

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 437**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/77** (2006.01)

**C12P 13/08** (2006.01)

**C12R 1/15** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2016 PCT/KR2016/008231**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17034164**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2016 E 16839454 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3342869**

54 Título: **Microorganismo del género corynebacterium para producir l-aminoácido y método para producir l-aminoácido usando el mismo**

30 Prioridad:

**27.08.2015 KR 20150120871**

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

**23.11.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BYUN, HYO JEONG;  
CHUNG, YOON HEE;  
KIM, HYUNG JOON;  
LEE, SUN YOUNG;  
NAM, HYUN KOO;  
PARK, SUN MI y  
LEE, SANG MOK**

74 Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester**

**ES 2 795 437 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 del género *Corynebacterium* para producir l-aminoácido y método para producir l-aminoácido usando el mismo

5

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* productor de L-lisina y a un método para producir L-lisina mediante el uso del mismo.

10

[Antecedentes de la Técnica]

La L-lisina, un tipo de aminoácido esencial, se usa en las industrias de alimentación animal, farmacéutica, y cosmética humana, y se produce por fermentación mediante el uso de un microorganismo del género *Corynebacterium* o del género *Escherichia*.

15

Una cepa del género *Corynebacterium*, particularmente, el *Corynebacterium glutamicum*, es un microorganismo grampositivo que se usa ampliamente para producir L-aminoácidos. Para la producción de L-lisina, principalmente se han usado enfoques de direccionamiento específicos, tales como la potenciación de la expresión de genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de L-lisina en una cepa del género *Corynebacterium*, o la eliminación de genes innecesarios para la biosíntesis de L-lisina. Además de estos métodos, se han usado, además, un método para eliminar genes que no están involucrados en la biosíntesis de L-lisina, o un método para eliminar genes cuya función específica es desconocida.

20

Por consiguiente, los presentes inventores han conducido extensos estudios para identificar las características efectivas capaces de aumentar la productividad de lisina. Como resultado, los presentes inventores examinaron un microorganismo que produce una alta concentración de L-lisina mediante la disrupción aleatoria de los genes endógenos de un microorganismo del género *Corynebacterium*, y descubrieron que cuando un gen cuya función aún no se ha informado, se interrumpe en el microorganismo examinado, aumenta la productividad de la L-lisina del microorganismo, por consiguiente se completa la presente invención.

25

30

Documentos de la Técnica Anterior

(Documento de patente 1) KR 10-0838035 B1 (publicado el 12 de junio de 2008).

35

[Descripción]

[Problema Técnico]

Es un objeto de la presente invención proporcionar un microorganismo productor de L-lisina del género *Corynebacterium*.

40

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir L-lisina mediante el uso del microorganismo.

45

[Solución técnica]

Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona un microorganismo productor de L-lisina del género *Corynebacterium* en donde una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 está inactivada.

50

La presente invención proporciona, además, un método para producir L-lisina, que comprende las etapas de: cultivar el microorganismo de la presente invención en un medio; y recuperar L-lisina del microorganismo o del medio.

55

[Efectos Ventajosos]

La presente invención proporciona un microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* que tiene una productividad incrementada de L-lisina, que se obtiene mediante la inactivación de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, cuya función es desconocida, en un microorganismo del género *Corynebacterium* productor de L-lisina. El microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* puede producir L-lisina con alto rendimiento y, por lo tanto, es industrialmente útil para la producción de L-lisina.

60

[Modo para la invención]

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle.

65

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un microorganismo productor de L-lisina del género *Corynebacterium* en donde una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 está inactivada.

5 La proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 es una proteína endógena en un microorganismo del género *Corynebacterium*, o una proteína hipotética en además de proteína desconocida.

Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente al menos 95 %, de manera particular específicamente al menos 97 %, con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, puede incluirse, además, en el alcance de la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Además, es obvio que una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, modificación, sustitución o delección de uno o varios aminoácidos se incluye, además, en el alcance de la presente invención, siempre que tenga una secuencia que tiene homología con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y tiene una actividad biológica sustancialmente igual o similar a la de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Cualquier secuencia de nucleótidos capaz de codificar la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se incluye en el alcance de la presente invención. Específicamente, el gen que codifica la proteína de la SEQ ID NO: 1 puede tener una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. Además, una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente 95 %, de manera particular específicamente 97 %, con respecto a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, puede incluirse, además, en el alcance de la presente invención. Además, las variantes de la secuencia, que codifican el mismo aminoácido debido a la degeneración del código genético, pueden incluirse, además, en el alcance de la presente invención.

25 Como se usa en la presente descripción, el término "homología" se refiere a la identidad de una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos dada y puede expresarse como porcentaje. En la descripción, una secuencia homóloga que tiene una actividad igual o similar a una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos dada se expresa como "% de homología".

30 La homología de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos puede determinarse mediante el uso de, por ejemplo, el algoritmo BLAST (ver Karlin y Altschul, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)) o FASTA de Pearson (ver Methods Enzymol., 183, 63 (1990)). Los programas llamados BLASTN y BLASTX se han desarrollado sobre la base de este algoritmo BLAST (ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

35 Como se usa en la presente descripción, el término "inactivación" significa que la expresión de un gen endógeno se reduce en comparación con la de una cepa parental, una cepa antes de la modificación o una cepa de tipo silvestre, o el gen no se expresa, o el gen no tiene actividad o tiene actividad reducida aun cuando se exprese. En la presente invención, la inactivación puede lograrse mediante cualquier método de inactivación conocido en la técnica. En la presente invención, el método de inactivación puede realizarse mediante al menos una mutación seleccionada del grupo que consiste en una mutación de inserción que se obtiene mediante la inserción de al menos un par de bases en el gen, una mutación de delección que se obtiene mediante la delección de al menos un par de bases del gen, y una mutación de transición o transversión de pares de bases que se obtiene mediante la introducción de un codón sin sentido en el gen. Alternativamente, el método de inactivación puede realizarse mediante la sustitución del promotor endógeno del gen con un promotor más débil o mediante la delección de todo el gen o de una parte del gen, pero el alcance de la presente invención no se limita a ello.

El método de disrupción génica que se usa en la presente invención puede ser cualquier método de disrupción génica conocido en la técnica y no se limita a un método particular. Por ejemplo, puede usarse luz, tal como luz UV, o una sustancia química para inducir mutaciones, y puede seleccionarse una cepa con un gen diana interrumpido a partir de los mutantes resultantes. Además, el método de disrupción génica puede realizarse, por ejemplo, mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos o un vector, que comprende una secuencia de nucleótidos homóloga al gen diana, en el microorganismo, por lo que de esta manera se induce la recombinación homóloga. Además, la secuencia de nucleótidos o el vector introducido puede comprender un marcador de selección dominante.

55 Los ejemplos de un vector que puede usarse para inactivar la proteína diana incluyen plásmidos, cósmidos, virus, y bacteriófagos naturales o recombinantes. Por ejemplo, el vector de fago o el vector de cósmido que se usa en la presente invención puede ser pWE15, M13, λEMBL3, λEMBL4, λFIXII, λDASHII, λZAPII, λgt10, λgt11, Charon4A, Charon21A o similares, y el vector plasmídico que se usa en la presente invención puede ser de tipo pDZ, de tipo pBR, de tipo pUC, de tipo pBluescriptII, de tipo pGEM, de tipo pTZ, de tipo pCL, de tipo pET o similares. Un vector que puede usarse en la presente invención no se limita particularmente, y puede ser un vector de expresión conocido en la técnica.

La introducción del vector puede realizarse fácilmente de acuerdo con cualquier método convencional conocido en la técnica. Generalmente, los ejemplos de este método incluyen un método de precipitación de CaCl<sub>2</sub>, el método de Hanahan con una eficiencia mejorada mediante el uso de sulfóxido de dimetilo (DMSO) como un agente reductor en el método de precipitación de CaCl<sub>2</sub>, electroporación, un método de precipitación de fosfato de calcio, un método de fusión

de protoplastos, un método de agitación mediante el uso de fibra de carburo de silicio, un método de transformación mediante el uso de PEG, transformaciones mediadas por sulfato de dextrano, lipofectamina y supresión/seco, etcétera. Como se usa en la presente descripción, el término "transformación" significa introducir un vector que comprende un polinucleótido que codifica una proteína diana en una célula huésped para permitir que el polinucleótido se exprese o inactíve en la célula huésped. El polinucleótido puede incluir ADN y ARN, que codifican la proteína diana, o un promotor que reduce la expresión de la proteína diana, o un gen marcador capaz de inactivar la expresión de la proteína diana, etcétera. Siempre que el polinucleótido pueda introducirse en la célula huésped y se exprese en ella, puede introducirse de cualquier forma.

Como una cepa parental en donde la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 debe inactivarse, cualquier microorganismo que tenga productividad de L-lisina puede usarse sin limitación. Los ejemplos de este microorganismo incluyen microorganismos que pertenecen al género *Corynebacterium*, el género *Brevibacterium*, el género *Escherichia*, el género *Enterbacter*, el género *Erwinia*, el género *Serratia* y el género *Providencia*. Específicamente, puede usarse un microorganismo del género *Corynebacterium*, y más específicamente, puede usarse un microorganismo *Corynebacterium glutamicum*.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "microorganismo que tiene productividad de L-lisina" se refiere a un microorganismo que se obtiene mediante la manipulación de un gen generalmente conocido para que sea capaz de producir L-lisina. Por ejemplo, el microorganismo puede ser un microorganismo que se obtiene mediante la potenciación de la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en genes implicados en la biosíntesis de L-lisina, que incluyen *aspB* (gen que codifica la aspartato aminotransferasa), *lysC* (gen que codifica la aspartato quinasa), *asd* (gen que codifica la aspartato semialdehído deshidrogenasa), *dapA* (gen que codifica la dihidrodipicolinato sintasa), *dapB* (gen que codifica la dihidrodipicolinato reductasa) y *lysA* (gen que codifica la diaminodipimelato descarboxilasa), que son endógenos en un microorganismo del género *Corynebacterium* y están involucrados en la producción de L-aminoácidos. Además, el microorganismo puede ser un microorganismo que se obtiene mediante el tratamiento de una cepa mutante auxotrófica de L-leucina con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir L-lisina, que comprende las etapas de: cultivar el microorganismo de la presente invención en un medio; y recuperar L-lisina del microorganismo o del medio.

El microorganismo de la presente invención es como se describió anteriormente.

En el método de la presente invención, el cultivo de un microorganismo del género *Corynebacterium* puede realizarse mediante el uso de cualquiera de las condiciones de cultivo y método de cultivo conocido en la técnica.

Por ejemplo, un medio que puede usarse para el cultivo de un microorganismo del género *Corynebacterium* se describe en el Manual de Métodos para Bacteriología General de la Sociedad Estadounidense de Bacteriología (Washington D.C., EE.UU., 1981).

Las fuentes de azúcar que pueden usarse en el medio incluyen azúcares y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón o celulosa; aceites y grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino o aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico o ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol o etanol; y ácidos orgánicos tales como el ácido acético. Estas sustancias pueden usarse individualmente o como una mezcla, y el alcance de la presente invención no se limita a ello.

Las fuentes de nitrógeno que pueden usarse incluyen compuestos que contienen nitrógeno orgánico, tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno, además, pueden usarse individualmente o como una mezcla, y el alcance de la presente invención no se limita a ello.

Las fuentes de fósforo que pueden usarse incluyen dihidrógeno fosfato de potasio o hidrógeno fosfato de dipotasio o las sales de sodio correspondientes. El medio de cultivo, además, puede contener sales de metales tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarios para el crecimiento. Finalmente, pueden usarse sustancias de crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas además de las sustancias mencionadas anteriormente. Además, pueden añadirse precursores adecuados al medio de cultivo. Dichas sustancias pueden añadirse al cultivo en forma de lotes o de manera continua mediante un método adecuado durante el cultivo.

El pH del medio de cultivo puede controlarse mediante el uso de compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o amoniaco acuoso o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico de una manera adecuada. La formación de espuma puede controlarse mediante el uso de agentes antiespumantes tales como los ésteres de poliglicol de ácidos grasos. Las condiciones aeróbicas pueden mantenerse mediante la introducción de oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno (por ejemplo, aire) en el cultivo. La temperatura de cultivo es generalmente de 20 °C a 45 °C, específicamente de 25 °C a 40 °C. El cultivo puede continuar hasta que la cantidad de L-lisina producida alcance el nivel conveniente. Específicamente, el tiempo de cultivo es de 10 a 160 horas.

En el método de la presente invención, el cultivo puede realizarse continuamente o en un proceso por lotes o en un proceso por lotes alimentado o en un proceso por lotes alimentado repetido. Este cultivo puede realizarse mediante el uso de cualquier método bien conocido en la técnica.

La L-lisina puede aislarse y analizarse mediante cromatografía de intercambio aniónico con posterior derivación de ninhidrina. Además, el método de la presente invención comprende una etapa de recuperación de L-lisina. Un método para recuperar L-lisina del microorganismo o del medio de cultivo es bien conocido en la técnica. Los ejemplos de un método que puede usarse para recuperar L-lisina incluyen, pero no se limitan a, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización y HPLC.

En lo sucesivo, la presente descripción se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

### Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de una Biblioteca de Mutantes Aleatorios mediante el uso de Transposón

Para obtener una cepa con una mayor productividad de L-lisina, se construyó una biblioteca de vectores de la siguiente manera.

Primero, mediante el uso de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (este microorganismo se describe como KFCC10881, y se volvió a depositar con una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest con el número de acceso KCCM11016P; Patente de Corea Núm. 10-0159812) como una cepa parental, los plásmidos que se obtienen mediante el uso del kit EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre) se transformaron en la cepa parental mediante un método de pulso eléctrico (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545). Después, la cepa se amplificó en una placa de medio complejo que contenía kanamicina (25 mg/L), de esa manera se obtienen aproximadamente 20 000 colonias.

Placa de medio complejo (pH 7,0):

glucosa 10 g, peptona 10 g, extracto de carne de res 5 g, extracto de levadura 5 g, infusión de cerebro y corazón 18,5 g, NaCl 2,5 g, urea 2 g, sorbitol 91 g y agar 20 g (por litro de agua destilada).

Ejemplo 2: Tamizaje Aleatorio de la Biblioteca de Mutantes mediante el uso de Transposón

Cada una de las aproximadamente 20 000 colonias que se obtuvieron en el Ejemplo 1 se inoculó en 300 μL del siguiente medio selectivo y se cultivó en una placa de 96 pocillos de profundidad a 32 °C a 1000 rpm durante aproximadamente 24 horas.

Medio selectivo (pH 8,0):

glucosa 10 g, sulfato de amonio 5,5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,8 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16,4 g, biotina 100 μg, tiamina HCl 1000 μg, pantotenato de calcio 2000 μg y nicotinamida 2000 μg (por litro de agua destilada).

Para analizar la cantidad de L-lisina producida en el cultivo, se usó el método de ninhidrina (Moore, S., Stein, W. H., Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. Biol. Chem. 1948, 176, 367-388).

Después de completar el cultivo, se hicieron reaccionar 10 μl del sobrenadante del cultivo con 190 μl de una solución de reacción de ninhidrina a 65 °C durante 30 minutos, y después se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con un espectrofotómetro. En base a los resultados de la medición, se seleccionaron como cepas mutantes aproximadamente 60 colonias que mostraban una absorbancia más alta que la cepa KCCM11016P de *Corynebacterium glutamicum* usada como control. Otras colonias mostraron una absorbancia similar o inferior a la de la cepa KCCM11016P de *Corynebacterium glutamicum* usada como el control.

Aproximadamente 60 cepas seleccionadas como se describió anteriormente se cultivaron nuevamente de la misma manera como se describió anteriormente, y después se sometieron a la reacción de ninhidrina. Como resultado, se seleccionaron las diez cepas mutantes principales que tienen una mayor productividad de L-lisina en comparación con la cepa KCCM11016P de *Corynebacterium glutamicum* usada como cepa parental.

Ejemplo 3: Análisis de la Productividad de L-lisina de las Cepas Mutantes Aleatorias Seleccionadas

Con el objetivo de seleccionar finalmente las cepas cuya productividad de L-lisina se incrementó de forma reproducible a partir de los diez mutantes seleccionados en el Ejemplo 2, se realizó el cultivo en frasco mediante el uso del siguiente

medio. Después de completar el cultivo, la concentración de L-lisina en el cultivo se analizó por HPLC. La concentración de L-lisina producida por cada una de las cepas mutantes se muestra en la Tabla 1 más abajo.

Medio del cultivo semilla (pH 7,0):

glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, biotina 100  $\mu\text{g}$ , tiamina HCl 1000  $\mu\text{g}$ , pantotenato de calcio 2000  $\mu\text{g}$  y nicotinamida 2000  $\mu\text{g}$  (por litro de agua destilada).

Medio de producción (pH 7,0):

glucosa 100 g, proteína de soja 40 g ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sólidos impregnados de licor de maíz 2,5 g, 5 g, urea 3 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g, biotina 100  $\mu\text{g}$ , cloruro de tiamina 1000  $\mu\text{g}$ , pantotenato de calcio 2000  $\mu\text{g}$ , nicotinamida 3000  $\mu\text{g}$ , y  $\text{CaCO}_3$  30 g (por litro de agua destilada).

Tabla 1: Concentraciones de L-lisina producidas por 10 Cepas Mutantes Aleatorias Seleccionadas

|         | Cepa             | L-lisina (g/L) |        |        |        |
|---------|------------------|----------------|--------|--------|--------|
|         |                  | Lote 1         | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 |
| Control | KCCM11016P       | 42,9           | 42,5   | 42,4   | 42,6   |
| 1       | KCCM11016P/mt-1  | 43,2           | 43,6   | 43,8   | 43,5   |
| 2       | KCCM11016P/mt-2  | 43,0           | 43,1   | 43,4   | 43,2   |
| 3       | KCCM11016P/mt-3  | 42,6           | 42,8   | 42,9   | 42,8   |
| 4       | KCCM11016P/mt-4  | 43,1           | 42,8   | 42,9   | 42,9   |
| 5       | KCCM11016P/mt-5  | 43,0           | 42,9   | 42,7   | 42,9   |
| 6       | KCCM11016P/mt-6  | 41,0           | 41,7   | 41,6   | 41,4   |
| 7       | KCCM11016P/mt-7  | 43,2           | 42,8   | 42,7   | 42,9   |
| 8       | KCCM11016P/mt-8  | 53,2           | 53,1   | 53     | 53,1   |
| 9       | KCCM11016P/mt-9  | 42,7           | 42,5   | 42     | 42,4   |
| 10      | KCCM11016P/mt-10 | 48,9           | 48,2   | 48,5   | 48,5   |

Entre las 10 cepas mutantes seleccionadas, finalmente se seleccionó KCCM11016P/mt-10 como una cepa cuya productividad de L-lisina aumentó significativamente.

Ejemplo 4: Identificación de las Causas de Aumento de la Productividad de L-lisina de la Cepa Seleccionada Finalmente

En este Ejemplo, se realizó un experimento en la cepa mutante seleccionada finalmente en el Ejemplo 3 para identificar la disrupción de genes mediante la inserción aleatoria del transposón.

El ADN genómico se extrajo a partir de KCCM11016P/mt-10, se digirió y después se ligó, y el producto de la ligazón se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las células de *E. coli* transformadas se plaquearon en un medio LB sólido que contenía kanamicina (25 mg/L). Se seleccionaron veinte colonias transformadas, y después se obtuvieron los plásmidos que contenían una porción de gen desconocida. Se realizó la secuenciación mediante el uso del cebador 1 (SEQ ID NO: 3) y el cebador 2 (SEQ ID NO: 4) del kit EZ-Tn5™ <R6K $\gamma$ ori/KAN-2>Tnp Transposome™. Como resultado, en base a las secuencias de nucleótidos registradas en el NIH Genbank, pudo verse que el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 estaba inactivado.

Cebador 1 (SEQ ID NO: 3): ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC;  
Cebador 2 (SEQ ID NO: 4): CTACCCTGTGGAACACCTACATCT.

Ejemplo 5: Construcción del Vector para la Disrupción del Gen que Comprende la Secuencia de Nucleótidos de la SEQ ID NO: 2

Para la construcción de un vector recombinante capaz de interrumpir el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 (identificada en el Ejemplo 4) en el cromosoma de la cepa del género *Corynebacterium*, se sintetizaron los cebadores 3 a 6 para construir un fragmento para la disrupción del gen y se muestran en la Tabla 2 más abajo.

5

Tabla 2: Cebadores 3 a 6 para construir fragmentos para la interrupción del gen

10

15

| Gen        | Cebadores usados         | Secuencias de nucleótidos             |
|------------|--------------------------|---------------------------------------|
| SEQ ID NO. | Cebador 3 (SEQ ID NO: 5) | CGCTCTAGATTTTCATGTCTGCCTCAAGC         |
|            | Cebador 4 (SEQ ID NO: 6) | TACTGGTGACAACTAGTCGGACTCACACCAGAGAAA  |
|            | Cebador 5 (SEQ ID NO: 7) | GGTGTGAGTCCGACTAGTTTGTCCACAGTATCGCACT |
|            | Cebador 6 (SEQ ID NO: 8) | CGCTCTAGACGCTGATAACGATGAGGTC          |

20

25

30

Para eliminar la región ORF, el cebador 3 (SEQ ID NO: 5), el cebador 4 (SEQ ID NO: 6), el cebador 5 (SEQ ID NO: 7) y el cebador 6 (SEQ ID NO: 8) (Tabla 2) se sintetizaron en base a la SEQ ID NO: 2. Mediante el uso de los cebadores sintetizados, se realizó la PCR [Sambrook y otros, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] mediante el uso del ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 de tipo silvestre, como un molde. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN que comprende una región aguas arriba de 364 pb y una región aguas abajo de 375 pb, que corresponden al gen que codifica la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. La PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización previa a 95 °C durante 5 min, y después 30 ciclos, cada uno de los cuales consiste en desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 56 °C durante 30 segundos, y polimerización a 72 °C durante 1 min; seguido de polimerización a 72 °C durante 7 min. Un vector pDZ (patente coreana núm. 10-0924065), que no se replica en *Corynebacterium glutamicum*, y el fragmento amplificado por PCR, se trataron con la enzima de restricción XbaI, y después se ligaron mediante el uso de la ADN ligasa. El producto de la ligazón se transformó en *E. coli* DH5 $\alpha$  que después se plaquearon en un medio LB sólido que contenía kanamicina (25 mg/L).

35

Una colonia transformada con un plásmido que tenía el gen deseado insertado en ella se seleccionó por PCR, y después el plásmido se aisló mediante el uso de una técnica de extracción de plásmido. El plásmido se denominó "pDZ- $\Delta$ MT10DS1".

40

Ejemplo 6: Construcción de la Cepa mediante Interrupción del Gen que Comprende la Secuencia de Nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y Evaluación de la Productividad de L-lisina de la Cepa Construida

El plásmido recombinante pDZ- $\Delta$ MT10DS1 construido en el Ejemplo 5 se transformó en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, que es una cepa productora de L-lisina, mediante recombinación homóloga en el cromosoma (van der Rest y otros, Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999).

45

A continuación, el transformante se cultivó en un medio de placa de agar que contenía 4 % de sacarosa para permitir que tuviera lugar una segunda recombinación homóloga. Después de completar la segunda recombinación homóloga, la interrupción del gen de la SEQ ID NO: 2 en el cromosoma de la cepa transformada de *Corynebacterium glutamicum* se confirmó por PCR mediante el uso del cebador 3 y del cebador 6. La cepa recombinante se denominó "*Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P- $\Delta$ MT10DS1".

50

Para analizar la productividad de L-lisina de la cepa construida *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P- $\Delta$ MT10DS1, la cepa construida junto con la cepa parental *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P se cultivaron de la siguiente manera.

55

Cada una de la cepa parental de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y la cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P- $\Delta$ MT10DS1 construida en el Ejemplo 6 se inocularon en un frasco con deflector de esquina de 250 mL que contiene 25 mL de medio del cultivo semilla siguiente, y se cultivaron con agitación a 200 rpm, a 30 °C durante 20 horas. A continuación, se inoculó 1 mL de cada uno de los cultivos semillas en un frasco con deflector de esquina de 250 ml que contenía 24 mL del siguiente medio de producción y se cultivó con agitación a 200 rpm, a 30 °C durante 72 horas. La composición del medio del cultivo semilla y la composición del medio de producción fueron las siguientes.

60

Medio del cultivo semilla (pH 7,0):

glucosa 20 g, peptona 10 g, extracto de levadura 5 g, urea 1,5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, biotina 100  $\mu$ g, tiamina HCl 1000  $\mu$ g, pantotenato de calcio 2000  $\mu$ g, y nicotinamida 2000  $\mu$ g (por litro de agua destilada).

65

Medio de producción (pH 7,0):

glucosa 100 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 g, proteína de soja 2,5 g, sólidos impregnados de licor de maíz 5 g, urea 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, biotina 100 µg, tiamina HCl 1000 µ, pantotenato de calcio 2000 µg, nicotinamida 3000 µg, y CaCO<sub>3</sub> 30 g (por litro de agua destilada).

Después de completar el cultivo, la cantidad de L-lisina producida se midió mediante HPLC (Waters 2478), y la concentración de L-lisina analizada se muestra en la Tabla 3 más abajo.

Tabla 3: Análisis de la productividad de L-lisina de KCCM11016P-ΔMT10DS1 derivada de KCCM11016P

|                 | Cepa                | L-lisina (g/L) |        |        |          |
|-----------------|---------------------|----------------|--------|--------|----------|
|                 |                     | Lote 1         | Lote 2 | Lote 3 | Promedio |
| Grupo Control   | KCCM11016P          | 41,2           | 41,7   | 41,8   | 41,6     |
| Grupo de Prueba | KCCM11016P-ΔMT10DS1 | 49,4           | 49,6   | 50     | 49,7     |

A partir de los resultados en la Tabla 3 anterior, se demostró que cuando el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpió en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, que es una cepa productora de L-lisina, la productividad de L-lisina de la cepa recombinante aumentó en un 19 % en promedio en comparación con la de la cepa parental.

Por lo tanto, se demostró que la productividad de L-lisina del microorganismo del género *Corynebacterium* podría incrementarse mediante la disrupción del gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en el microorganismo.

A partir de los resultados descritos anteriormente, se observó que la inactivación de una proteína hipotética con una función desconocida mediante la disrupción del gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en la cepa productora de L-lisina, fue eficaz para aumentar la productividad de L-lisina de la cepa. La cepa KCCM11016P-ΔMT10DS1 se denominó "CA01-2285" y se depositó internacionalmente en el Centro de Microorganismos de Cultivo de Corea (KCCM) el 5 de diciembre de 2014 con el número de acceso KCCM11626P.

Ejemplo 7: Construcción de la cepa mediante la Disrupción del Gen que Comprende la Secuencia de Nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P y Evaluación de la Productividad de L-lisina de la Cepa Construida

Para examinar otras cepas de *Corynebacterium glutamicum* productoras de L-lisina que además tienen el mismo efecto como se describió anteriormente, se construyó una cepa en donde el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpió, a partir de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P productora de L-lisina (este microorganismo se describió como KFCC10750, y se volvió a depositar en una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest con el número de acceso KCCM11347P; Patente de Corea núm. 10-0073610) de acuerdo con el mismo método como se describe en el Ejemplo 6. La cepa construida se denominó "KCCM11347P-ΔMT10DS1".

La cepa construida se cultivó de la misma manera como se describe en el Ejemplo 6. Después de completar el cultivo, la cantidad de L-lisina producida se midió por HPLC (Waters 2478), y la concentración de L-lisina analizada se muestra en la Tabla 4 más abajo.

Tabla 4: Análisis de la productividad de L-lisina de KCCM11347P-MT8EH derivada de KCCM11347P

|                 | Cepa                | L-lisina (g/L) |        |        |        |
|-----------------|---------------------|----------------|--------|--------|--------|
|                 |                     | Lote 1         | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 |
| Grupo control   | KCCM11347P          | 37,9           | 38,1   | 37,9   | 38,0   |
| Grupo de prueba | KCCM11347P-ΔMT10DS1 | 45,9           | 45,7   | 45,6   | 45,7   |

A partir de los resultados en la Tabla 4 anterior, se demostró que cuando el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpe en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P, que es una cepa productora de L-lisina, la productividad de L-lisina de la cepa aumentó en 20 % en promedio.

Por lo tanto, de manera similar a los resultados del Ejemplo 6, se demostró que la productividad de L-lisina del microorganismo del género *Corynebacterium* podría incrementarse mediante la disrupción del gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en el microorganismo.

5 Ejemplo 8: Construcción de la Cepa mediante la Disrupción del Gen que Comprende la Secuencia de Nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en *Corynebacterium glutamicum* CJ3P y Evaluación de la Productividad de L-Lisina de la Cepa Construida

10 Para examinar si otras cepas de *Corynebacterium glutamicum* productoras de L-lisina también tienen el mismo efecto como se describió anteriormente, una cepa en donde el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpió se construyó a partir de *Corynebacterium glutamicum* CJ3P productora de L-lisina (Binder y otros, Genome Biology 2012, 13:R40), que se obtiene mediante la introducción de tres mutaciones [pyc(P458S), hom(V59A) y lysC(T311I)] en una cepa de tipo silvestre, de acuerdo con el mismo método como se describe en el Ejemplo 6. La cepa construida se denominó "CJ3P-ΔMT10DS1".

15 La cepa construida se cultivó de la misma manera como se describe en el Ejemplo 6. Después de completar el cultivo, la cantidad de L-lisina producida se midió por HPLC (Waters 2478), y la concentración de L-lisina analizada se muestra en la Tabla 5 a continuación.

20 Tabla 5: Productividad de L-lisina de CJ3P-ΔMT10DS1 derivada de CJ3P

|                 | Cepa          | L-lisina (g/L) |        |        |        |
|-----------------|---------------|----------------|--------|--------|--------|
|                 |               | Lote 1         | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 |
| Grupo control   | CJ3P          | 8,2            | 8,1    | 8,4    | 8,2    |
| Grupo de prueba | CJ3P-ΔMT10DS1 | 9,5            | 9,6    | 9,7    | 9,6    |

30 A partir de los resultados en la Tabla 5 anterior, se demostró que cuando el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpe en *Corynebacterium glutamicum* CJ3P, que es una cepa productora de L-lisina, la productividad de L-lisina de la cepa aumentó en 17 %, en promedio.

35 Por lo tanto, de manera similar a los resultados de los Ejemplos 6 y 7, se demostró que la productividad de L-lisina del microorganismo del género *Corynebacterium* podría incrementarse mediante la disrupción del gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en el microorganismo.

Número de acceso

40 Nombre de la institución depositaria: Centro de Microorganismos de Cultivo Coreano;  
 Número de Acceso: KCCM11626P;  
 Fecha de depósito: 5 de diciembre de 2015.

|   |                  |                              |
|---|------------------|------------------------------|
| Solicitante o agente<br>referencia de archivo | <b>PP16-0104</b> | Solicitud internacional Núm. |
|---|------------------|------------------------------|

50 INDICACIONES RELACIONADAS CON MICROORGANISMOS DEPOSITADOS U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO  
 (Regla 13 del PCT *bis*)

|    |   |
|----|---|
| 55 | <b>A.</b> Las indicaciones que se hacen más abajo se refieren al microorganismo depositado u otro material biológico mencionado en la descripción en la página <u>12</u> , línea <u>34</u> .  |
| 60 | <b>B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO</b> Los depósitos adicionales se identifican en una hoja<br>Nombre de la institución depositaria<br><b>Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano</b><br>Dirección de la institución depositaria ( <i>que incluye el código postal y el país</i> )<br>Yurim Bldg, 45, Hongjjenae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, 120-861, Corea |

5

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Fecha de depósito<br><b>5 de diciembre de 2015</b>   | Número de acceso<br><b>KCCM11626P</b> |
| <b>C. INDICACIONES ADICIONALES</b> ( <i>dejar en blanco si no corresponde</i> ) Esta información prosigue en una hoja adicional <input type="checkbox"/>   |                                       |
|  |                                       |
| <b>D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HACEN INDICACIONES</b> ( <i>si las indicaciones no son para todos los Estados designados</i> )  |                                       |
|  |                                       |
| <b>E. PROVISIÓN SEPARADA DE LAS INDICACIONES</b> ( <i>dejar en blanco si no corresponde</i> )  |                                       |
| Las indicaciones enumeradas más abajo se enviarán a la Oficina Internacional más adelante ( <i>especifique la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo, "Número de Acceso del Depósito"</i> ) |                                       |

10

15

20

25

30

|   |
|---|
| Para uso exclusivo de la Oficina que recibe<br><input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió con la solicitud internacional |
| Oficial autorizado  |

|   |
|---|
| Para uso exclusivo de la Oficina Internacional<br><input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió por la Oficina Internacional sobre: |
| Oficial autorizado  |

Formulario PCT/RO/134 (Julio 1998; reimpresión enero de 2004)

35

LISTADO DE SECUENCIAS

40

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Microorganismo del género *Corynebacterium* productor de L-lisina y un método para producir L-lisina mediante el uso del mismo

45

<130> PP16-0104

<160> 8

50

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 308

<212> PRT

55

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

60

65

ES 2 795 437 T3

5  
 Met Ile Val Asn His Phe Phe Ser Gly Val Ser Pro Leu Ile Val Ala  
 1 5 10 15

10  
 Ile Ile Leu Gly Ile Ile Leu Thr Asn Leu Ile Gln Leu Pro Ala Ser  
 20 25 30

15  
 Thr Ser Pro Gly Ile Thr Leu Ala Ser Lys Lys Leu Leu Arg Leu Gly  
 35 40 45

20  
 Ile Val Phe Leu Gly Leu Gln Leu Val Phe Ser Asp Ile Leu Ser Leu  
 50 55 60

25  
 Gly Phe Pro Met Leu Ala Val Ile Val Cys Ile Val Ala Gly Gly Ile  
 65 70 75 80

30  
 Phe Gly Thr Ile Leu Met Gly His Leu Leu Arg Met Lys Pro Thr Gln  
 85 90 95

35  
 Val Leu Leu Ile Ala Cys Gly Phe Ser Ile Cys Gly Ala Ala Ala Val  
 100 105 110

40  
 Ala Gly Val Glu Gly Val Thr Asp Ser Glu Glu Glu Glu Val Val Thr  
 115 120 125

45  
 Ala Val Ala Leu Val Val Ile Phe Gly Thr Leu Met Ile Pro Phe Ile  
 130 135 140

50  
 Pro Phe Ala Thr Lys Val Leu Gly Leu Ser Pro Glu Ile Gly Gly Met  
 145 150 155 160

55  
 Trp Ala Gly Gly Ser Ile His Glu Ile Ala Gln Val Val Ala Ala Gly  
 165 170 175

60  
 Gly Val Ile Gly Gly Gly Ala Leu Gly Val Ala Val Val Val Lys Leu  
 180 185 190

65  
 Ala Arg Val Leu Leu Leu Ala Pro Ile Ala Ala Ile Leu Ser Phe Arg  
 195 200 205

70  
 Gln Arg Arg Gln Gly Tyr Thr Ser Pro Asp Gly Lys Arg Pro Pro Val  
 210 215 220

75  
 Val Pro Leu Phe Ile Leu Gly Phe Leu Ala Met Val Val Leu Arg Ser  
 225 230 235 240

80  
 Thr Val Ala Leu Pro Asp Glu Val Ile Ala Ala Gly Gly Phe Leu Gln  
 245 250 255

85  
 Thr Ala Leu Leu Ser Ala Ala Met Phe Gly Leu Gly Cys Gly Val Lys  
 260 265 270

90  
 Ile Gln Asn Leu Ile His Val Gly Val Lys Pro Phe Ile Leu Ala Phe  
 275 280 285

95  
 Gly Ser Thr Thr Leu Val Thr Ser Ile Ala Leu Ala Gly Thr Leu Leu  
 290 295 300

100  
 Thr His Leu Gly  
 305

ES 2 795 437 T3

5 <210> 2  
 <211> 927  
 <212> ADN  
 <213> Corynebacterium glutamicum

10 <400> 2

15 atgatcgtga atcacttttt ctctggtgtg agtccgctta tcgtcgcgat cattcttggc 60

20 atcatcctga ccaacctgat tcagctccca gcatcgacct caccggcat cacgttggcg 120

25 tcgaaaaagc ttttgccgct gggaatcgtc ttctctggtc tgcagttagt tttctcagat 180

30 attttgtcac ttggtttccc catgctggcg gtgattgtgt gcatcgttgc cgggtgtatt 240

35 tttgggacca tcctcatggg acacctgctc agaatgaaac caaccaagt tctgttgatt 300

40 gcttgtggct tttctatttg tggcgctgcg gccgtggcag gtgttgaagg agtaactgat 360

45 tccgaagaag aagaggtcgt tactgctggtt gcacttgttg ttattttcgg aacgctgatg 420

50 attcctttta tcccattcgc aaccaaagtc ttggggttat cccctgaaat cgggtgggatg 480

55 tgggcaggcg gatccatcca tgaatcgcc caagtagtag cagctggagg agtcattggt 540

60 ggtggagcat taggtgttgc agttgtggtg aaactcgccc gactactcct acttgcaccc 600

65 attgctgcca ttttaagttt tcgccagcgc cgcacgggtt acacgtcccc cgatggaaag 660

70 agaccaccgg tcgttcccct atttatcctt ggattccttg cgatggtagt tttgcgctcc 720

75 actgttgcgc tcccagacga ggtaatgog gctggaggtt tctacagac agccttctc 780

80 tctgcagcaa tgtttggtct cgggtgtggc gtaaaaatcc agaacctgat ccatgttggg 840

85 gtcaagcctt tcattctggc tttcggatcc acgacacttg tcaccagtat cgcacttgca 900

90 ggcaccctac tcaccacct cggatag 927

45 <210> 3  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Cebador 1

55 <400> 3  
 acctacaaca aagctctcat caacc 25

60 <210> 4  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>  
 <223> Cebador 2

70 <400> 4  
 ctaccctgtg gaacacctac atct 24

# ES 2 795 437 T3

<210> 5  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
5 <220>  
<223> Cebador 3

<400> 5  
cgctctagat tcatgtctg cctcaagc 28

10 <210> 6  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Cebador 4

<400> 6  
20 tactgtgac aaactagtcg gactcacacc agagaaa 37

<210> 7  
<211> 37  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador 5

30 <400> 7  
ggtgtgagtc cgactagttt gtcaccagta tcgcact 37

<210> 8  
<211> 28  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Cebador 6

40 <400> 8  
cgctctagac gctgataacg atgaggtc 28

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un microorganismo productor de L-lisina del género *Corynebacterium* en donde una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 está inactivada.
2. El microorganismo productor de L-lisina de conformidad con la reivindicación 1, en donde la proteína es codificada por un gen que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2.
- 10 3. El microorganismo productor de L-lisina de conformidad con la reivindicación 1, en donde el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
4. Un método para producir L-lisina, que comprende las etapas de:  
cultivar el microorganismo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un medio; y  
recuperar L-lisina del microorganismo o del medio de cultivo.