esto.

15 Además, ejemplos del gen relacionado con la biosíntesis de L-lisina incluyen los genes ubicados sobre la trayectoria biosintética de L-lisina, y específicamente, el gen sintasa del ácido dihidrodipicolínico (dapA), el gen aspartoquinasa (lysC), el gen reductasa del ácido dihidrodipicolínico (dapB), el gen diaminopimelato decarboxilasa (lysA), el gen diaminopimelato dehidrogenasa (ddH), el gen fosfoenolpiruvato carboxilasa (ppc), el gen aspartato semialdehído dehidrogenasa (asd), el gen aspartasa (aspA) y piruvato carboxilasa (pyc), pero sin estar limitados a esto. Además, se puede hacer referencia a la transquetolasa (tkt) presente en la trayectoria de pentosa fosfato, etc., pero el gen no está limitado a esto.

Mientras tanto, el microorganismo del género *Corynebacterium* puede tener la capacidad de producir L-lisina al incluir las modificaciones conocidas en la técnica asociadas con la producción de L-lisina, pero no está limitado a esto.

25 Además se divulga en la presente memoria un procedimiento para producir L-lisina que comprende: (a) cultivar un microorganismo que produce L-lisina en un medio; y (b) recuperar L-lisina del microorganismo cultivado o el medio de cultivo en la etapa (a).

La L-lisina y el microorganismo que lo produce son como se describieron anteriormente.

30 Como se utiliza en la presente memoria, el término «cultivo» se refiere al cultivo del microorganismo en condiciones ambientales moderadas y artificialmente controladas. El proceso del cultivo de la presente divulgación se puede llevar a cabo de acuerdo con un medio de cultivo adecuado y las condiciones del cultivo conocidas en la técnica. Las condiciones como por ejemplo la temperatura de cultivo específica, el tiempo de incubación y el pH del medio se puede llevar a cabo de acuerdo con el conocimiento general del experto en la técnica, de conformidad con los procedimientos convencionalmente conocidos. Específicamente, estos procedimientos de cultivo conocidos se describen en [Chmiel; Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), y Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)]. Además, el procedimiento de cultivo incluye un cultivo por lote, un cultivo continuo y un cultivo discontinuo. Específicamente, en un proceso por lote o discontinuo o un proceso discontinuo repetido se puede cultivar de manera continua, pero el proceso de cultivo no está limitado a esto.

40 El medio que se utiliza para el cultivo debe reunir los requisitos de las cepas específicas de manera apropiada. Las fuentes de carbono que se pueden utilizar para el medio incluyen sacáridos y carbohidratos como por ej., glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, celulosa, etc.; aceite y grasas como por ej., aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino, aceite de coco, etc.; ácido graso como por ej., ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, etc.; glicerol; alcohol como por ej., etanol, y ácido orgánico como por ej., ácido acético, pero sin estar limitados a esto. Estas sustancias se pueden utilizar de manera individual o como una mezcla y no están limitadas a esto. Las fuentes de nitrógeno que se pueden utilizar incluyen peptona, extracto de levadura, gravy, extracto de malta, licor fuerte de maíz, harina de soja y urea o compuestos inorgánicos, por ejemplo, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, nitrato de amonio, etc., pero no están limitadas a esto, y las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar, además, de manera individual o en forma de una mezcla. Las fuentes de fosfato disponibles incluyen dihidrógeno fosfato de potasio, hidrógeno fosfato de dipotasio, o las correspondientes sales que contienen sodio, etc., pero no están limitadas a esto. Además, el medio de cultivo puede contener sales metálicas como por ej., sulfato de magnesio o sulfato de hierro, pero las sales no están limitadas a esto. Finalmente, además de los materiales anteriores, se pueden utilizar sustancias para el crecimiento esenciales como por ej., aminoácidos y vitaminas. Además, se pueden utilizar precursores apropiados para el medio de cultivo. Las materias primas que se describieron anteriormente se pueden agregar lote por lote o de manera continua a una incubadora en el proceso de incubación, pero no están limitadas a esto.

55 Además, los compuestos químicos como por ej., hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico, se pueden agregar, de manera apropiada, a la incubadora durante el cultivo para ajustar el pH del medio

de cultivo. Durante la incubación, la producción de burbujas puede ser inhibida mediante el uso de agentes antiespumantes como por ej., poliglicol del ácido graso. Además, para mantener la condición aeróbica de la incubadora o la incubación, se puede agregar a la incubadora oxígeno o gas que contiene oxígeno, o para mantener las condiciones anaeróbicas, se puede inyectar nitrógeno, hidrógeno o gas dióxido de carbono, o no se puede inyectar gas.

5 La temperatura de la incubación es típicamente entre 20 °C a 40 °C, específicamente 30 °C hasta 35 °C, pero no está limitada a esto. El periodo de incubación puede continuar hasta que se obtiene la cantidad deseada del material útil, y específicamente puede ser 10 horas hasta 100 horas. La L-lisina puede ser excretada del medio de cultivo o estar incluida en los microorganismos.

Además, los procedimientos para producir L-lisina de la presente divulgación o los procedimientos para recuperar L-lisina del medio de cultivo se conocen ampliamente en la técnica. Para los procedimientos para recuperar L-lisina, se puede utilizar filtración, cromatografía de intercambio iónico negativo, cristalización y HPLC, etc., pero los procedimientos no están limitados a esto.

10

[Mejor modo]

En adelante, la presente invención se describirá en más detalle mediante los siguientes ejemplos.

15 **Ejemplo 1: Preparación de la biblioteca de ADN genómico del *Corynebacterium glutamicum***

En el presente ejemplo, a fin de descubrir la capacidad de producción de L-lisina y los genes y las variantes que descubren los efectos beneficiosos para la productividad, después de inducir las mutaciones artificiales sobre las cepas ATCC13032 del *Corynebacterium glutamicum* por N-metil-N-nitro-nitroguanidina (NTG), se extrajo el ADN genómico mediante los procedimientos de extracción convencionalmente conocidos en la técnica. La enzima de restricción Sau3AI se aplicó al ADN preparado para obtener fragmentos parciales que tienen un tamaño de 1 kb a 3 kb. Después de conectar los fragmentos al vector versátil transformante pECCG122 a *E. coli* y a *Corynebacterium glutamicum* al extremo BamHI de la enzima de restricción, se transformaron a *E. coli* DH5 α y se hizo el extendido al medio sólido LB que incluye kanamicina (25 mg/l). Después de seleccionar las colonias que se transformaron en vectores con los fragmentos a través de PCR (mediante el uso de cebadores de las SEC ID Nos.: 5 y 6), todos estos se mezclaron para extraer los plásmidos mediante un procedimiento de extracción normalmente conocido.

20

25

SEC ID NO.: TCAGGGTGTAGCGGTTCCGGTTTAT

SEC ID NO.: CCGCGCGTAATACGACTCACTATA

Ejemplo 2: Introducción de la biblioteca de la variante artificial y de la mejora de la capacidad de producción de L-lisina

30 Disponiendo de la cepa KCCM11016P como cepa principal (el microorganismo se descubrió como KFCC10881 y se volvió a depositar en una institución depositaria internacional conforme el Tratado de Budapest y se asignó un número de acceso KCCM11016P, registro de Patente Coreana no. 10-0159812), el vector preparado se transformó y se hizo el extendido a un medio de placa compuesta, a continuación.

<Medio de placa compuesta>

35 Glucosa 20 g, (NH₄)₂SO₄ 50 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g, KH₂PO₄ 5 g, K₂HPO₄ 10 g, MgSO₄ 7H₂O 0,5 g, biotina 100 µg, sal cloruro de tiamina 1.000 µg, ácido calcio-pantoténico 2.000 µg, nicotinamida 2.000 µg, agar 20 g, y kanamicina 25 mg (1 litro de agua destilada).

Aproximadamente se sembraron 10.000 colonias a cada uno de los 300 µl de medios de selección y se cultivaron durante aproximadamente 16 horas a 1.000 rpm a 32 °C en una placa de 96 pocillos de profundidad. A fin de analizar la cantidad de producción de L-lisina que se produjo durante el cultivo, se utilizó el procedimiento de ninhidrina (J. Biol. Chem. 1948. 176:367-388). Después de que finalizó el cultivo, 10 µl de sobrenadante de cultivo y 190 µl de solución de reacción de ninhidrina (63 % de glicerol, 27 % de solución de ninhidrina) se hicieron reaccionar a 65 °C durante 30 minutos, se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm, y se comparó con la absorbancia del grupo control (KCCM11016P / pECCG122), se seleccionaron 248 especies de la cepa de la variante que exhibe una absorbancia similar o aumentada. Durante el cultivo en la condición, dado que la cepa del grupo control tenía azúcar residual de 1 g/l a 2 g/l, el índice de consumo de azúcar por grupo control fue rápido, y se pudieron seleccionar las cepas con capacidad de producción de lisina incrementada.

40

45

<Medio de selección (pH 8,0)>

50 Glucosa 10 g, sulfato de amonio 5,5 g, MgSO₄·7H₂O 1,2 g, KH₂PO₄ 0,8 g, K₂HPO₄ 16,4 g, biotina 100 µg, tiamina HCl 1,000 µg, ácido calcio-pantoténico 2.000 µg, y nicotinamida 2.000 µg (1 litro de agua destilada estándar).

Además, sobre la base de las cepas de 248 especies seleccionadas, el procedimiento se realizó de manera repetida. Como resultado de ello, se seleccionan las cepas de la variante de las 29 especies anteriores, que tienen capacidad de producción mejorada de L-lisina en más de 10 % en comparación con las cepas KCCM11016P / pECCG122.

Ejemplo 3: Capacidad de producción de L-lisina de las cepas de la variante artificial seleccionada y análisis del índice de consumo de azúcar

Las cepas con capacidad de producción de L-lisina de las 29 especies seleccionadas del ejemplo 2 e índice de consumo de azúcar se cultivaron de acuerdo con el procedimiento a continuación, y se analizaron.

Cada cepa se sembró dentro de un matraz con deflector de 250 ml y se cultivó con agitación a 30 °C durante 20 horas a 200 rpm. Después, se sembró 1 ml de una solución de cultivo de la especie dentro de un matraz con deflector de 250 ml que contiene 24 ml de un medio de producción. Mediante el uso de HPLC, se analizó la concentración de L-lisina, y a fin de medir el índice de consumo de azúcar de las cepas y su productividad, se midió la concentración del azúcar restante entre la solución de cultivo por tiempo.

<Medio de la especie (pH 7,0)>

Glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g, KH₂PO₄ 4 g, K₂HPO₄ 8 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, biotina 100 µg, tiamina HCl 1.000 µg, ácido calcio-pantoténico 2.000 µg, nicotinamida 2.000 µg (1 litro de agua destilada estándar).

<Medio de producción (pH 7,0)>

Glucosa 100 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, proteína de soja 2,5 g, sólidos ablandados de maíz 5 g, urea 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, biotina 100 µg, sal cloruro de tiamina 1.000 µg, ácido calcio-pantoténico 2.000 µg, nicotinamida 3.000 µg y CaCO₃ 30 g (1 litro de agua destilada estándar).

Entre las cepas de la variante de 29 especies, la concentración de L-lisina en comparación con el grupo control estuvo por encima de un nivel equivalente, y se seleccionaron tres tipos de cepas con un incremento en el índice de consumo de azúcar y productividad para realizar, de manera repetida, el cultivo y el análisis, y los resultados analizados se muestran en la tabla 1.

[Tabla 1]

Cepa número		Azúcar residual (g/l)		L-lisina (g/l)	Promedio
		18 horas	28 horas		
KCCM11016P /pECCG122	1	50,9	38,2	43,1	43,4
	2	51,9	39,8	42,5	
	3	51,2	37,6	44,5	
KCCM11016P/3	1	47,9	34,2	43,3	43,4
	2	48,6	33,8	43,8	
	3	46,9	31,9	43,0	
KCCM11016P/94	1	47	33,7	44,5	44,3
	2	46,7	33,6	44,3	
	3	44,8	32,8	44,1	
KCCM11016P/1160	1	42,2	26,8	44,2	43,9
	2	43,5	25,4	44,1	
	3	42,9	24,3	43,5	

Se confirmó que las tres cepas produjeron L-lisina por encima del nivel equivalente del grupo control, y el índice de consumo por hora por unidad se mejoró al mejorar la productividad de fermentación. Entre las cepas de la variante seleccionadas, finalmente se seleccionó la cepa KCCM11016P/1160 con la productividad más significativamente mejorada, y se extrajeron los plásmidos para buscar las mutaciones de la secuencia nucleotídica en el nivel genético fundamental que originó el índice de consumo de azúcar y el incremento de la productividad. Después, se analizaron las

5 secuencias nucleotídicas mediante el uso de las SEC ID NOs.: 5 y 6. Los plásmidos que derivan de KCCM11016P/1160 contenían desde aproximadamente 450 pb región corriente arriba del codón de inicio ORF del gen NCg12440 hasta alrededor de aproximadamente 350 pb corriente abajo del codón de terminación. Además, a través del análisis de la secuencia nucleotídica del gen basado en el GenBank del National Institutes of Health (NIH), se confirmó que el gen era gntR1, el cual es uno de los represores del gluconato, y la variante gntR1 la cual se introdujo a la cepa KCCM11016P/1160 fue sustituida de C a T en la 304^o secuencia nucleotídica, y se confirmó que el 102^o aminoácido mutó de arginina a cisteína.

Es decir, se confirmó que la arginina, la cual es el 102^o aminoácido del gntR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO.: 4, fue sustituida con cisteína.

10 **Ejemplo 4: Preparación del vector para la introducción de la variante del gntR1 en el cromosoma de la cepa que produce L-lisina**

A fin de confirmar el efecto de aplicación de la variante gntR1, la cual se confirmó en el ejemplo 3, se preparó un vector el cual puede introducir a la misma en el cromosoma.

15 Sobre la base de las secuencias nucleotídicas informadas, se sintetizó un cebador (SEC ID NO: 7, en el cual la región de la enzima de restricción EcoRI se insertó en el extremo de 5' y la región de la enzima de restricción Sall se insertó en el extremo de 3'. Mediante el uso de estos pares de cebadores, se realizó la PCR con un plásmido de KCCM11016P/1160 como molde para amplificar los fragmentos del gen gntR1. La condición de PCR repitió 30 veces un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, desnaturalizando a 94 °C durante 30 segundos, hibridando a 56 °C durante 30 segundos y polimerizando a 72 °C durante 40 segundos, y se realizó una reacción de polimerización a 72 °C durante 7 minutos.

SEC ID NO.: 7: AAGAATTCAGCAGATCGAAGAAGAAGC

SEC ID NO.: 8: AAGTCGACGGGACTAAAAGCTGGCG

25 Después de tratar los fragmentos génicos, los cuales se amplificaron con PCR con las enzimas de restricción EcoRI y Sall, se obtuvo cada fragmento de ADN, y después de conectar los fragmentos al vector pDZ (registro de Patente Coreana número 10-0924065) que tiene los extremos de las enzimas de restricción EcoRI y Sall, se transformó a *E. coli* DH5 α y se transfirió sobre un medio sólido LB que contiene kanamicina (25 mg/l). Después de seleccionar una colonia, la cual se transformó con un vector en el cual el gen específico se insertó a través de PCR, se obtuvo un plásmido mediante el uso de un procedimiento de extracción de plásmido normalmente conocido, y de acuerdo con la variante la cual se insertó en el gntR1 del plásmido, se denominó pDZ-gntR1 (R102C).

30 **Ejemplo 5: Preparación de la cepa en la cual la variante gntR1 es introducida en la KCCM11016P, una cepa de producción de L-lisina, y comparación de productividad**

35 Un novedoso vector de introducción que se preparó en el ejemplo 4 se transformó en la KCCM11016P de la *Corynebacterium glutamicum*, la cual es una cepa de producción de L-lisina, según la recombinación del cromosoma homólogo de dos etapas. Después, la cepa en la cual se introdujo la variante gntR1 en el cromosoma, se seleccionó según el análisis de la secuencia cromosómica, y la cepa en la cual se introdujo la variante gntR1 se denominó KCCM11016P:gntR1 (R102C).

40 Mediante el cultivo con los mismos procedimientos que en el ejemplo 3, la concentración de L-lisina y la concentración de azúcar residual se midieron a partir de estos.. Además, a fin de confirmar los efectos del cultivo de la azúcar en bruto, se utilizaron los medios de producción del azúcar en bruto en lugar de los medios de producción de glucosa para realizar el análisis mediante el uso de los mismos procedimientos [tabla 2].

<Medio de producción de azúcar original (pH 7,0)>

Azúcar en bruto 100 g, (NH₄)₂SO₄ 40 g, proteína de soja 2,5 g, sólidos ablandados de maíz 5 g, enzima 3 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, biotina 100 µg, sal cloruro de tiamina 1.000 µg, ácido calcio-pantoténico 2.000 µg, nicotinamida 3.000 µg, y CaCO₃ 30 g (1 litro de agua destilada).

45

[Tabla 2]

	Cepa número		Azúcar residual (g/l)		L-lisina (g/l)	Promedio
			18 horas	28 horas		
Azúcar	KCCM11016P	1	47,1	32,5	43,8	43,5
		2	46,2	33,8	42,6	
		3	45	32,0	44,1	
	KCCM11016P::GntR1(R102C)	1	34,5	21,4	43,5	43,9
		2	39,5	21,2	44,2	
		3	37	20,6	43,9	
Azúcar en bruto	KCCM11016P	1	42,9	28,6	47,3	47,0
		2	42,0	29,1	46	
		3	41,0	28,4	47,6	
	KCCM11016P::GntR1(R102C)	1	34,1	17,2	47	47,4
		2	35,2	16,3	47,7	
		3	33,7	15,6	47,4	

Como resultado de ello, se confirmó que el índice de consumo de azúcar aumentó sin afectar la capacidad de producción de L-lisina de la KCCM11016P::gntR1(R102C) más que la KCCM11016, el cual es un grupo de comparación en glucosa y los medios de azúcar original. Además, como resultado de la confirmación de los puntos de tiempo cuando toda la glucosa y el azúcar original se consumió, los grupos de comparación se consumieron completamente después de 72 horas y 68 horas, y se produjo L-lisina a 43,5 g/l y 47,0 g/l, respectivamente, y las cepas de introducción de la variante de gntR1 se produjeron a 43,9 g/l y 47,4 g/l después de 60 horas y 58 horas. Es decir, en un caso de cepas en las cuales se introduce la variante gntR1, se confirmó que la capacidad de producción de L-lisina de acuerdo con el tiempo se incrementó en 21 % y 18 % con glucosa y azúcar en bruto, respectivamente [tabla 3].

10 [Tabla 3]

	Cepa número	Capacidad de producción (g/h)	%
Glucosa	KCCM11016P	0,60	100
	KCCM11016P::gntR1(R102C)	0,73	121
Azúcar en bruto	KCCM11016P	0,69	100
	KCCM11016P::gntR1(R102C)	0,82	118

Como puede apreciarse a partir de los resultados anteriores, la introducción de la variante gntR1 tiene la capacidad de producción de L-lisina al mismo nivel y es eficaz en los índices de consumo de glucosa y azúcar en bruto. Es decir, cuando se introdujo la variante gntR1 de la presente divulgación, esto indica la excelencia de efectividad en la capacidad de producción de L-lisina. Como tal, los actuales autores denominaron a la KCCM11016P::gntR1(R102C) como «CA01-2293» de la *Corynebacterium glutamicum*, la cual tiene el índice de consumo de glucosa y productividad mejorada, y al 5 de diciembre de 2014, se dio un número de acceso de KCCM11628P, el cual se deposita en el Centro de Cultivo de Microorganismos de Corea (KCCM), una institución depositaria internacional.

Ejemplo 6: Preparación de cepas en las cuales la variante gntR1 es introducida en la cepa de producción de L-lisina, y comparación de productividad

A fin de determinar los efectos de otras cepas que pertenecen a la *Corynebacterium glutamicum*, una cepa en la cual la variante gntR1 es introducida en la KCCM11347P de la *Corynebacterium glutamicum* (el microorganismo se divulga como KFCC10750 y se vuelve a depositar en una institución depositaria internacional conforme el Tratado de Budapest y se asigna como KCCM11347P. registro de la Patente Coreana número 10-0073610) se preparó y se denominó KCCM11347P::gntR1 (R102C). Mediante el uso del mismo procedimiento que en el ejemplo 5, las cepas preparadas se cultivaron, y se comparó la capacidad de producción de lisina y del azúcar residual [tabla 4].

[Tabla 4]

	Cepa número		Azúcar residual (g/l)		L-lisina (g/l)	Promedio
			18 horas	28 horas		
Glucosa	KCCM11347P	1	43,8	27,6	38,5	38,6
		2	42,6	28,8	38,7	
		3	43,2	27,2	38,6	
	KCCM11347P::gntR1(R1 02C)	1	39,2	18,2	38,6	38,7
		2	37,6	18,0	38,6	
		3	37,0	17,5	38,9	
Azúcar residual	KCCM11347P	1	39,9	24,9	41,2	41,3
		2	39,3	25,3	41,4	
		3	38,8	24,7	41,3	
	KCCM11347P::gntR1(R1 02C)	1	35,7	14,4	41,3	41,4
		2	34,2	13,7	41,3	
		3	33,3	13,1	41,6	

5 Como resultado de ello, al igual que en el ejemplo 5, se confirmó que todos los índices de consumo de glucosa aumentaron en glucosa y azúcar en bruto en comparación con el grupo de comparación. Además, como resultado de determinar los puntos de tiempo en los cuales se consumió toda la glucosa y el azúcar en bruto, el grupo de comparación consumió el azúcar a las 72 horas y 69 horas, y la L-lisina se produjo a 38,6 g/l y 41,3 g/l, y la variante gntR1 produjo L-lisina a 61 horas y 58 horas a 38,7 g/l y 41,4 g/l. Es decir, en un caso de cepas en las que se introduce la variante gntR1, se confirmó que la productividad de L-lisina de acuerdo con el tiempo se incrementó en 18 % y 19 % en glucosa y azúcar en bruto, respectivamente [tabla 5].

[Tabla 5]

	Cepa número	Productividad (g/h)	%
Glucosa	KCCM11347P	0,54	100
	KCCM11347P::gntR1(R102C)	0,63	118
Azúcar en bruto	KCCM11347P	0,60	100
	KCCM11347P::gntR1(R102C)	0,71	119

10 **Ejemplo 7: Preparación de la cepa en la cual la variante gntR1 es introducida en la cepa CJ3P de producción de L-lisina, y comparación de productividad**

15 A fin de confirmar los efectos en otras cepas que pertenecen a la *Corynebacterium glutamicum*, se preparó una cepa en la cual la variante gntR1 es introducida en la CJ3P de la *Corynebacterium glutamicum* (Binder et al. Genome Biology 2012, 13: R40), y se denominó como CJ3P::GntR1 (R102C). La cepa CJ3P es una cepa de la *Corynebacterium glutamicum* que tiene la capacidad de producción de L-lisina en la cual se introdujeron 3 tipos de variantes (pyc(Pro458Ser), hom(Val59Ala), lysC(Thr311Ile)) en las cepas naturales basado en una técnica divulgada. Se preparó una cepa que se prepara mediante el uso del mismo procedimiento que en el ejemplo 5, y se midió la capacidad de producción de lisina y la concentración de azúcar residual en una solución de cultivo por tiempo [tabla 6].

[Tabla 6]

	Cepa número		Azúcar residual (g/l)		L-lisina (g/l)	Promedio
			12시간	18시간		
Glucosa	CJ3P	1	37,2	23,6	8,1	8,2
		2	37,9	23,0	8,2	
		3	37,4	21,1	8,2	
	CJ3P::gntR1(R102C)	1	35,0	17,7	8,4	8,4
		2	35,5	17,5	8,3	
		3	34,2	16,7	8,4	
Azúcar en bruto	CJ3P	1	34,3	21,5	8,7	8,8
		2	31,8	15,9	8,9	
		3	32,7	19,2	8,8	
	CJ3P::gntR1(R102C)	1	30,8	16,1	9,0	9,0
		2	31,8	15,9	8,9	
		3	31,3	15,2	9,0	

5 Como resultado, similar a los ejemplos 5 y 6, se confirmó que el índice de consumo de azúcar se incrementó en la cepa de inserción de la variante gntR1 en comparación con el grupo control. Además, como resultado de confirmar el punto de tiempo en el cual se consumió toda la glucosa y el azúcar en bruto, la glucosa y el azúcar en bruto se consumió completamente a las 48 horas y 42 horas en el grupo control, y la L-lisina se produjo a 8,2 g/l y 8,8 g/l, respectivamente, y la cepa de inserción gntR1/ (R102C) produjo lisina a 42 horas y 38 horas a 8,4 g/l y 9,0 g/l, respectivamente. Es decir, en un caso de una cepa, se introdujo la variante gntR1, se confirmó que el índice de producción de L-lisina de acuerdo con el tiempo se incrementó en 17 % y 13 %, respectivamente [tabla 7].

[Tabla 7]

	Cepa	Índice de producción (g/h)	%
Glucosa	CJ3P	0,17	100
	CJ3P::gntR1(R102C)	0,20	117
Azúcar en bruto	CJ3P	0,21	100
	CJ3P::gntR1(R102C)	0,24	113

10 En consecuencia, a partir de los resultados anteriores, cuando se introdujo la variante gntR1 en la cepa de producción de lisina en el género *Corynebacterium*, se confirmó que debido a un incremento en el índice de consumo de azúcar, el índice de producción de lisina se mejoró de manera efectiva.

<110> CJ CheilJedang Corporation

15 <120> Una variante del represor del gluconato, un microorganismo que comprende esta variante y a un procedimiento para producir L-lisina mediante el uso del microorganismo.

<130> OPA15327-PCT

<150> KR 10-2015-0055495

<151> 2015-04-20

<160> 8

20 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 250

<212> PRT

ES 2 745 561 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> GntR1 (R102C)

<400> 1

Met	Thr	Pro	Ala	Asn	Glu	Ser	Pro	Met	Thr	Asn	Pro	Leu	Gly	Ser	Ala
1				5					10					15	
Pro	Thr	Pro	Ala	Lys	Pro	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Asp	Glu	Leu	Gly
			20					25					30		
Gln	Asp	Ile	Ile	Ser	Gly	Lys	Val	Ala	Val	Gly	Asp	Thr	Phe	Lys	Leu
		35					40					45			
Met	Asp	Ile	Gly	Glu	Arg	Phe	Gly	Ile	Ser	Arg	Thr	Val	Ala	Arg	Glu
	50					55					60				
Ala	Met	Arg	Ala	Leu	Glu	Gln	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Ser	Arg	Arg
65					70					75					80
Ile	Gly	Ile	Thr	Val	Leu	Pro	Gln	Glu	Glu	Trp	Ala	Val	Phe	Asp	Lys
				85					90					95	
Ser	Ile	Ile	Arg	Trp	Cys	Leu	Asn	Asp	Glu	Gly	Gln	Arg	Glu	Gly	Gln
			100					105					110		
Leu	Gln	Ser	Leu	Thr	Glu	Leu	Arg	Ile	Ala	Ile	Glu	Pro	Ile	Ala	Ala
		115					120					125			
Arg	Ser	Val	Ala	Leu	His	Ala	Ser	Thr	Ala	Glu	Leu	Glu	Lys	Ile	Arg
	130					135					140				
Ala	Leu	Ala	Thr	Glu	Met	Arg	Gln	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Gln	Gly	Ala
145					150					155					160
Ser	Gln	Arg	Phe	Leu	Glu	Ala	Asp	Val	Thr	Phe	His	Glu	Leu	Ile	Leu
			165						170					175	
Arg	Tyr	Cys	His	Asn	Glu	Met	Phe	Ala	Ala	Leu	Ile	Pro	Ser	Ile	Ser
			180					185					190		
Ala	Val	Leu	Val	Gly	Arg	Thr	Glu	Leu	Gly	Leu	Gln	Pro	Asp	Leu	Pro
		195					200					205			

5

ES 2 745 561 T3

Ala His Glu Ala Leu Asp Asn His Asp Lys Leu Ala Asp Ala Leu Leu
 210 215 220
 Asn Arg Asp Ala Asp Ala Ala Glu Thr Ala Ser Arg Asn Ile Leu Asn
 225 230 235 240
 Glu Val Arg Ser Ala Leu Gly Thr Leu Asn
 245 250

<210> 2

<211> 753

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> gntRI(R102C)

<400> 2

5

atgaccccag caaacgaaag tcctatgact aatccattag gttctgcccc caccacagcc 60
 aagccacttc ttgacagtgt tcttgatgag ctccggtcaag atatcatcag tggcaaggtt 120
 gctgtcggag ataccttcaa gctgatggac atcggcgagc gttttggcat ttcccgcaca 180
 gtggcacgcg aagcgatgcg cgctttggag cagctcggtc ttgtcgcttc ttcacgtcgc 240
 attggcatta ctgttttgcc acaggaagag tgggctgttt ttgataagtc catcattcgc 300
 tgggtgtctca atgacgaagg tcagcgtgaa ggccagcttc agtctcttac cgagcttcgt 360
 attgctattg aaccgattgc cgcgcgcagc gttgctcttc acgcgtcaac cgccgagctc 420
 gagaaaatcc gcgcgctcgc aacagagatg cgtcagttgg gtgaatctgg tcagggtgcg 480
 tcccagcgtc tcctcgaagc ggacgtcact ttccacgagc tcatcttgcg ttattgccac 540
 aatgagatgt tcgctgcact gattccgtcg attagcgcgg ttcttgctcg cgcaccgag 600
 ctccggcctgc agcctgatct gccggcgcac gagggcctag acaaccacga taagcttgcc 660
 gacgccctcc ttaaccgoga cgccgacgcc gcagaaactg cgtcccgaaa catcctcaat 720
 gaggtgcgca gcgcgctggg cacgctgaac taa 753

10

<210> 3

<211> 753

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

15

<400> 3

ES 2 745 561 T3

```

atgaccccag caaacgaaag tcctatgact aatccattag gttctgcccc caccccagcc      60
aagccacttc ttgacagtgt tcttgatgag ctcggtcaag atatcatcag tggcaagggt      120
gctgtcggag atacottcaa gctgatggac atcggcgagc gttttggcat ttcccgcaca      180
gtggcacgcg aagcgatgcg cgctttggag cagctcggtc ttgtcgcttc ttcacgtcgc      240
attggcatta ctgttttgcc acaggaagag tgggctgttt ttgataagtc catcattcgc      300

tggcgtctca atgacgaagg tcagcgtgaa ggccagcttc agtctcttac cgagcttcgt      360
attgctattg aaccgattgc cgcgcgcagc gttgctcttc acgcgtcaac cgccgagctc      420
gagaaaatcc gcgcgctcgc aacagagatg cgtcagttgg gtgaatctgg tcaggggtgcg      480
tcccagcgct tcctogaagc ggacgtcact ttccacgagc tcatcttgcg ttattgccac      540
aatgagatgt tcgctgcact gattccgtcg attagcgcgg ttcttgctcg cgcaccgag      600
ctcggcctgc agcctgatct gccggcgcac gaggcgctag acaaccaoga taagcttgcc      660
gacgccctcc ttaaccgcca cgccgacgcc gcagaaactg cgtcccgaaa catcctcaat      720
gaggtgcgca gcgcgctggg cacgctgaac taa      753

```

```

<210> 4
<211> 250
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

```

5

```

<400> 4

```

ES 2 745 561 T3

Met Thr Pro Ala Asn Glu Ser Pro Met Thr Asn Pro Leu Gly Ser Ala
 1 5 10 15
 Pro Thr Pro Ala Lys Pro Leu Leu Asp Ser Val Leu Asp Glu Leu Gly
 20 25 30
 Gln Asp Ile Ile Ser Gly Lys Val Ala Val Gly Asp Thr Phe Lys Leu
 35 40 45
 Met Asp Ile Gly Glu Arg Phe Gly Ile Ser Arg Thr Val Ala Arg Glu
 50 55 60
 Ala Met Arg Ala Leu Glu Gln Leu Gly Leu Val Ala Ser Ser Arg Arg
 65 70 75 80
 Ile Gly Ile Thr Val Leu Pro Gln Glu Glu Trp Ala Val Phe Asp Lys
 85 90 95
 Ser Ile Ile Arg Trp Arg Leu Asn Asp Glu Gly Gln Arg Glu Gly Gln
 100 105 110
 Leu Gln Ser Leu Thr Glu Leu Arg Ile Ala Ile Glu Pro Ile Ala Ala
 115 120 125
 Arg Ser Val Ala Leu His Ala Ser Thr Ala Glu Leu Glu Lys Ile Arg
 130 135 140
 Ala Leu Ala Thr Glu Met Arg Gln Leu Gly Glu Ser Gly Gln Gly Ala
 145 150 155 160
 Ser Gln Arg Phe Leu Glu Ala Asp Val Thr Phe His Glu Leu Ile Leu
 165 170 175
 Arg Tyr Cys His Asn Glu Met Phe Ala Ala Leu Ile Pro Ser Ile Ser
 180 185 190
 Ala Val Leu Val Gly Arg Thr Glu Leu Gly Leu Gln Pro Asp Leu Pro
 195 200 205
 Ala His Glu Ala Leu Asp Asn His Asp Lys Leu Ala Asp Ala Leu Leu
 210 215 220
 Asn Arg Asp Ala Asp Ala Ala Glu Thr Ala Ser Arg Asn Ile Leu Asn
 225 230 235 240
 Glu Val Arg Ser Ala Leu Gly Thr Leu Asn
 245 250

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 745 561 T3

<220>
<223> Cebador
<400> 5
tcaggggtga gcggttcggt ttat 24

5 <210> 6
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 6
ccgcgcgtaa tacgactcac tata 24

15 <210> 7
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

20 <400> 7
aagaattcag cagatcgaag aagaagc 27

25 <210> 8
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

30 <400> 8
aagtcgacgg gactaaaagc tggcg 25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene actividad represora del gluconato que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1.
2. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.
- 5 3. El polinucleótido de la reivindicación 2, en el que el polinucleótido comprende la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO.: 2.
4. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2.
5. Un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-lisina, que expresa el polipéptido de la reivindicación 1.
- 10 6. El microorganismo del género *Corynebacterium* de la reivindicación 5, en la que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
7. Un procedimiento para producir L-lisina, que comprende:
 - 15 (a) cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* de la reivindicación 5 o 6 en un medio; y
 - (b) recuperar L-lisina del microorganismo cultivado o el medio en la etapa (a).