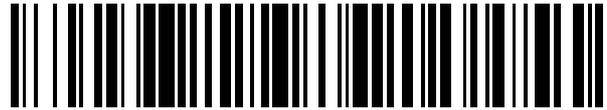


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 790 382**

51 Int. Cl.:

C12N 15/77 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2016 PCT/KR2016/006833**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17007159**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2016 E 16821565 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3318637**

54 Título: **Microorganismo que produce L-lisina y método para producir L-lisina usando el mismo**

30 Prioridad:

03.07.2015 KR 20150095528

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

27.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE, PETER;
KIM, HYUNG JOON;
CHOI, HYANG;
RYU, SONG GI y
LEE, SANG MOK**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 790 382 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

Microorganismo que produce L-lisina y método para producir L-lisina usando el mismo

5 **[Campo técnico]**

La presente divulgación se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una productividad de L-lisina aumentada en comparación con un microorganismo sin modificar, que se modifica de manera tal que la actividad de una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular se inactiva en comparación con la actividad endógena de esta y un método para producir L-lisina mediante el uso del mismo.

10 **[Antecedentes de la técnica]**

Los L-aminoácidos, en particular la L-lisina, que se usan en alimentos para animales, agentes terapéuticos para seres humanos, o en la industria cosmética se producen principalmente a través de la fermentación mediante el uso de una cepa del género *Corynebacterium* o una cepa del género *Escherichia*. En consecuencia, se realizan varios estudios para desarrollar cepas que produzcan L-lisina con alto rendimiento y tecnología de fermentación de estas. Sin embargo, la investigación sobre el control de la lisis celular, que puede causar una disminución de la productividad en las etapas tardías de la fermentación, es aún insuficiente.

Mientras tanto, las hidrolasas de la pared celular se conocen como enzimas que degradan las paredes celulares bacterianas, y están presentes en todos los microorganismos que tienen peptidoglicano (Rice KC y Bayles KW. *Microbiol Mol Biol Rev.*2008. 72:85-109). Aunque la investigación sobre tales hidrolasas de la pared celular se llevó a cabo en varias bacterias, su mecanismo de control preciso aún se desconoce.

Recientemente se propuso un modelo para el mecanismo de lisis celular que ocurre durante el cultivo de microorganismos en *neumococo* (Mellroth P y otros *J Biol Chem.* 2012. 287:11 018-29). Específicamente, cuando las células se exponen a varios tipos de tensiones, aumenta la actividad de hidrolasa de la pared celular presente en la pared externa de las células, e inicia de esta manera la descomposición de la pared celular. Cuando las células se disuelven por la acción continua de tal hidrolasa de la pared celular, la hidrolasa de la pared celular presente en el citoplasma se expone al exterior de las células. Se informó que las células circundantes se disuelven cuando ocurre una serie de procesos continuamente de manera que la cantidad de hidrolasa de la pared celular excede un umbral fuera de las células. Sin embargo, aún se desconoce una correlación entre la lisis celular generada durante el proceso de cultivo por fermentación y la producción de aminoácidos.

Tsuge y otros (*J. Bacteriology* 2008, 190: 8204-8214) divulgan mutantes de supuestas hidrolasas de la pared celular que causan un defecto en la separación celular, un proceso que se inicia por la hidrólisis del peptidoglicano por las hidrolasas de la pared celular.

Xu J y otros (*Amino Acids* 2014, 46:2165-2175) describen que la producción de L-lisina puede mejorarse en *Corynebacterium glutamicum* al aumentar el flujo en la vía biosintética de la L-lisina.

El documento núm. WO2012/008810 divulga un aumento en la producción de L-lisina en *Corynebacterium glutamicum* al debilitar la actividad de la gluconato quinasa (GntK).

45 **[Divulgación]****[Problema técnico]**

Los presentes inventores realizaron esfuerzos para buscar continuamente una característica eficaz capaz de aumentar la productividad de L-lisina en un microorganismo del género *Corynebacterium*, que es una cepa productora de L-lisina representativa. Como resultado, los presentes inventores confirmaron que la productividad de L-lisina aumentó cuando un gen que codifica una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular estaba deficiente, y que el aumento en la productividad de lisina se afectó cuando un gen adicional que codifica una proteína que tiene una función similar estaba deficiente, lo que completa de esta manera la presente divulgación.

[Solución técnica]

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tenga una productividad de L-lisina aumentada.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un método para preparar L-lisina mediante el uso del microorganismo del género *Corynebacterium*, que tiene una productividad de L-lisina aumentada.

[Efectos ventajosos]

El microorganismo de acuerdo con la presente divulgación es un microorganismo del género *Corynebacterium*, que se modifica de manera tal que la actividad de una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular se reduce o inactiva en comparación con la actividad endógena de esta. Es decir, el microorganismo de acuerdo con la presente divulgación es una nueva cepa que conduce a un aumento de la productividad en una etapa tardía de la fermentación, y así se aplica como un nuevo paradigma del microorganismo del género *Corynebacterium*, que produce L-lisina, y proporciona de esta manera un microorganismo capaz de producir L-lisina con alto rendimiento. En consecuencia, la L-lisina preparada puede aplicarse no solo a alimentos para animales o aditivos para alimentos para animales sino también a diversos productos tales como medicinas, aditivos para alimentos, alimentos para seres humanos, etc.

[Mejor modo]

Para lograr los propósitos anteriores, un aspecto de la presente divulgación proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una productividad de L-lisina aumentada en comparación con un microorganismo sin modificar, que se modifica de manera tal que la actividad de una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular se inactiva en comparación con la actividad endógena de esta.

Como se usa en la presente descripción, el término "proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular" se refiere a una proteína relevante capaz de hidrolizar una pared celular en un microorganismo del género *Corynebacterium*. La proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular puede ser una hidrolasa asociada a la pared celular o una N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, pero no se limita a estas.

Como se describió anteriormente, siempre que una proteína tenga una actividad de una proteína relevante capaz de hidrolizar una pared celular en el microorganismo, las secuencias del gen y la proteína pueden obtenerse de una base de datos conocida. En adición, Genbank de NCBI, etc. pueden usarse como ejemplos de la base de datos conocida, pero no se limitan a estos.

La hidrolasa asociada a la pared celular puede ser una proteína codificada por el gen NCg11480, una proteína codificada por el gen NCg12107, o una proteína codificada por el gen NCg12108 derivada de un microorganismo del género *Corynebacterium*, específicamente de *Corynebacterium glutamicum*, pero no se limita a estas. Como ejemplo específico, la hidrolasa asociada a la pared celular puede tener los aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, o 3, pero puede incluir la secuencia de proteína que tiene la actividad anterior sin limitación. En adición, cualquier secuencia de nucleótidos puede incluirse en estas sin limitación siempre que sea una secuencia de nucleótidos que codifique una proteína que tenga la actividad de la hidrolasa asociada a la pared celular. Como ejemplo específico, esta puede ser una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, 6, o 7, pero no se limita a estas.

La N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa puede ser una proteína codificada por el gen NCg12986 derivada de un microorganismo del género *Corynebacterium*, específicamente de *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, la N-acetil-muramoil-L-alanina amidasa puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, pero cualquier secuencia de aminoácidos de la proteína que tenga la actividad anterior puede incluirse sin limitación. En adición, cualquier secuencia de nucleótidos puede incluirse sin limitación siempre que la secuencia de nucleótidos codifique una proteína que tenga la actividad de la N-acetil-muramoil-L-alanina amidasa. Por ejemplo, puede ser una proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, pero no se limita a esta.

Cada una de las proteínas descritas anteriormente puede incluir sin limitación, en adición a las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO, cualquier secuencia de aminoácidos que tenga una homología con las secuencias de aminoácidos enumeradas anteriormente de 80 % o más, preferentemente, 90 % o más, con mayor preferencia 95 % o más, e incluso con mayor preferencia 97 % o más, siempre que las secuencias de aminoácidos codifiquen proteínas que tengan un efecto sustancialmente igual o correspondiente a cada una de las proteínas. Adicionalmente, es obvio que cualquier proteína modificada que tenga la homología descrita anteriormente puede pertenecer al alcance de la presente divulgación, aunque la proteína puede tener una secuencia de aminoácidos con una modificación, sustitución, adición, o delección parcial en esta.

Adicionalmente, los genes que codifican cada una de las proteínas de la presente divulgación también pueden incluir sin limitación, en adición a las secuencias de nucleótidos descritas por las SEQ ID NO, cualquier secuencia de genes que codifique las proteínas que tenga homología con cada una de las secuencias de nucleótidos enumeradas anteriormente de 80 % o más, preferentemente, 90 % o más, con mayor preferencia 95 % o más, incluso con mayor preferencia 98 % o más, y con la máxima preferencia 99 % o más, siempre que las secuencias de genes codifiquen una proteína que tenga un efecto sustancialmente igual o correspondiente a cada una de las proteínas. Adicionalmente, es obvio que cualquier secuencia de nucleótidos que tenga las homologías anteriores puede pertenecer al alcance de la presente divulgación, aunque la secuencia puede tener una modificación, sustitución, adición, o delección parcial en esta.

Como se usa en la presente descripción, "homología" se refiere a la similitud en secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos de genes que codifican una proteína. Cuando la homología es suficientemente alta, los productos del gen correspondiente pueden ser iguales o tener una actividad similar. Es decir, se refiere a un porcentaje de identidad

entre dos restos polinucleotídicos o polipeptídicos. La correspondencia de secuencia de un resto con respecto a otro puede determinarse mediante una técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, la homología puede determinarse mediante el alineamiento de la información de secuencia de dos moléculas de polinucleótidos o dos moléculas de polipéptidos directamente mediante el uso de un programa de ordenador que esté fácilmente disponible y que sea capaz de alinear la información de secuencia. El programa de ordenador puede ser BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc), etc. En adición, la homología puede determinarse mediante la hibridación de los polinucleótidos bajo la condición de formar una doble cadena estable en las regiones homólogas y después hidrolizar enzimáticamente la cadena hibridada por una nucleasa específica de cadena simple para determinar el tamaño de un fragmento hidrolizado enzimáticamente.

Como se usa en la presente descripción, el término “actividad endógena” se refiere a una actividad proteica en el estado anterior a una modificación de un microorganismo o en su estado nativo.

Como se usa en la presente descripción, el término “actividad de una enzima modificada para inactivarse en comparación con su actividad endógena” se refiere a una actividad donde un gen que codifica una enzima no se expresa en absoluto en comparación con una cepa de tipo salvaje o una cepa antes de una modificación, o se refiere a una reducción o eliminación de una actividad incluso cuando se expresa el gen.

La “inactivación de una actividad en comparación con su actividad endógena” se refiere a una reducción o eliminación de la actividad cuando se compara con la que posee en su estado natural o el estado antes de una modificación. La reducción es un concepto que se refiere a un caso en el que la actividad de una enzima se reduce en comparación con la que originalmente poseía el microorganismo debido a una modificación en el gen que codifica la enzima, un caso en el que el nivel de expresión global de la enzima es inferior al de la cepa de tipo natural del microorganismo o la cepa antes de una modificación, o una combinación de estas.

La “eliminación de una actividad” se refiere a un caso cuando un gen que codifica una enzima no se expresa en absoluto en comparación con el de la cepa de tipo natural o la cepa antes de una modificación, y/o se refiere a un caso cuando el gen se expresa pero no exhibe actividad.

El método de modificación para inactivar la actividad enzimática puede lograrse mediante la aplicación de varios métodos que se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de los métodos pueden incluir un método para reemplazar el gen que codifica la enzima en el cromosoma con un gen mutado de manera que la actividad enzimática pueda reducirse, lo que incluye el caso en que se elimina la actividad enzimática; un método para introducir una modificación en la secuencia reguladora de la expresión del gen que codifica la enzima en el cromosoma; un método para reemplazar la secuencia reguladora de la expresión del gen que codifica la enzima con una secuencia que tiene una actividad débil o ninguna actividad; un método para eliminar una parte o el gen completo que codifica la enzima en el cromosoma; un método para introducir un oligonucleótido antisentido (por ejemplo, ARN antisentido), que inhibe la traducción del ARNm a una enzima a través de una unión complementaria al transcrito del gen en el cromosoma; un método para hacer imposible la unión del ribosoma mediante la formación de una estructura secundaria mediante la adición artificialmente de una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) y su secuencia complementaria en el extremo frontal de la secuencia SD del gen que codifica la enzima; un método de ingeniería de transcripción inversa (RTE), que adiciona un promotor de manera que se transcriba inversamente en el término 3' del marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia correspondiente, etc., e incluye también una combinación de estos, pero no se limita a estos.

Específicamente, el método para eliminar una parte o el gen completo que codifica una enzima puede realizarse mediante el reemplazamiento del polinucleótido, que codifica la proteína objetivo endógena dentro del cromosoma mediante un vector para insertar al cromosoma en un microorganismo, un polinucleótido o un marcador donde se elimina parte de la secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, puede usarse un método de delección de genes mediante recombinación homóloga.

Como se usa en la presente descripción, el término “parte”, aunque puede variar en dependencia de los tipos de polinucleótidos, puede referirse específicamente a de 1 nucleótido a 300 nucleótidos, más específicamente de 1 nucleótido a 100 nucleótidos, e incluso más específicamente de 1 nucleótido a 50 nucleótidos, pero se limita a estos.

Como se usa en la presente descripción, el término “recombinación homóloga” se refiere a la recombinación genética que se produce mediante entrecruzamiento en un locus de una cadena de un gen que tiene una homología mutua.

De acuerdo con una modalidad ejemplar de la presente divulgación, las proteínas se inactivaron mediante recombinación homóloga.

Específicamente, el método de modificación de una secuencia reguladora de la expresión puede llevarse a cabo mediante la inducción de una modificación en la secuencia reguladora de la expresión mediante delección, inserción, sustitución no conservadora o conservadora de una secuencia de ácido nucleico de la secuencia reguladora de la expresión, o una combinación de estas; o puede llevarse a cabo mediante el reemplazamiento de la secuencia con un promotor más débil. La secuencia reguladora de la expresión incluye un promotor, una secuencia de operador, una

secuencia que codifica un sitio de unión a ribosomas, y una secuencia para regular la terminación de la transcripción y la traducción.

Adicionalmente, el método de modificación de una secuencia génica en el cromosoma puede llevarse a cabo mediante la inducción de una modificación en la secuencia mediante delección, inserción, sustitución no conservadora o conservadora de la secuencia génica, o una combinación de estas para reducir aún más la actividad enzimática; o mediante el reemplazamiento de la secuencia con una secuencia génica mejorada para tener una actividad más débil adicional o con una secuencia génica mejorada para no tener actividad.

Como se usa en la presente descripción, el término “microorganismo que produce L-lisina” se refiere a una cepa de microorganismo capaz de producir L-lisina mediante fermentación. Por ejemplo, incluye una cepa capaz de aumentar la productividad de L-lisina mediante la modificación de la secuencia mediante la manipulación de la presente divulgación tal que una actividad de una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular se inactiva en comparación con su actividad endógena; y mediante la regulación de la lisis celular para la producción de lisina, que ocurre durante la fermentación, pero no se limita a estas.

En la presente divulgación, el microorganismo que produce L-lisina puede incluir todos los microorganismos del género *Corynebacterium*, que es capaz de modificarse de manera tal que la actividad de una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular se inactiva en comparación con su actividad endógena. Por ejemplo, pueden usarse *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Brevibacterium flavum*, o *Brevibacterium fermentum*, pero el microorganismo no se limita a estos. Por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum* puede usarse para el microorganismo del género *Corynebacterium*. El microorganismo modificado del género *Corynebacterium* se caracteriza porque la productividad de L-lisina se mejora en comparación con un microorganismo que no se modifica de manera tal que una actividad de una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular se inactiva en comparación con su actividad endógena.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un método para preparar L-lisina, que incluye: (i) cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium*, que se modifica de manera tal que la actividad de una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular se inactiva en comparación con su actividad endógena; y (ii) recuperar la L-lisina del medio de cultivo o del microorganismo.

El microorganismo del género *Corynebacterium*, en el que aumenta la productividad de L-lisina, es como se describió anteriormente.

Como se usa en la presente descripción, el término “cultivo” se refiere al cultivo de un microorganismo en condiciones ambientales controladas artificialmente. En la presente divulgación, el método de cultivar L-lisina mediante el uso del microorganismo del género *Corynebacterium* puede realizarse mediante el uso de un método ampliamente conocido en la técnica. Específicamente, los ejemplos del cultivo incluyen un proceso por lotes y un proceso por lotes alimentado o un proceso por lotes alimentado repetido de manera continua, pero no se limitan a estos.

El medio usado para el cultivo debe satisfacer los requisitos para una cepa específica de una manera apropiada (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington DC, EE. UU., 1981). Las fuentes de carbono que pueden usarse en la presente divulgación pueden incluir azúcares y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, y celulosa; aceites y grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino, y aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico, y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido glucónico, ácido acético, y ácido pirúvico, pero estas no se limitan a estas. Estas sustancias pueden usarse solas o en una mezcla. Las fuentes de nitrógeno que pueden usarse en la presente divulgación pueden incluir peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor macerado de maíz, torta de soja desgrasada, y urea o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, y nitrato de amonio, pero estas no se limitan a estas. Estas fuentes de nitrógeno también pueden usarse solas o en una mezcla. Las fuentes de fósforo que pueden usarse en la presente divulgación pueden incluir dihidrógeno fosfato de potasio o hidrógeno fosfato de dipotasio, o las sales correspondientes que contienen sodio, pero no se limitan a estas. En adición, el medio de cultivo puede contener una sal metálica tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que se requiere para el crecimiento. Por último, en adición a las sustancias descritas anteriormente, pueden usarse factores de crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Adicionalmente, pueden usarse precursores adecuados en el medio de cultivo. Estas sustancias pueden adicionarse al medio durante el cultivo de manera por lotes o continua. Tal variedad de métodos de cultivo se divulga, por ejemplo, en la literatura (“Biochemical Engineering” por James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pág. 138-176).

Los compuestos básicos tales como el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, o el amoníaco, o los compuestos ácidos tales como el ácido fosfórico o el ácido sulfúrico pueden adicionarse al medio de cultivo de manera adecuada para ajustar el pH del medio de cultivo. En adición, puede usarse un agente antiespumante tal como el éster poliglicólico de ácidos grasos para suprimir la formación de burbujas. Para mantener el medio de cultivo en un estado aeróbico, puede inyectarse oxígeno o gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) en el medio de cultivo. La temperatura del medio de cultivo puede ser usualmente de 20 °C a 45 °C, preferentemente, de 25 °C a 40 °C, pero puede modificarse en dependencia de las condiciones. El cultivo puede continuar hasta que se produzca la cantidad máxima de un L-

aminoácido deseado, y esto generalmente puede lograrse dentro de 10 horas a 160 horas. La L-lisina puede liberarse en el medio de cultivo o estar contenida en las células.

El método de la presente divulgación para producir L-lisina puede incluir una etapa de recuperación de lisina del microorganismo o del medio. Pueden usarse métodos conocidos en la técnica, tales como centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, HPLC, etc., para el método de recuperación de L-lisina del microorganismo o el cultivo, pero el método no se limita a estos.

La etapa de recuperación puede incluir un proceso de purificación.

[Modo para la invención]

A continuación, la presente divulgación se describirá en detalle con modalidades ejemplares acompañantes. Sin embargo, las modalidades ejemplares divulgadas en la presente descripción son solo para fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente divulgación.

Ejemplo 1: preparación de una biblioteca mutante aleatoria mediante el uso de transposones

Para obtener genes que aumenten la productividad de lisina, se preparó una biblioteca de vectores mediante el siguiente método. El plásmido obtenido mediante el uso del kit EZ-Tn5™<R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre) se transformó mediante el uso de la cepa KCCM11016P (el microorganismo se designó como KFCC10881 y se volvió a depositar en la institución depositaria internacional en virtud del Tratado de Budapest, y después se designó el número de acceso al depósito de KCCM11016P; patente coreana núm. 10-0159812) como una cepa original, y después se extendió en una placa de medio complejo que contenía kanamicina (25 mg/L) para obtener aproximadamente 20 000 colonias.

<Placa de medio complejo (pH 7,0)>

10 g de glucosa, 10 g de peptona, 5 g de extracto de carne de res, 5 g de extracto de levadura, 18,5 g de infusión cerebro corazón, 2,5 g de NaCl, 2 g de urea, 91 g de sorbitol, 20 g de agar (basado en 1 L de agua destilada)

Ejemplo 2: Cribado de una biblioteca mutante aleatoria mediante el uso de transposones

Cada una de aproximadamente 20 000 colonias obtenidas en el Ejemplo 1 se inoculó en un medio de selección (300 µL), y se cultivó en placas de 96 pocillos profundos a 32 °C a 1000 rpm durante aproximadamente 24 horas. Se usó un método de ninhidrina para analizar la cantidad de L-lisina producida en el medio de cultivo (Moore, S., Stein, WH, Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem 1948, 176, 367-388). Al finalizar el cultivo, el sobrenadante del cultivo (10 µl) y la solución de reacción de ninhidrina (190 µl) se hicieron reaccionar a 65 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm mediante el uso de un espectrofotómetro, y se seleccionaron aproximadamente 60 tipos de colonias como cepas modificadas que mostraban una alta absorbancia en comparación con el control, KCCM11016P. Otras colonias mostraron una absorbancia similar o disminuida en comparación con la del control, la cepa KCCM11016P.

Se cultivaron 60 tipos de las cepas seleccionadas de la misma manera que antes, y la reacción de ninhidrina se realizó repetidamente. Como resultado, se seleccionaron las 10 mejores cepas que tenían una productividad mejorada de L-lisina en comparación con la cepa KCCM11016P.

<Medio de selección (pH 8,0)>

10 g de glucosa, 5,5 g de sulfato de amonio, 1,2 g de MgSO₄ 7H₂O, 0,8 g de KH₂PO₄, 16,4 g de K₂HPO₄, 100 µg de biotina, 1000 µg de tiamina HCl, 2000 µg de pantotenato de calcio, 2000 µg de nicotinamida (basado en 1 L de agua destilada)

Ejemplo 3: Análisis de la productividad de L-lisina de cepas mutantes aleatorias seleccionadas

Para seleccionar finalmente las cepas que tienen una mayor productividad de L-lisina, se llevó a cabo una prueba de reproducibilidad en un matraz mediante el uso del medio de a continuación para 10 tipos de cepas seleccionadas en el Ejemplo 2. Se inocularon 10 tipos de cepas y el control en un matraz con deflector de esquina (250 mL) que contenía el medio de siembra de a continuación (25 mL), y se cultivaron mientras se agitaban a 30 °C y 200 rpm durante 20 horas. El medio de siembra y el medio de producción tienen las siguientes composiciones. Al finalizar el cultivo, las concentraciones de L-lisina en la solución de cultivo se analizaron mediante el uso de HPLC, y las concentraciones de L-lisina de cada una de las cepas mutantes se muestran en la Tabla 1 a continuación.

<Medio de siembra (pH 7,0)>

ES 2 790 382 T3

20 g de glucosa, 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 1,5 g de urea, 4 g de KH₂PO₄, 8 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄·7H₂O, 100 µg de biotina, 1000 µg de tiamina HCl, 2000 µg de pantotenato de calcio, 2000 µg de nicotinamida (en base a 1 L de agua destilada)

5 <Medio de producción (pH 7,0)>

100 g de glucosa, 40 g de (NH₄)₂SO₄, 2,5 g de proteína de soya, 5 g de sólido macerado de maíz, 3 g de urea, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄·7H₂O, 100 µg de biotina, 1000 µg de tiamina HCl, 2000 µg de pantotenato de calcio, 3000 µg de nicotinamida, 30 g de CaCO₃ (basado en 1 L de agua destilada)

10

[Tabla 1] Concentración de L-lisina de 10 cepas mutantes seleccionadas

	Cepa	L-Lisina (g/L)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio
15	Control	42,5	42,8	42,7	42,7
	KCCM11016P				
	1	48,8	48,9	48,5	48,7
20	2	43,0	43,1	43,4	43,2
	3	42,7	43,1	42,9	42,9
	4	44,9	45,1	45,3	45,1
25	5	44,3	44,1	44,0	44,1
	6	42,4	42,9	42,8	42,7
	7	43,8	43,2	43,7	43,6
30	8	47,2	46,9	47,1	47,1
	9	44,1	44,4	44,2	44,2
	10	43,1	43,7	43,2	43,3

35

Entre los 10 mutantes seleccionados anteriormente, KCCM11016P/mt-1 y KCCM11016P/mt-8 finalmente se seleccionaron como cepas que tenían una productividad de L-lisina significativamente mejorada.

40 **Ejemplo 4: Confirmación de genes que participan en la productividad de L-lisina en las cepas finalmente seleccionadas y selección de genes candidatos adicionales**

En este ejemplo, se intentó la identificación de genes que son deficientes debido a la inserción aleatoria de un transposón a partir de las cepas finalmente seleccionadas en el Ejemplo 3. Los ADN genómicos de KCCM11016P/mt-1 y KCCM11016P/mt-8 se extrajeron y después se hidrolizaron enzimáticamente. Posteriormente, los resultantes se ligaron, se transformaron en *E. coli* DH5a, y después se sembraron en placas en un medio LB sólido que contenía kanamicina (25 mg/L). Después de seleccionar 20 tipos de colonias transformadas, se obtuvieron plásmidos que contenían partes de los genes desconocidos, y las secuencias de nucleótidos se analizaron mediante el uso de las secuencias de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 en el kit EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN- Kit 2> Tnp Transposome™ (Tabla 2). Como resultado, se confirmó que cada uno de los genes NCgl2108 y NCgl2986 se inactivó en las cepas mutantes.

50

[Tabla 2]

	Secuencia	SEQ ID NO	
55	Cebador del kit	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	9
	Cebador del kit	CTACCCTGTGGAACACCTACATCT	10

60 Los genes NCgl2108 y NCgl2986 identificados como deficientes en las cepas mutantes seleccionadas en el Ejemplo 3 estaban presentes endógenamente en *Corynebacterium*, y por lo tanto identificados como proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular.

65 En base a los resultados de la selección de 2 tipos de proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular en cepas mutantes aleatorias mediante el uso de transposones, se consideró que la deficiencia en los genes que participan en la hidrólisis de la pared celular sería efectiva para aumentar la productividad de L-lisina. En consecuencia, se realizó

una búsqueda en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) de genes que participan en la hidrólisis de la pared celular que no sean los genes NCgl2108 y NCgl2986.

Como resultado de la búsqueda, los genes NCgl1480 y NCgl2107, que están presentes endógenamente en *Corynebacterium*, se seleccionaron adicionalmente como proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular. Por consiguiente, para confirmar si la eliminación de los genes NCgl1480 y NCgl2107 afecta la productividad de L-lisina, estos genes se seleccionaron como genes candidatos a delección adicionales.

Ejemplo 5: Producción de plásmidos recombinantes para la inactivación de los genes NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986

En este ejemplo, para confirmar si la inactivación de los genes NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986 afectaría la producción de L-lisina, se produjeron los plásmidos recombinantes para la delección de los genes NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986 seleccionados en el Ejemplo 4 en los cromosomas de las cepas productoras de L-lisina en *Corynebacterium*.

Basado en las secuencias de nucleótidos informadas en el U.S. National Institutes of Health GenBank (NIH Genbank), se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, y 4 de NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986, así como de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, 6, 7, y 8 que codifican lo mismo. Para producir fragmentos de genes, en los que el marco de lectura abierto de cada uno de NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986 se eliminan internamente, se produjeron los cebadores de las SEQ ID NO: 11 a 14 para NCgl1480, 15 a 18 para NCgl2107, 19 a 22 para NCgl2108, y 23 a 26 para NCgl2986 en base a las SEC ID NO: 5, 6, 7, y 8 anteriores. Las secuencias de estos se muestran en la Tabla 3 a continuación.

[Tabla 3]

Cebador	Secuencia	SEQ ID NO
Cebador para NCgl1480	CCGGGGATCCTCTAGAACCTTGAAACTTC CACTC	11
Cebador para NCgl1480	CTCCTGACGAACTATTTCAAATCCCCTAT CAACCTC	12
Cebador para NCgl1480	CACCGAGGTAAATTGCCATGCAAGCGCA ATCAACGC	13
Cebador para NCgl1480	GCAGGTCGACTCTAGAAACCACACATTAT CGATC	14
Cebador para NCgl2107	CCGGGGATCCTCTAGAGCACAGGGCACC CCTGTTG	15
Cebador para NCgl2107	CTCCTGACGAACTATTTCAAATCCCCTAT CAACCTC	16
Cebador para NCgl2107	GAGGTTGATAGGGGATTTGAAATAGTTTCG TCAGGAG	17
Cebador para NCgl2107	GCAGGTCGACTCTAGAAACCACACATTAT CGATC	18

5	Cebador para NCgl2108	CCGGGGATCCTCTAGAGAACCCTTAGTAG TTGGG	19
10	Cebador para NCgl2108	GTAATCCAAGGAGTGCTCACCCACTGATG AAACTCC	20
15	Cebador para NCgl2108	GGAGTTTCATCAGTGGGTGAGCACTCCTT GGATTAC	21
20	Cebador para NCgl2108	GCAGGTCGACTCTAGACGAGCCTCAATAT CAATC	22
25	Cebador para NCgl2986	CCGGGGATCCTCTAGATTAGGAGAAACCA TGAGC	23
30	Cebador para NCgl2986	ATCAGTCAGAACTGCCAGGACTGCAGTAA GAATACC	24
35	Cebador para NCgl2986	GGTATTCTTACTGCAGTCCTGGCAGTTCT GACTGAT	25
	Cebador para NCgl2986	GCAGGTCGACTCTAGAGTTGAGGCGTTTG GATAC	26

La PCR se realizó mediante el uso del ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 como molde junto con pares de secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 11 y 12, 13 y 14, 15 y 16, 17 y 18, 19 y 20, 21 y 22, 23 y 24, y 25 y 26, como cebadores (Sambrook y otros, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories). La PCR se realizó en las siguientes condiciones: 30 ciclos, cada uno consistente en desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, alineamiento a 50 °C durante 30 segundos, y alargamiento a 72 °C durante 1 minuto.

Como resultado, se obtuvieron dos pares de fragmentos de ADN de 319 pb y 410 pb (NCgl1480-A y NCgl11480-B, respectivamente) que contienen regiones corriente arriba y corriente abajo del gen NCgl1480; dos pares de fragmentos de ADN de 324 pb y 300 pb (NCgl2107-A y NCgl2107-B, respectivamente) que contienen regiones corriente arriba y corriente abajo del gen NCgl2107; dos pares de fragmentos de ADN de 381 pb y 377 pb (NCgl2108-A y NCgl2108-B, respectivamente) que contienen regiones corriente arriba y corriente abajo del gen NCgl2108; y dos pares de fragmentos de ADN de 356 pb y 374 pb (NCgl2986-A y NCgl2986-B, respectivamente) que contienen regiones corriente arriba y corriente abajo del gen NCgl2986. Los fragmentos de ADN amplificados por la PCR se conjugaron con el plásmido pDZ (patente coreana núm. 10-0924065) mediante el uso de un kit Infusion Cloning (Invitrogen), se transformaron en *E. coli* DH5 α , y después se sembraron en un medio LB sólido que contenía kanamicina (25 mg/L). Después de seleccionar colonias transformadas con los plásmidos en los que se insertan los genes deseados a través de la PCR, los plásmidos se obtuvieron mediante el uso de un método de extracción de plásmidos conocido convencionalmente en la técnica. Los plásmidos que se obtuvieron así se designaron como pDZ- Δ NCgl1480, pDZ- Δ NCgl2107, pDZ- Δ NCgl2108, y pDZ- Δ NCgl2986, respectivamente. En pDZ- Δ NCgl1480, se eliminó un fragmento génico de 1672 pb del gen NCgl1480; en pDZ- Δ NCgl2107, se eliminó un fragmento génico de 1026 pb del gen NCgl2107; en pDZ- Δ NCgl2108, se eliminó un fragmento génico de 576 pb del gen NCgl2108; y en pDZ- Δ NCgl2986, se eliminó un fragmento génico de 1092 pb del gen NCgl2986.

Ejemplo 6: Producción y evaluación de la cepa con el gen inactivado de la proteína asociada a la hidrólisis de la pared celular derivada de la cepa productora de lisina KCCM11016P

Basado en KCCM11016P, la cepa productora de L-lisina representativa del género *Corynebacterium*, se preparó la cepa con el gen inactivado de la proteína asociada a la hidrólisis de la pared celular seleccionada de lo anterior y se intentó evaluar su productividad de lisina.

Cada uno de los 4 plásmidos recombinantes (pDZ- Δ NCgl1480, pDZ- Δ NCgl2107, pDZ- Δ NCgl2108, y pDZ- Δ NCgl2986) que se produjeron en el Ejemplo 5 se transformaron en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P mediante un método de pulso eléctrico, y las cepas en donde se inactivó el gen objetivo mediante recombinación homóloga se prepararon mediante un método de PCR. Las cepas inactivadas preparadas se denominaron KCCM11016P:: Δ NCgl1480, KCCM11016P:: Δ NCgl2107, KCCM11016P:: Δ NCgl2108, y KCCM11016P:: Δ NCgl2986, respectivamente.

Se inoculó cada una de las 4 cepas y una cepa de control en un matraz con deflector de esquina (25 mL) que contenía 25 mL del siguiente medio de siembra, y se cultivaron mientras se agitaba a 30 °C y 200 rpm durante 20 horas. Posteriormente, el cultivo de siembra (1 mL) se inoculó en un matraz con deflector de esquina (1 mL) que contenía 24 mL del siguiente medio de producción, y se cultivó mientras se agitaba a 37 °C y 200 rpm durante 96 horas. La composición de cada uno de los medios de siembra y el medio de producción es la siguiente.

<Medio de siembra (pH 7,0)>

20 g de glucosa, 10 g de (NH₄)₂SO₄, 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 1,5 g de urea, 4 g de KH₂PO₄, 8 g de K₂HPO₄, 0,5 g de MgSO₄·H₂O, 100 µg de biotina, 1000 µg de tiamina HCl, 2000 µg de pantotenato de calcio, 2000 µg de nicotinamida (basado en 1 L de agua destilada)

<Medio de producción (pH 7,0)>

100 g de glucosa, 40 g de (NH₄)₂SO₄, 2,5 g de proteína de soja, 5 g de sólido de maíz, 3 g de urea, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄·H₂O, 100 µg de biotina, 1000 µg de tiamina HCl, 2000 µg de pantotenato de calcio, 3000 µg de nicotinamida, 30 g de CaCO₃ (basado en 1 L de agua destilada)

Al finalizar el cultivo, las concentraciones de L-lisina se analizaron mediante el uso de HPLC, y las concentraciones se muestran en la Tabla 4 a continuación. Los resultados en la Tabla 4 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la productividad se evaluó basada en el valor promedio.

30

[Tabla 4]

	Lisina (g/L)			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio
KCCM11016P	42,7	42,6	43,0	42,8
KCCM11016P- Δ NCgl1480	44,3	44,1	44,0	44,1
KCCM11016P- Δ NCgl2107	45,1	44,9	45,2	45,1
KCCM11016P- Δ NCgl2108	48,1	48,3	48,0	48,1
KCCM11016P- Δ NCgl2986	49,3	49,1	49,2	49,2

45

Como un resultado, como se muestra en la Tabla 4 anterior, la productividad de lisina de la cepa en donde cada uno de los genes NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986 se inactivó aumentó a 3,2 %, 5,4 %, 13 %, y 15 %, respectivamente, en comparación a la de la cepa parental KCCM11016P.

50

Estos resultados sugieren que la productividad de L-lisina puede mejorarse mediante la inactivación de las proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular, lo que puede causar la fusión celular en un microorganismo del género *Corynebacterium*.

55

En consecuencia, los experimentos se realizaron como se indica a continuación para determinar si pueden exhibirse o no efectos similares en un caso donde las proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular se inactivan en varios microorganismos del género *Corynebacterium*.

Ejemplo 7: Producción y evaluación de cepas con proteínas asociadas a la hidrólisis de la pared celular inactivadas derivadas de la cepa KCCM10770P productora de L-lisina

60

Para examinar si los efectos de la inactivación de las proteínas asociadas a la hidrólisis de la pared celular en la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (patente coreana núm. 10-0924065) que tiene una vía biosintética de lisina mejorada son similares a los resultados experimentales del Ejemplo 6, las cepas en las que cada una de las 4 proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular se inactivó se prepararon de la misma manera que se describe en el Ejemplo 6. Las cepas preparadas se denominaron KCCM10770P:: Δ NCgl1480,

65

KCCM10770P:: Δ NCgl2107, KCCM10770P:: Δ NCgl2108, y KCCM10770P:: Δ NCgl2986. La productividad de L-lisina se comparó entre las mismas.

Para comparar la productividad de lisina de las cepas anteriores, las cepas y una cepa de control se cultivaron de la misma manera que en el Ejemplo 6. Al finalizar el cultivo, las concentraciones de L-lisina analizadas mediante uso de HPLC se muestran en la Tabla 5 a continuación. Los resultados en la Tabla 5 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la productividad se evaluó basada en el valor promedio.

[Tabla 5]

	Lisina (g/L)			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio
KCCM10770P	46,0	46,3	46,1	46,1
KCCM10770P- Δ NCgl1480	47,3	47,1	47,0	47,1
KCCM10770P- Δ NCgl2107	48,0	48,2	48,1	48,1
KCCM10770P- Δ NCgl2108	51,7	51,9	51,6	51,7
KCCM10770P- Δ NCgl2986	53,1	52,9	52,1	52,7

Como resultado, como se muestra en la Tabla 5 anterior, la productividad de lisina de la cepa en donde cada uno de los genes NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986 se inactivó aumentó a 2,2 %, 4,3 %, 12,1 %, y 14,2 %, respectivamente, en comparación a la de la cepa parental KCCM10770P.

En consecuencia, se encontró que en *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (patente coreana núm. 10-0924065), la productividad de L-lisina también puede mejorarse mediante la inactivación de las proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular de la misma manera que en el Ejemplo 6.

Ejemplo 8: Producción y evaluación de cepas con proteínas asociadas a la hidrólisis de la pared celular inactivadas derivadas de la cepa productora de L-lisina KCCM11347P

Para examinar los efectos de la inactivación de las proteínas asociadas a la hidrólisis de la pared celular en la cepa productora de lisina *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (el microorganismo se designó como KFCC10750 y se volvió a depositar en la institución depositaria internacional en virtud del Tratado de Budapest, y después se designó el número de acceso al depósito de KCCM11347P; patente coreana núm. 10-0073610) preparada por modificación artificial, las cepas en las que cada una de las 4 proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular se inactivaron se prepararon de la misma manera que se describe en el Ejemplo 6. Las cepas preparadas se denominaron KCCM11347P:: Δ NCgl1480, KCCM11347P:: Δ NCgl2107, KCCM11347P:: Δ NCgl2108, y KCCM11347P:: Δ NCgl2986. La productividad de L-lisina se comparó entre las mismas.

Para comparar la productividad de lisina de las cepas anteriores, las cepas y una cepa de control se cultivaron de la misma manera que en el Ejemplo 6. Al finalizar el cultivo, las concentraciones de L-lisina se analizaron mediante uso de HPLC, y se muestran en la Tabla 6 a continuación. Los resultados en la Tabla 6 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la productividad se evaluó basada en el valor promedio.

[Tabla 6]

	Lisina (g/L)			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio
KCCM11347P	38,2	38,6	38,3	38,4
KCCM11347P- Δ NCgl1480	39,0	39,4	39,1	39,2
KCCM11347P- Δ NCgl2107	39,1	39,5	39,3	39,3
KCCM11347P- Δ NCgl2108	39,8	40,2	39,9	42,9
KCCM11347P- Δ NCgl2986	39,9	40,3	40,1	43,9

Como resultado, como se muestra en la Tabla 6 anterior, la productividad de lisina de la cepa en donde cada uno de los genes NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986 se inactivó aumentó a 2 %, 2,4 %, 11,7 %, y 14,4 %, respectivamente, en comparación a la de la cepa parental KCCM11347P.

5 Por consiguiente, se descubrió que en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (patente coreana núm. 10-0073610), la productividad de L-lisina también puede mejorarse mediante la inactivación de las proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular de la misma manera que en los Ejemplos 6 y 7.

10 **Ejemplo 9: Producción y evaluación de cepas con proteínas asociadas a la hidrólisis de la pared celular inactivadas derivadas de la cepa productora de L-lisina CJ3P**

15 Para examinar si los efectos de la inactivación de las proteínas asociadas a la hidrólisis de la pared celular en *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder y otros Genome Biology 2012, 13:R40), que produce L-lisina mediante la introducción de 3 tipos de modificaciones [pyc(P458S), hom(V59A), y lysC(T311I)] en *Corynebacterium glutamicum* de tipo salvaje, son similares a los resultados experimentales de los Ejemplos 6, 7, y 8, cepas en las que se inactivaron cada una de las 4 proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular se prepararon de la misma manera que se describe en el Ejemplo 6. Las cepas preparadas se denominaron CJ3P:: Δ NCgl1480, CJ3P:: Δ NCgl2107, CJ3P:: Δ NCgl2108, y CJ3P:: Δ NCgl2986. La productividad de L-lisina se comparó entre las mismas.

20 Para comparar la productividad de lisina de las cepas anteriores, las cepas y una cepa de control se cultivaron de la misma manera que en el Ejemplo 6. Al finalizar el cultivo, las concentraciones de L-lisina analizadas mediante uso de HPLC se muestran en la Tabla 7 a continuación. Los resultados en la Tabla 7 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la productividad se evaluó basada en el valor promedio.

25 [Tabla 7]

	Lisina (g/L)			Promedio
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
CJ3P	7,8	8,0	7,9	7,9
CJ3P- Δ NCgl1480	8,3	8,0	8,1	8,1
CJ3P- Δ NCgl2107	8,0	7,9	8,1	8,0
CJ3P- Δ NCgl2108	8,8	8,9	9,0	8,9
CJ3P- Δ NCgl2986	9,1	9,2	9,2	9,2

30 Como resultado, como se muestra en la Tabla 7 anterior, la productividad de lisina de la cepa en donde cada uno de los genes NCgl1480, NCgl2107, NCgl2108, y NCgl2986 se inactivó aumentó a 3 %, 1,3 %, 12,7 %, y 16 %, respectivamente, en comparación a la de la cepa parental CJ3P.

35 En consecuencia, se descubrió que en *Corynebacterium glutamicum* CJ3P, la productividad de L-lisina también puede mejorarse mediante la inactivación de las proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular de la misma manera que en los Ejemplos 6, 7, y 8.

40 **Ejemplo 10: Producción y evaluación de la cepa con proteínas asociadas a la hidrólisis de la pared celular simultáneamente inactivadas derivada de la cepa productora de L-lisina KCCM11016P**

45 Después de confirmar a partir de los ejemplos anteriores que la productividad de L-lisina se aumentó cuando cada una de las proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular se inactivó en la cepa de *Corynebacterium* productora de L-lisina, se intentó identificar si la productividad de L-lisina también aumentaría cuando las 2 proteínas relevantes se inactivaran simultáneamente.

50 Por lo tanto, se realizó el siguiente experimento para confirmar el efecto de la inactivación simultánea de proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular en la cepa productora de L-lisina de *Corynebacterium*. La cepa en la que se inactivaron simultáneamente dos tipos de genes de proteínas (NCgl2108 y NCgl2986) que participan en la hidrólisis de la pared celular, que son altamente efectivos para mejorar la productividad de L-lisina cuando cada una de las proteínas está deficiente, se prepararon de la misma manera que en Ejemplo 6. La cepa preparada se designó como KCCM11016P:: Δ NCgl2108/ Δ NCgl2986. Se comparó la productividad de L-lisina.

55 Para comparar la productividad de L-lisina de la cepa anterior, la cepa y una cepa de control se cultivaron de la misma manera que en el Ejemplo 6. Al finalizar el cultivo, las concentraciones de L-lisina analizadas mediante uso de HPLC se muestran en la Tabla 8 a continuación. Los resultados en la Tabla 8 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la productividad se evaluó basada en el valor promedio.

5

[Tabla 8]

	Lisina (g/L)			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio
KCCM11016P	43,4	43,1	43,2	43,2
KCCM11016P-ΔNCg12108/ ΔNCg12986	52,6	52,4	52,7	52,6

10

15 Como resultado, como se muestra en la Tabla 8, la productividad de lisina de la cepa en donde los genes NCg12108 y NCg12986 se inactivaron simultáneamente se aumentó al 21,6 %, en comparación con la cepa parental KCCM11016P.

20

Este resultado sugiere que la productividad de L-lisina puede mejorarse incluso cuando no solo una proteína sino también dos o más proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular se inactivaron simultáneamente en un microorganismo del género *Corynebacterium*.

25

A este respecto, la cepa anterior, KCCM11016P-ΔNCg12986, se denominó CA01-2292. CA01-2292 se depositó en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), una institución depositaria internacional, en virtud del Tratado de Budapest, y después se designó el número de acceso al depósito de KCCM11627P.

30

Basado en estos resultados, se confirmó que las cepas productoras de L-lisina tenían el efecto de mejorar la productividad de L-lisina al regular la lisis celular durante la fermentación en la que las proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular se inactivaron en comparación con su actividad endógena. Adicionalmente, también se confirmó que la productividad de L-lisina puede mejorarse cuando no solo una, sino también dos o más proteínas que participan en la hidrólisis de la pared celular se inactivaron simultáneamente, lo que proporciona de esta manera la nueva cepa que produce L-lisina.

<110> CJ CheilJedang Corporation

35

<120> Un microorganismo que tiene una productividad de L-lisina mejorada y un método para producir L-lisina mediante el uso del mismo

<130> OPA16081-PCT

40

<150> KR 10-2015-0095528

<151> 2015-07-03

<160> 26

45

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 604

<212> PRT

50

<213> *Corynebacterium*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(604)

55

<223> NCg1480

<400> 1

60

65

ES 2 790 382 T3

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

45

50

55

60

65

ES 2 790 382 T3

5
195 200 205
Asn Ser Glu Gln Leu Asn Val Leu Thr Asn Asn Arg Ser Thr Leu Val
210 215 220
10
Ala Gln Arg Asp Gly Ala Glu Arg Asn Leu Ala Ile Ala Arg Ala Gln
225 230 235 240
Ala Asp Asn Leu Gln Gly Gln Arg Ala Glu Tyr Glu Glu Phe Gln Gln
245 250 255
15
Ala Glu Gln Ala Arg Ile Gln Ala Glu Ala Glu Ala Gln Ala Ala Ala
260 265 270
Glu Glu Lys Arg Arg Ala Asp Glu Ala Ala Ala Gln Ala Ala Ala Glu
275 280 285
20
Ala Gln Glu Ala Ala Gln Gln Ala Gln Ala Ala Glu Glu Ala Gln Ala
290 295 300
Ala Gln Ala Ala Glu Thr Ala Gln Ala Gln Ala Ala Gln Ala Ala Glu
305 310 315 320
25
Thr Gln Ala Ala Gln Ala Ala Gln Ala Gln Ala Glu Ala Asn Asp Arg
325 330 335
Ala Ala Ala Gln Gln Arg Ala Ala Glu Ala Gln Ala Ala Ala Glu Gln
340 345 350
30
Ala Gln Arg Glu Ala Asp Ala Gln Ala Ala Asn Asp Ala Gln Ala Gln
355 360 365
Ala Leu Arg Glu Gln Ala Leu Thr Ala Ala Ser Ile Ala Ala Ala Ala
370 375 380
35
Leu Ile Ala Ala Ser Gln Ser Ser His Ala Thr Thr Gln Asn Pro Tyr
385 390 395 400
Pro Thr Asp Glu Asp Ala Asp Pro Thr Asp Ile Ala Asp Ile Gln Gly
405 410 415
40
Pro Thr Gln Pro Gly Thr Gly Glu Ser Gly Asp Ser Gln Ser Asn Ser
420 425 430
Ser Asp Asn Asp Ser Thr Gly Asn Asp Ser Thr Gly Ser Asp Ser Ser
435 440 445
45
Asp Ser Asp Ser Ser Gly Asn Asp Ser Ser Glu Val Ile Ser Gly Asp
450 455 460
50
Arg Ser Ala Gln Ile Glu Thr Val Ile Ala Arg Ala Met Ser Gln Leu
465 470 475 480
Gly Val Gln Tyr Ala Trp Gly Gly Gly Asn Ala Asn Gly Pro Thr Leu
485 490 495
55
Gly Ile Arg Asp Gly Gly Val Ala Asp Ser Tyr Gly Asp Tyr Asn Lys
500 505 510
Val Gly Phe Asp Cys Ser Gly Leu Thr Leu Tyr Ala Phe Ala Gly Val
515 520 525
60
Gly Ile Ser Leu Pro His Tyr Thr Gly Tyr Gln Tyr Gln His Gly Thr

65

ES 2 790 382 T3

5 Glu Ala Leu Asp Gly Arg Lys Ser Glu Ile Arg Asp Arg Val Asp Ala
 195 200 205

Leu Thr Pro Gln Glu Arg Glu Met Trp Val Ala Lys Asn Gly Pro Leu
 210 215 220

10 Asp Ile Asp Leu Thr Asp Leu Leu Gly Leu Ser Ala Ala Thr Ser Gly
 225 230 235 240

Ala Val Asp Ala Ala Leu Ser Lys Leu Gly Ser Pro Tyr Gly Trp Gly
 245 250 255

15 Gly Ile Gly Pro Asn Glu Phe Asp Cys Ser Gly Leu Ile Tyr Trp Ala
 260 265 270

20 Tyr Gln Gln Met Gly Lys Thr Leu Pro Arg Thr Ser Gln Ala Gln Met
 275 280 285

Ala Gly Gly Thr Pro Val Ser Arg Asp Glu Leu Gln Pro Gly Asp Val
 290 295 300

25 Ile Gly Tyr Tyr Pro Gly Ala Thr His Val Gly Leu Tyr Ile Gly Asp
 305 310 315 320

Gly Lys Ile Val His Ala Ser Asp Tyr Gly Ile Pro Val Gln Val Val
 325 330 335

30 Ser Val Asp Ser Ala Pro Phe Tyr Gly Ala Arg Arg Tyr
 340 345

<210> 3
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(209)
 <223> NCgl2108

<400> 3

45 Met Gly Lys His Arg Arg Asn Asn Ser Asn Ala Thr Arg Lys Ala Val
 1 5 10 15

Ala Ala Ser Ala Val Ala Leu Gly Ala Thr Ala Ala Ile Ala Ser Pro
 20 25 30

50 Ala Gln Ala Ala Glu Val Val Val Pro Gly Thr Gly Ile Ser Val Asp
 35 40 45

Ile Ala Gly Ile Glu Thr Thr Pro Gly Leu Asn Asn Val Pro Gly Ile
 50 55 60

55 Asp Gln Trp Ile Pro Ser Leu Ser Ser Gln Ala Ala Pro Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

60 Ala Ala Val Ile Asp Ala Pro Ala Ala Gln Ala Ala Pro Ala Ala Ser
 85 90 95

Thr Gly Gln Ala Ile Val Asp Ala Ala Arg Thr Lys Ile Gly Ser Pro
 100 105 110

65

ES 2 790 382 T3

5 Tyr Gly Trp Gly Ala Thr Gly Pro Asn Ala Phe Asp Cys Ser Gly Leu
115 120 125

Thr Ser Trp Ala Tyr Ser Gln Val Gly Lys Ser Ile Pro Arg Thr Ser
130 135 140

10 Gln Ala Gln Ala Ala Gln Gly Thr Pro Val Ala Tyr Ser Asp Leu Gln
145 150 155 160

Ala Gly Asp Ile Val Ala Phe Tyr Ser Gly Ala Thr His Val Gly Ile
15 165 170 175

Tyr Ser Gly His Gly Thr Val Ile His Ala Leu Asn Ser Ser Thr Pro
180 185 190

20 Leu Ser Glu His Ser Leu Asp Tyr Met Pro Phe His Ser Ala Val Arg
195 200 205

Phe

<210> 4
25 <211> 414
<212> PRT
<213> Corynebacterium

<220>
30 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(414)
<223> NCgl2986

<400> 4

35 Met Asp Glu Leu Tyr Pro Leu Ile Ile Leu Asn Met Asn Asp Gly Arg
1 5 10 15

Ser Arg Val Ser Lys Val Leu Arg Val Gly Asp Arg Ser Pro Arg Val
40 20 25 30

Ala Glu Val Arg Thr Thr Leu Ala Arg Leu Gly Val Ile Glu Gly Tyr
35 40 45

45 Ser Arg Glu Met Ser Ala Lys Thr Glu Ser Gln Lys Phe His Glu Glu
50 55 60

Glu Thr Leu Phe Asp Glu Glu Leu Ser Leu Ser Ile Lys Ser Phe Gln
65 70 75 80

50 Gln Ala Arg Gly Val Val Pro Ser Gly Leu Ile Asp Asp Pro Thr Leu
85 90 95

Arg Ala Ile Arg Glu Ala Ser Tyr Thr Leu Gly Thr Arg Val Leu Ala
100 105 110

55 Tyr Gln Pro Gly Asn Gln Leu Val Gly Asp Asp Val Val Glu Ile Gln
115 120 125

Ser His Leu Gln Glu Leu Gly Phe Tyr Ala Asp Arg Val Asp Gly His
130 135 140

60 Phe Gly Glu Leu Thr His Lys Ala Val Met Asn Tyr Gln Leu Asn Tyr

ES 2 790 382 T3

5 145 150 155 160
 Gly Met Gln Val Asp Gly Ile Cys Gly Pro Asp Thr Ile Arg Ala Leu
 165 170 175
 10 Ser Arg Leu Gly Leu Arg Ile Lys Gly Gly Ser Ala Gln Ala Ile Arg
 180 185 190
 Glu Arg Glu Arg Met Arg Asn Ala Gly Pro Arg Leu Ala Gly Lys Arg
 195 200 205
 15 Val Val Ile Asp Pro Ala Leu Gly Gly Ser Asn Lys Gly Gln Ile Val
 210 215 220
 Lys Gly Pro Tyr Gly Glu Ile Ser Glu Glu Glu Ile Leu Trp Asp Leu
 225 230 235 240
 20 Ala Thr Arg Leu Glu Gly Arg Met Ile Ala Thr Gly Met Glu Thr Ile
 245 250 255
 Leu Ser Arg Pro His Met Asp Asp Pro Ser Ser Arg Asp Arg Ala Ser
 260 265 270
 25 Ile Ala Asn Ala Phe Gly Ala Asp Leu Met Leu Ser Leu His Cys Asp
 275 280 285
 Ser Tyr Pro Asn Glu Lys Ala Asn Gly Val Ala Ser Phe Tyr Phe Gly
 290 295 300
 30 Ser Glu Asn Gly Thr Asn Ser Leu Thr Gly Glu Thr Leu Ser Ala Tyr
 305 310 315 320
 35 Ile Gln Lys Glu Ile Val Ala Arg Thr Pro Leu Asn Asn Cys Gly Ser
 325 330 335
 His Ala Arg Thr Trp Asp Leu Leu Arg Leu Thr Arg Met Pro Met Val
 340 345 350
 40 Glu Val Val Thr Gly Tyr Leu Thr Asn Pro Asp Asp Leu Ala Val Leu
 355 360 365
 Thr Asp Pro Gln Met Arg Asp His Ile Ala Glu Ala Ile Val Val Ala
 370 375 380
 45 Val Lys Arg Leu Tyr Leu Leu Asp Glu Glu Ala Gln Pro Lys Thr Gly
 385 390 395 400
 50 Thr Phe Lys Phe Ser Glu Leu Leu Gln Ser Glu Gln Ala Gly
 405 410

<210> 5
 <211> 1815
 <212> ADN
 55 <213> Corynebacterium
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1815)
 60 <223> NCgll480
 <400> 5

65

ES 2 790 382 T3

5 ttgaccaggg cgttgattgc gcttgccagta agcggagcctt tgcttagttc catgactccg 60
 gcggtggcgc agccacagaa tccggatgac gcagccattg cacaggcaga ggaaaatggt 120
 10 tcggcgggcy atggggaagt cggccgcctg gcaggatcctt tgtccagcac tgacgcggaa 180
 attaaccgcy tcgagctgga aatgggtgct ctgcgtgaag aagtgaacaa gtccctcgtg 240
 gatttgcatg atgcgcaggc aatcgccgag caggcccgcc aagatgcaact tgcagccaag 300
 15 aaggatctcg atgattctca agcgcagatc gaagcagccc aagagcgcct tgatgagatt 360
 tcacgtgcag cgtatcgcca aaacggaacc tccaaggggc tttcaggcat ctcgggcaat 420
 gaaattctg aagatgcgct agatcgtcag acttaacctg gaaccagtgc ggaaaagcag 480
 20 caggcagctg ttgaagagct tgatgcctc cgtacggaaa acgccaacaa ggaatcggtg 540
 ttgcgccagc cccgcatcgt tgctgagcag cgtgaggcgg aagccgtcga aaagcaagtc 600
 cagaccgagc ctgcaattgc cgcaaacagc gagcagctca atgtcttgac taacaatcgc 660
 25 agtaccttg ttgcccagc tgatggggct gagcgcgaact tggccatcgc tcgtgcgcag 720
 gcggataatc tgcaaggctc gcgtgctgag tacgaggaat tccagcaggc agagcaggct 780
 cgcattccagc cggaagcggg agctcaggct gctgcggagg agaagcgtcg tgccgatgag 840
 30 gctgctgcac aggcagccgc tgaagctcaa gaagctgccc agcaagctca ggcggcggag 900
 gaagcccaag ccgcgcaagc agctgagaca gcacaagccc aagccgcgca agctgcggaa 960
 35 acccaagctg cacaagccgc gcaagctcag gcagaagcga atgatcgtgc cgccgcgcaa 1020
 cagcgtgctg cagaggctca agcagcagc gaacaggcgc aacgtgaggc tgacgctcag 1080
 gcggccaacg atgcccagc tcaggcactg cgtgaacagc cgctcaccgc agcctccatc 1140
 40 gctgcccgtg ctctaattgc ggcgagccag tccagccatg ccactactca aaatccttac 1200
 ccaactgatg aagacgcgga tccgaccgat attcgggaca tccaagccc aacgcagcca 1260
 ggtacgggtg agtctggaga ttcccagagc aactccagc acaacgattc cacaggcaac 1320
 45 gattccacag gctctgactc ttcagattca gattoctccg gcaacgattc ttcagaggtt 1380
 atttccggcy atcgttccgc tcagattgag actgtgattg cgcgcgccat gagccagttg 1440
 ggtgtgcagt acgcatgggg tggcggtaac gctaattggc caactctggg tatccgtgac 1500
 50 ggtggcgtgg cggactctta cggcgattac aacaaggttg gcttcgactg ctctggactg 1560
 acctgtatg cgtttgoggg tgtgggaatt tcacttctc actacacggg ctaccagtac 1620
 cagcacggca ccaaggtgtc gccttctgag atgcaacgtg gcgatctgat cttctatggt 1680
 55 ccgggagcgt ctcagcacgt ggcaatttac ctccggtgat gtcagatgat tgaggctccg 1740
 aattcgggtt ctgtcgtgaa gatttctcct gttcgtgga gcggaatgac cgagagcgtg 1800
 60 gtacgcctca tttag 1815

<210> 6
 <211> 1050
 <212> ADN
 65 <213> Corynebacterium

ES 2 790 382 T3

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1050)
 <223> NCgl2107
 5 <400> 6

ttgaatgagg ttgatagggg atttttgaag atgtttggtc gccggtgggt gagcgttggt 60
 gcgtcatgtg ttatcgcaag cacgctgatt ctggtgcctt cgcattccgg tgcggaggaa 120
 10 gtcgatcaac tgattgctga tatcgagcat gtctctcagg aaacgtctgc ccagaatgag 180
 gaagtcaaac agcttgagat tgatattgag gctcgtgagg tcacgatcaa ggaagttcag 240
 15 gagcagtcgg taagctaccg tgaggcggct gatcaagcat cggagaatgt cgaagcttat 300
 cgttcggaga tcaatcggat cgctcaggcg aagtatcgtg gcacagtcac ggatcctttg 360
 agcattgcgg tgtctgcaga agatccacaa aacgtgattg atcggatgag ctacctttca 420
 20 acgttgacta agtccactag tgatgtggtt gaatccctca acgaggagac tgagaagtcc 480
 gcagaagctg tgtatcaagc aaaccgtact aaggcggagc cggagttcca gttggggcag 540
 ctgaaggtac gccagggcga gcttgaatct gaaaaggaag cattggatg tcgaaaatcg 600
 25 gagatccgag accgggtgga tgccctgacg ccacaggagc gggaaatgtg ggttgctaag 660
 aatggtccat tggacattga tctgactgat ttgcttggtc ttccgctgc gacttcgggt 720
 gcgggtgatg ctgccttgtc taagttggga agcccttatg gttgggggtg cattggcca 780
 30 aatgagttg attgctcagg tttgatctat tgggcgtatc agcagatggg taagactttg 840
 ccacgtacgt ctcaagctca gatggctggc ggaacgccgg tgagcagaga tgagctgcag 900
 35 cctggcgatg tcattggata ttaccaggt gctactcacg tgggactgta tattggggac 960
 ggaaagattg tgacgcctc agactacgga atccctgtgc aggtggtatc tgttgattca 1020
 gcaccgtttt atggtgcgcg tcgctactaa 1050

40 <210> 7
 <211> 630
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium

45 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(630)
 <223> NCgl2108

50 <400> 7
 gtgggtaagc accgtgcaa caattcaaac gcaactcgca aggcgtgagc agcatcgca 60
 gttgcgcttg gagcaaccgc agctatgcc tccccagcac aggcagctga ggttgttgtt 120
 55 cctggcaccg gaatcagcgt tgacatcgtt ggcacgaga ccaactccag tcttaacaac 180
 gttccaggaa tcgatcagtg gatcccttcc cttagcagcc aggcagctcc tactgcttac 240
 gcagccgtca ttgatgcacc tgcagcacag gctgcacctg cagcaagcac cggtcaggca 300
 60 atcgttgatg cagcgcgcac caagattggt tccccatacg gttgggggtc taccggtcct 360
 aacgctttcg actgetccgg ccttacctca tgggcataca gccaggttgg caagtccatc 420
 65 ccacgtacct cccaggctca ggctgcacag ggcacccttg ttgcttactc tgacctcag 480
 gctggcgaca tcgttgcggt ctactccggc gctaccacag ttggtatcta ctccggccac 540
 ggcaccgtta tccacgcact gaacagcagc acccctctgt ctgagcactc cttggattac 600
 atgccattcc actctgcagt tcgtttctaa 630

ES 2 790 382 T3

5
 <210> 8
 <211> 1245
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium

10
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1245)
 <223> NCgl2986

15
 <400> 8

gtggatgaac tatatccatt gataatTTTg aacatgaatg atggaaggag cagggTgtct 60
 aaagtCctga gagTtggcga tgcgagcccg cgcgtggcag aagtgcgcac tacgctcgtc 120
 cgcctcggTg tgattgaagg ctattccagg gagatgtctg caaagacaga atcccagaag 180
 ttccacgaag aagagacgct tttcgacgaa gaactcagcc tcagcatcaa gtcattccag 240
 caagctcagag gagtcgttcc ctccgggctt attgacgacc ccaccctgcg cgcaatccgc 300
 gaagcctcct acaccctggg aaccgcgctg ctggcctacc agcccggcaa ccagcttgtt 360
 ggtgacgacg ttgtagaaat ccaatcccat ctccaagagc tcggcttcta cgccgaccgt 420
 gtggatggac atTTTtggcga gctcacacac aaagctgtga tgaactacca actcaactac 480
 ggcatgcagg tagacggcat ctgtggccct gacaccatcc gtgcgctgtc ccgacttggT 540
 ctgcgcatca agggTggctc tgctcaagct atccgtgaac gcgaacgcat gcgcaatgca 600
 ggcccacgTc ttgctggcaa gcgtgtggTc attgatcctg cgcttggggg ctccaacaag 660
 ggtcagatcg tgaaaggccc ctacggtgag atctctgagg aagaaatcct ctgggatttg 720
 gccacccgcc tggaaggTcg catgatcgca acaggcatgg aaaccattct gtcgcgcccg 780
 cacatggatg atcccagcag ccgtgatcgc gcgtcgatcg cgaatgcttt cggcgctgac 840
 ctcatgctga gcctgcactg cgattcctac ccgaatgaaa aagctaacgg cgtggccagc 900
 ttctacttcg gttcggaaaa cggcaccaac tccttgaccg gtgaaacgct ctccgcgtac 960
 atccaaaaag agatcgttgc ccgcacccca ctgaacaact gtggcagcca tgccogtacc 1020
 tgggatctgc tgccgctcac gcgcatgccc atggtggaag ttgtcaccgg ttacctacc 1080
 aaccccgatg acctggcagt tctgactgat ccacaaatgc gtgatcacat tgccgaagcc 1140
 atcgttgtcg ccgtcaagcg cctgtacctc cttgatgagg aagcacagcc caagaccgga 1200
 accttcaagt tctctgagct gttgcaatca gagcaggctg gctaa 1245

55
 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Cebador del kit

65
 <400> 9
 acctacaaca aagctctcat caacc 25

<210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador del kit

 <400> 10
 ctaccctgtg gaacacctac atct 24
 10
 <210> 11
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador para NCgl1480

 <400> 11
 20 ccgggatcc tctagaacct tgaaactcc actc 34

 <210> 12
 <211> 36
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para NCgl1480
 30
 <400> 12
 ctctgacga actatttcaa atcccctatc aacctc 36

 <210> 13
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador para NCgl1480
 40
 <400> 13
 caccgaggta aattgccatg caagcgcaat caacgc 36

 <210> 14
 <211> 34
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Cebador para NCgl1480

 <400> 14
 gcaggtcgac tctagaaacc acacattatc gatc 34
 55
 <210> 15
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador para NCgl2107

 <400> 15
 65 ccgggatcc tctagagcac agggcacccc tggg 35

 <210> 16

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

5 <220>
 <223> Cebador para NCgl2107

<400> 16
 ctctgacga actatttcaa atcccctatc aacctc 36

10 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador para NCgl2107

20 <400> 17
 gaggttgata ggggattga aatagttcgt caggag 36

<210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para NCgl2107

30 <400> 18
 gcaggtcgac tctagaaacc acacattatc gatc 34

<210> 19
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para NCgl2108

40 <400> 19
 ccgggatcc tctagagaac ccttagtagt tggg 34

<210> 20
 <211> 36
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Cebador para NCgl2108

<400> 20
 gtaatccaag gagtgctcac cactgatga aactcc 36

<210> 21
 <211> 36
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 60 <223> Cebador para NCgl2108

<400> 21
 ggagtttcat cagtgggtga gcactccttg gattac 36

65 <210> 22

<211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador para NCgl2108

<400> 22
 gcaggtcgac tctagacgag cctcaatc aatc 34

10 <210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador para NCgl2986

<400> 23
 ccgggatcc tctagattag gagaaacct gaggc 34

<210> 24
 <211> 36
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para NCgl2986

30 <400> 24
 atcagtcaga actgccagga ctgcagtaag aatacc 36

<210> 25
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador para NCgl2986

40 <400> 25
 ggtattccta ctgcagtcct ggcagttctg actgat 36

<210> 26
 <211> 34
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Cebador para NCgl2986

<400> 26
 gcaggtcgac tctagagtg aggcgfttgg atac 34

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una mayor productividad de L-lisina en comparación con un microorganismo sin modificar, el cual se modifica de manera que la actividad de una proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular se inactiva en comparación con la actividad endógena de esta.
- 10 2. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la proteína que participa en la hidrólisis de la pared celular es al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 4.
3. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
- 15 4. Un método para preparar L-lisina, que comprende:
 - (i) cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un medio; y
 - (ii) recuperar la L-lisina del medio de cultivo o del microorganismo.