

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 960**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/34 (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: **08.05.2015 PCT/KR2015/004588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15170907**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15789069 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3141597**

54 Título: **Microorganismo que tiene una productividad aumentada de l-lisina y método para producir l-lisina mediante el uso del mismo**

30 Prioridad:

08.05.2014 KR 20140055102

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

30.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE, PETER;
MOON, JUN OK;
KIM, HYUNG JOON y
RYU, SONG GI**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 796 960 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 tiene una productividad aumentada de L-lisina y método para producir L-lisina mediante el uso del mismo

Campo técnico

La presente descripción se refiere a un microorganismo que tiene una capacidad aumentada para producir L-lisina y un método para producir L-lisina mediante el uso del mismo.

Técnica Anterior

La L-lisina se usa en las industrias de alimentación animal, cosmética y farmacéutica humana, y se produce por fermentación mediante el uso de un microorganismo del género *Corynebacterium* o del género *Escherichia*. En años recientes, se han realizado estudios sobre el desarrollo de cepas de producción altamente eficientes y técnicas del proceso de fermentación.

Se han realizado muchos estudios para controlar la formación de espuma durante la fermentación de levaduras que se usan en la producción de cerveza y vino, y en estudios recientes, se han identificado genes (AWA1, FPG1 y CFG1) que tienen un efecto sobre la formación de espuma (Shimoi H. y otros, 2002, Appl. Environ. Microbiol. 68: 2018-25; Blasco L. y otros, Yeast. 2011, 28: 437-51; Blasco L. y otros, J. Agric. Food Chem. 2012, 60: 10796-07). En la presente descripción, se encontró que, en el caso de una cepa con estos genes inactivados, la formación de espuma disminuyó significativamente en comparación con el caso de una cepa original, mientras que en el caso de una cepa que sobreexpresa estos genes, la formación de espuma aumentó.

La formación de espuma durante el cultivo de la levadura se produce a través de una serie de procesos de la siguiente manera. Primero, la manoproteína se mezcla con finas burbujas de gas generadas durante la fermentación. En este momento, el interior de las burbujas de gas se vuelve hidrófobo, y el exterior de las burbujas de gas se vuelve hidrófilo. Por esta razón, la viscosidad del medio de cultivo aumenta de manera que no solo se mezclan varias proteínas, sino también células, lo que produce espuma (Swart CW. y otros, FEMS Yeast Res. 2012, 12: 867-69).

En la producción de cerveza mediante el uso de levadura, se requiere un nivel adecuado de formación de espuma, pero en la fermentación de microorganismos que se usan para producir grandes cantidades de productos útiles como aminoácidos, se requiere la inhibición de la formación de espuma. Si se genera una cantidad excesivamente grande de espuma durante el cultivo, la viscosidad del medio de cultivo aumentará y, por lo tanto, la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR) en el medio de cultivo disminuirá y, en casos graves, se producirá la lisis de las células. El uso de una gran cantidad de un agente antiespumante para inhibir la formación de espuma puede aumentar los costos de producción en términos industriales y puede tener un efecto adverso sobre el crecimiento celular.

En consecuencia, los presentes inventores han seleccionado genes de un microorganismo del género *Corynebacterium*, que tienen un efecto sobre una gran cantidad de formación de espuma, y han descubierto que, cuando dichos genes se inactivan, la formación de espuma se controla eficazmente, de manera tal que la capacidad de la cepa de producir L-lisina se incrementa, por consiguiente, se completa la presente descripción.

Brand S. y otros, Arch. Microbiol. 2003, 180: 33-44, describe una cepa de *Corynebacterium glutamicum* en la que se elimina el gen *cmt1*. El gen *cmt1* codifica una micoliltransferasa que tiene un dominio esterasa. El producto del gen *cmt1* tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la SEQ ID NO: 1 de la presente descripción.

El documento WO 2011/158975 describe un método para producir L-lisina mediante el uso de una cepa genéticamente modificada de *Corynebacterium glutamicum*.

Descripción

Problema Técnico

Es un objetivo de la presente descripción proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tenga una capacidad aumentada para producir L-lisina.

Otro objetivo de la presente descripción es proporcionar un método para producir L-lisina mediante el uso del microorganismo del género *Corynebacterium*.

Solución Técnica

Para lograr los objetivos anteriores, un aspecto de la presente descripción proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* en donde al menos una proteína secretora seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 13 se inactiva.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un método para producir L-lisina mediante el cultivo de un microorganismo del género *Corynebacterium*.

5 El alcance de la invención se define por las reivindicaciones.

Efectos Ventajosos

10 El microorganismo de acuerdo con la presente descripción es un microorganismo en donde las proteínas secretoras que participan en la formación de espuma se inactivan de manera que aumenta la capacidad de la cepa para producir L-lisina. Cuando se usa esta cepa, se reduce la formación de espuma, puede cultivarse sin tener que aumentar o sin tener que adicionar una gran cantidad de un agente antiespumante, y puede aumentarse la capacidad de la cepa de producir L-lisina. Además, en términos industriales, pueden obtenerse efectos tales como la conveniencia de la producción y una reducción en el costo de producción, y puede producirse eficientemente L-lisina.

15 Descripción detallada

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

20 En un aspecto, la presente descripción proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* en donde al menos una proteína secretora que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 13 se inactiva. Si se genera una cantidad excesivamente grande de espuma durante el cultivo en masa para producir L-lisina, la viscosidad del medio de cultivo aumentará de modo que la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) en el medio de cultivo disminuirá, y en casos graves, la lisis de las células también ocurrirá. En otras palabras, se pensó que inactivar las proteínas secretoras, que causan la formación de espuma, en términos de controlar la formación de espuma, sería ventajoso para la producción de lisina.

30 Por lo tanto, en una modalidad de la presente descripción, con el fin de mejorar un proceso de fermentación para producir L-lisina y para seleccionar proteínas secretoras principales que causan la formación de espuma innecesaria para la producción de lisina, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (este microorganismo se describió como KFCC10881, y se redepuso con una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest con el núm. de orden KCCM11016P; Patente coreana núm. 10-0159812) se cultivó, y después se aisló la espuma producida durante el proceso de fermentación, por consiguiente se obtuvieron péptidos. Se analizaron los péptidos obtenidos, y se seleccionaron tres proteínas detectadas en mayores cantidades, por consiguiente, se seleccionaron los péptidos codificados por los genes de NCBI núms. de acceso NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 para *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032.

40 En la presente descripción, el péptido codificado por el gen NCgl0336 es una esterasa que existe endógenamente en *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, el péptido puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 80 %, específicamente al menos el 90 %, más específicamente al menos el 95 %, particularmente específicamente al menos el 97 %, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, también se incluye en el alcance de la proteína secretora de acuerdo con la presente descripción, siempre que sea una proteína que tenga actividad esterasa. Sin embargo, la proteína secretora que se usa en la presente descripción no se limita a esto, porque la secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad esterasa puede diferir en dependencia de la especie o cepa de microorganismos. Además, es obvio que una proteína que

45 tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, modificación, sustitución o eliminación de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 también se incluye en el alcance de la presente descripción, siempre que tenga una secuencia que tenga homología a la secuencia de SEQ ID NO: 1 y tenga una actividad biológica sustancialmente igual o similar a la de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

50 En la presente descripción, el gen NCgl0336 tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, y una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 80 %, específicamente al menos el 90 %, más específicamente el 95 %, particularmente específicamente el 97 %, a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2, también se incluye en el alcance de la presente descripción. Además, las variantes de la secuencia, que codifican el mismo aminoácido debido a la degeneración del código genético, también se incluyen en el alcance de la presente descripción. Además, un polinucleótido que codifica NCgl0336 de acuerdo con la presente descripción puede ser una variante que codifica NCgl0336, que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 o una sonda derivada de la secuencia de nucleótidos en condiciones rigurosas y que normalmente funciona.

60 En la presente descripción, el péptido codificado por el gen NCgl0717 es una esterasa que existe endógenamente en *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, el péptido puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 80 %, específicamente al menos el 90 %, más específicamente al menos el 95 %, particularmente específicamente al menos el 97 %, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, también se incluye en el alcance de la proteína secretora de acuerdo con la presente descripción, siempre que sea una proteína que tenga actividad esterasa. Sin embargo, la proteína secretora que se usa en la presente descripción no se limita a esto, porque la secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad

esterasa puede diferir en dependencia de la especie o cepa de microorganismos. Además, es obvio que una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, modificación, sustitución o eliminación de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 también se incluye en el alcance de la presente descripción, siempre que tenga una secuencia que tenga homología a la secuencia de SEQ ID NO: 7 y tenga una actividad biológica sustancialmente igual o similar a la de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

En la presente descripción, el gen NCgl0717 tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, y una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos el 80 %, específicamente al menos el 90 %, más específicamente el 95 %, particularmente específicamente el 97 %, a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8, también se incluye en el alcance de la presente descripción. Además, las variantes de la secuencia, que codifican el mismo aminoácido debido a la degeneración del código genético, también se incluyen en el alcance de la presente descripción. Además, un polinucleótido que codifica a NCgl0717 de acuerdo con la presente descripción puede ser una variante que codifica a NCgl0717, que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 8 o una sonda derivada de la secuencia de nucleótidos en condiciones rigurosas y que normalmente funciona.

En la presente descripción, el péptido codificado por el gen NCgl2912 es una esterasa que existe endógenamente en *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, el péptido puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, y una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos el 80 %, específicamente al menos el 90 %, más específicamente al menos el 95 %, particularmente específicamente al menos el 97 %, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, también se incluye en el alcance de la proteína secretora de acuerdo con la presente descripción, siempre que sea una proteína que tenga actividad esterasa. Sin embargo, la proteína secretora que se usa en la presente descripción no se limita a esto, porque la secuencia de aminoácidos de la proteína que muestra actividad esterasa puede diferir en dependencia de la especie o cepa de microorganismos. Además, es obvio que una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, modificación, sustitución o eliminación de uno o varios aminoácidos en una o más posiciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 también se incluye en el alcance de la presente descripción, siempre que tenga una secuencia que tenga homología con la secuencia de SEQ ID NO: 13 y tenga una actividad biológica sustancialmente igual o similar a la de la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En la presente descripción, el gen NCgl2912 tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14, y una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 80%, específicamente al menos 90%, más específicamente 95%, particularmente específicamente 97%, a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 también se incluye en el alcance de la presente descripción. Además, las variantes de la secuencia, que codifican el mismo aminoácido debido a la degeneración del código genético, también se incluyen en el alcance de la presente descripción. Además, un polinucleótido que codifica a NCgl2912 de acuerdo con la presente descripción puede ser una variante que codifica a NCgl2912, que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 o una sonda derivada de la secuencia de nucleótidos en condiciones rigurosas y que normalmente funciona.

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

Como se usa en la presente descripción, el término "condiciones rigurosas" significa condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos. Por ejemplo, tales condiciones rigurosas se describen en detalle en J. Sambrook y otros, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2da Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Como se usa en la presente descripción, la "inactivación" puede lograrse mediante cualquier método de inactivación conocido en la técnica. En la presente descripción, "inactivación" significa que la expresión de un gen endógeno se reduce en comparación con la de una cepa de tipo salvaje, o el gen no se expresa, o el gen no tiene actividad o actividad reducida, aunque se exprese. La activación puede lograrse al mutar toda o parte de la secuencia de nucleótidos o toda o parte de la secuencia reguladora de la expresión de esta mediante eliminación, sustitución, inserción o una combinación de estas.

Como ejemplo específico, un microorganismo con el gen endógeno inactivado puede prepararse mediante la transformación de un microorganismo del género *Corynebacterium* con un vector recombinante que comprende un fragmento de gen obtenido por eliminación del marco de lectura abierto del gen endógeno, por consiguiente por eliminación o mutación del gen endógeno. La inserción del gen en el cromosoma puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica.

Como se usa en la presente descripción, el término enzima y actividad "endógena" se refiere a una enzima presente originalmente en un microorganismo o una célula y la actividad de la enzima. Por ejemplo, el término significa una enzima y su actividad antes de que la enzima y la actividad se modifiquen.

- 5 Como se usa en la presente descripción, el término "vector recombinante" se refiere a una construcción de ADN que contiene la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica la proteína diana unida operativamente a una secuencia reguladora adecuada para poder expresar el gen objetivo en una célula huésped adecuada. La secuencia reguladora incluye un promotor capaz de iniciar la transcripción, cualquier operador para regular esta transcripción, una secuencia que codifica un sitio de unión adecuado del ribosoma del ARNm y una secuencia para regular la terminación de la transcripción y la traducción. Una vez transformado en un huésped adecuado, el vector puede replicarse o funcionar independientemente del genoma del huésped, o puede integrarse en el propio genoma. El vector que se usa en la presente descripción no se limita específicamente y puede ser cualquier vector conocido en la técnica, siempre que pueda replicarse en un huésped.
- 10
- 15 Los ejemplos del vector que se usa en la construcción del vector recombinante incluyen plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos naturales o recombinantes. Por ejemplo, el vector de fago o vector cósmido que se usa en la presente descripción pueden ser pWE15, M13, λ MBL3, λ MBL4, λ IXII, λ ASHII, λ APII, λ t10, λ t11, Charon4A, Charon21A o similares, y el vector plásmido que se usa en la presente descripción puede ser tipo pDZ, tipo pBR, tipo pUC, tipo pBluescriptII, tipo pGEM, tipo pTZ, tipo pCL, tipo pET o similares. Un vector que puede usarse en la presente descripción no se limita específicamente, y cualquier expresión conocida puede usarse en la presente descripción.
- 20

- 25 Tal como se usa en la presente descripción, el término "transformación" significa introducir un vector que comprende un polinucleótido que codifica una proteína objetivo en una célula huésped para poder expresar una proteína codificada por el polinucleótido en la célula huésped. El polinucleótido introducido puede insertarse y ubicarse en el cromosoma de la célula huésped o ubicarse fuera del cromosoma, siempre que pueda expresarse en la célula huésped. Además, los polinucleótidos incluyen ADN y ARN, que codifican la proteína objetivo. Siempre que el polinucleótido pueda introducirse en la célula huésped y se exprese en ella, puede introducirse en cualquier forma. Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en la célula huésped en forma de un casete de expresión que es una construcción polinucleotídica que incluye todos los elementos necesarios para la autoexpresión. El casete de expresión generalmente incluye un promotor que está operativamente unido al marco de lectura abierto (en adelante abreviado como "ORF") del gen, una señal de terminación de la transcripción, un sitio de unión al ribosoma y una señal de terminación de la traducción. El casete de expresión puede estar en forma de un vector de expresión autorreplicable. Además, el polinucleótido puede introducirse en la célula huésped por sí mismo y unirse operativamente a la secuencia necesaria para la expresión en la célula huésped.
- 30

- 35 Como una cepa original en la que va a introducirse el vector recombinante, puede usarse sin limitación cualquier microorganismo que tenga la capacidad de producir la L-lisina. Específicamente, puede usarse un microorganismo del género *Corynebacterium* o del género *Brevibacterium*. Más específicamente, puede usarse un microorganismo *Corynebacterium glutamicum*.

- 40 Como se usa en la presente descripción, la expresión "microorganismo que tiene la capacidad de producir L-lisina" se refiere a un microorganismo obtenido mediante la manipulación de un gen generalmente conocido para que sea capaz de producir L-lisina. Por ejemplo, el microorganismo puede ser un microorganismo obtenido mediante la inserción de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en *aspB* (gen que codifica la aspartato aminotransferasa), *lysC* (gen que codifica la aspartato quinasa), *asd* (gen que codifica el 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, mediante el tratamiento de una cepa mutante auxotrófica de L-leucina con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG).
- 45

- 50 Más específicamente, un microorganismo del género *Corynebacterium* usado en la presente descripción es *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (este microorganismo se describió como KFCC10881 y se redepusó con una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest bajo el núm. de orden KCCM11016P; Patente coreana núm. 10-0159812), *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (Patente coreana núm. 10-0924065), la cepa productora de L-lisina KCCM11347P de *Corynebacterium glutamicum* (este microorganismo se describió como KFCC10750 y se redepusó con una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest bajo el núm. de orden KCCM11347P; Patente coreana núm. 10-0073610), y la cepa CJ3P de *Corynebacterium glutamicum* (Binder y otros, Genome Biology 2012, 13:R40), pero no se limitan a los mismos.
- 55

- 60 En una modalidad preferida de la presente descripción, un microorganismo transformado de acuerdo con la presente descripción puede ser *Corynebacterium glutamicum* KCCM11502P, KCCM11481P o KCCM11482P.

- 65 En otro aspecto, la presente descripción también proporciona un método para producir L-lisina mediante el uso del microorganismo transformado. Más específicamente, la presente descripción proporciona un método para producir L-lisina, que comprende los pasos de: cultivar el microorganismo de la presente descripción para producir L-lisina en un cultivo o célula del microorganismo; y recuperar L-lisina del medio de cultivo.

En el método de la presente descripción, el cultivo de un microorganismo del género *Corynebacterium* puede realizarse mediante el uso de cualquier condición 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 of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., Estados Unidos, 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 como el ácido acético. Estas sustancias pueden usarse individualmente o en una mezcla.

Las fuentes de nitrógeno que pueden usarse incluyen compuestos que contienen nitrógeno orgánico, como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno también pueden usarse individualmente o como una mezcla.

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 debe contener sales metálicas como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias 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 un lote o de manera continua a través de un método adecuado durante el cultivo.

El pH del cultivo puede controlarse mediante el uso de compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico de manera adecuada. La formación de espuma puede controlarse mediante el uso de agentes antiespumantes como los ésteres de poliglicol de ácidos grasos. Las condiciones aeróbicas se mantienen 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 se haya producido la cantidad deseada de L-lisina. Específicamente, el tiempo de cultivo es de 10-160 horas.

En el método de la presente descripción, el cultivo puede realizarse de forma continua o en un proceso discontinuo o en un proceso discontinuo alimentado o repetido. Este cultivo puede realizarse mediante el uso de cualquier método bien conocido en la técnica.

En lo sucesivo, la presente descripción se describirá con más detalle con referencia a 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: Selección de proteínas secretoras relacionadas con la formación de espuma durante el cultivo

En este ejemplo, para seleccionar proteínas secretoras que causan formación de espuma, se realizó un experimento de la siguiente manera.

Primero, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (este microorganismo se describió como KFCC10881 y se redepositó con una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest bajo el núm. de orden KCCM11016P; la Patente coreana núm. 10-0159812) se cultivó mediante el uso de un fermentador de 1 L, y después solamente la espuma producida durante el proceso de fermentación se aisló y se concentró en un tubo de ensayo de 15 ml.

Para la identificación de las proteínas contenidas en la muestra de espuma concentrada, se añadió a la muestra una cantidad adecuada de un colorante de carga que contiene un tensoactivo que después se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio al 8 %. Después de la electroforesis, el gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio se tiñó con azul de Coomassie. Después, las bandas de proteínas teñidas se escindieron y se digirieron con tripsina para obtener péptidos, y las secuencias de aminoácidos de los péptidos obtenidos se analizaron mediante un método LC-MS/MS.

Los péptidos analizados se identificaron mediante la búsqueda de genes de un microorganismo del género *Corynebacterium* mediante el uso de la investigación de Blast proporcionada por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Entre los péptidos identificados, se seleccionaron tres proteínas detectadas en mayores cantidades, por consiguiente, se seleccionaron finalmente los genes que codifican las proteínas. Los genes seleccionados son los núms. de acceso de NCBI NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912.

Ejemplo 2: Construcción de plásmido recombinante para la inactivación del gen NCgl0336 de la proteína secretora

Para la construcción de un plásmido recombinante capaz de inactivar el gen NCgl0336 en el cromosoma de *Corynebacterium*, se obtuvieron la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2) de NCgl0336 que se basan en la secuencia de nucleótidos depositada en el NIH Genbank. Con el fin de preparar un fragmento de gen mediante la eliminación del marco de lectura abierto de NCgl0336, se construyeron cebadores de las SEQ ID NO: 3 a 6 que se basan en la secuencia de SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO. 3: 5'-atcctctagagtcgacGAAGCCTCTGCACCTCGCTG-3';
 SEQ ID NO. 4: 5'-TATAGTTCGGTTCGCGTCTCCAACGCATCCGGCC-3';
 SEQ ID NO. 5: 5'-CGGAACCGAACTATACCACCGAGGGACGCATTCTC-3';
 SEQ ID NO. 6: 5'-atgcctgcaggtcgacGCTCAAACGCACGAGCGAAG-3'.

Mediante el uso del ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* como plantilla, la PCR se realizó mediante el uso de un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 y un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 [Sambrook y otros, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories]. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto.

Como resultado, se obtuvieron NCgl0336-A y NCgl0336-B, que son fragmentos de ADN que comprenden un fragmento del gen NCgl0336 de 342 pb y un fragmento del gen NCgl0336 de 315 pb, respectivamente. El fragmento de ADN obtenido mediante amplificación por PCR se ligó a un plásmido pDZ (Patente coreana núm. 10-0924065) mediante el uso de un kit de clonación por infusión (Invitrogen), y después se transformó en *E. coli* DH5α y se sembró en un medio sólido LB que contenía 25 mg/l de kanamicina. Una colonia transformada con un plásmido que tenía el gen deseado insertado en el mismo se seleccionó por PCR, y después el plásmido se aisló mediante el uso de una técnica de extracción de plásmido generalmente conocida. El plásmido se denominó "pDZ-ΔNCgl0336". pDZ-ΔNCgl0336 es un plásmido en donde se eliminó un fragmento de gen de 503 pb de NCgl0336.

Ejemplo 3: Construcción del plásmido recombinante para la inactivación del gen NCgl0717 de la proteína secretora

Para la construcción de un plásmido recombinante capaz de inactivar el gen NCgl0717 en el cromosoma de *Corynebacterium*, se obtuvieron la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 8) de NCgl0717 que se basan en la secuencia de nucleótidos depositada en el NIH Genbank. Con el fin de preparar un fragmento de gen mediante la eliminación del marco de lectura abierto de NCgl0717, se construyeron cebadores de las SEQ ID NO: 9 a 12 que se basan en la secuencia de SEQ ID NO: 8.

SEQ ID NO. 9: 5'-CCGGGGATCCTCTAGAGTTCGCGGATAAATGGG-3';
 SEQ ID NO. 10: 5'-CACGTGAAATTCAGGTCGCGTGGTTCACCTCCGAAG-3';
 SEQ ID NO. 11: 5'-CTTCGGAGGTGAACCACGCGACCTGAATTTACGTG-3';
 SEQ ID NO. 12: 5'-GCAGGTGCGACTCTAGAGGTCCCATTGTTCTG-3'.

Mediante el uso del ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* como plantilla, la PCR se realizó mediante el uso de un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto.

Como resultado, se obtuvieron NCgl0717-A y NCgl0717-B, que son fragmentos de ADN que comprenden un fragmento del gen NCgl0717 de 493 pb y un fragmento del gen NCgl0717 de 491 pb, respectivamente. El fragmento de ADN obtenido mediante amplificación por PCR se ligó a un plásmido pDZ mediante el uso de un kit de clonación por infusión (Invitrogen), y después se transformó en *E. coli* DH5α y se sembró en un medio sólido LB que contenía 25 mg/l de kanamicina. Una colonia transformada con un plásmido que tenía el gen deseado insertado en el mismo se seleccionó por PCR, y después el plásmido se aisló mediante el uso de una técnica de extracción de plásmido generalmente conocida. El plásmido se denominó "pDZ-ΔNCgl0717". pDZ-ΔNCgl0717 es un plásmido en donde se eliminó un fragmento de gen de 786 pb de NCgl0717.

Ejemplo 4: Construcción de plásmido recombinante para la inactivación del gen NCgl2912 de la proteína secretora

Para la construcción de un plásmido recombinante capaz de inactivar el gen NCgl2912 en el cromosoma de *Corynebacterium*, se obtuvieron la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) y la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 14) de NCgl2912 que se basan en la secuencia de nucleótidos depositada en el NIH Genbank. Con el fin de preparar un fragmento de gen mediante la eliminación del marco de lectura abierto de NCgl2912, se construyeron cebadores de las SEQ ID NO: 15 a 18 que se basan en la secuencia de SEQ ID NO: 14.

SEQ ID NO. 15: 5'-CCGGGGATCCTCTAGAGCTGCAAGAAGTGCGAC-3';
 SEQ ID NO. 16: 5'-CTCGTAGTCGCTAGCACCTATTACGGGAGGTC-3';
 SEQ ID NO. 17: 5'-GACCTCCCGTAATAGGTGCTAGCGACTACGAG-3';

SEQ ID NO. 18: 5'-GCAGGTCGACTCTAGACCCGAGCTATCTAACAC-3'.

Mediante el uso del ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* como plantilla, la PCR se realizó mediante el uso de un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 y un conjunto de cebadores de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18. La PCR se realizó durante 30 ciclos, cada uno de los cuales consistió en desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 50 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 1 minuto.

Como resultado, se obtuvieron NCgl2912-A y NCgl2912-B, que son fragmentos de ADN que comprenden un fragmento del gen NCgl2912 de 444 pb y un fragmento del gen NCgl2912 de 636 pb, respectivamente. El fragmento de ADN obtenido mediante amplificación por PCR se ligó a un plásmido pDZ mediante el uso de un kit de clonación por infusión (Invitrogen), y después se transformó en *E. coli* DH5α y se sembró en un medio sólido LB que contenía 25 mg/l de kanamicina. Una colonia transformada con un plásmido que tenía el gen deseado insertado en el mismo se seleccionó por PCR, y después el plásmido se aisló mediante el uso de una técnica de extracción de plásmido generalmente conocida. El plásmido se denominó "pDZ-ΔNCgl2912". pDZ-ΔNCgl2912 es un plásmido en donde se eliminó un fragmento de gen de 128 pb de NCgl2912.

Ejemplo 5: Construcción y evaluación de la cepa inactivada por el gen de la proteína secretora a partir de la cepa productora de lisina KCCM11016P

Cada uno de los tres plásmidos recombinantes (pDZ-ΔNCgl0336, pDZ-ΔNCgl0717 y pDZ-ΔNCgl2912) construidos en los Ejemplos 2, 3 y 4 se transformó en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P mediante un método de pulso eléctrico y las cepas en donde el gen objetivo se inactivó mediante recombinación homóloga se prepararon por un método de PCR. Las cepas preparadas se denominaron "KCCM11016P-ΔNCgl0336", "KCCM11016P-ΔNCgl0717" y "KCCM11016P-ΔNCgl2912", respectivamente.

Se inoculó cada una de las tres cepas y una cepa control en un matraz con deflector de 25 ml que contenía 25 ml del siguiente medio de cultivo, y se cultivó con agitación a 200 rpm y 30 °C durante 20 horas. A continuación, se inoculó 1 ml del cultivo de siembra en un matraz con deflector de 250 ml que contenía 24 ml del siguiente medio de producción, y se cultivó con agitación a 200 rpm y 37 °C durante 96 horas. La composición de cada uno de los medios de cultivo y el medio de producción es la siguiente.

Medio de cultivo (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 7H₂O, 100 μg de biotina, 1000 μg de tiamina HCl, 2000 μg de pantotenato de calcio y 2000 μg de nicotinamida (por litro 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 escarpado, 3 g de urea, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄ 7H₂O, 100 g de biotina, 1000 g de tiamina HCl, 2000 g de pantotenato de calcio, 3000 g de nicotinamida, y 30 g de CaCO₃ (por litro de agua destilada).

Después de completar el proceso de cultivo, el cultivo se transfirió a una probeta graduada, y se midió la altura de la espuma producida en el cultivo, y también se midió la concentración de L-lisina en el cultivo por HPLC. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 1 a continuación. Los resultados en la Tabla 1 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la producción de L-lisina se evaluó basada en el valor promedio.

Tabla 1

	Lisina (g/l)			Espuma (cm/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	43,5	43,1	43,4	4,5	5,0	4,7
KCCM11016P-ΔNCgl0336	46,1	45,8	45,7	4,1	4,6	4,3
KCCM11016P-ΔNCgl0717	45,9	46,4	46,1	3,9	4,4	4,0
KCCM11016P-ΔNCgl2912	45,8	46,0	45,8	4,2	4,7	4,4

Como se muestra en la Tabla 1 anterior, la producción de L-lisina de la cepa en donde se inactivó cada uno de los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 aumentó aproximadamente un 6 % en comparación con la cepa original KCCM11016P. Además, la espuma en el cultivo de la cepa en donde se inactivó cada uno de los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 disminuyó aproximadamente un 6-15 % en comparación con la del cultivo de la cepa original.

Por lo tanto, se encontró que, cuando las principales proteínas secretoras del microorganismo *Corynebacterium* sp., que son innecesarias para la producción de lisina, se inactivan, la generación de espuma durante el cultivo del microorganismo puede controlarse eficazmente, por consiguiente, aumenta la producción de L-lisina.

Ejemplo 6: Construcción y evaluación de cepas con proteína secretora inactivada a partir de la cepa productora de L-lisina KCCM10770P

Con el fin de examinar si los efectos de la inactivación de proteínas secretoras 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 5, las cepas en que cada una de las tres proteínas secretoras estaba inactivada se construyeron de la misma manera que se describe en el Ejemplo 5. Las cepas construidas se denominaron "KCCM10770P-ΔNCgl0336", "KCCM10770P-ΔNCgl0717" y "KCCM10770P-ΔNCgl2912". Se examinó la cantidad de producción de L-lisina de cada una de las cepas construidas junto con la cantidad de espuma generada.

Para examinar la producción de lisina de las cepas, cada una de las cepas junto con la cepa control se cultivó de la misma manera que se describe en el Ejemplo 5. Después de completar el cultivo, la cantidad de espuma generada se midió de la misma manera que se describe en el Ejemplo 5, y la concentración de L-lisina se midió por HPLC. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 2 a continuación. Los resultados en la Tabla 2 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la producción de L-lisina se evaluó basada en el valor promedio.

Tabla 2

	Lisina (g/l)			Espuma (cm/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM10770P	46,1	46	46,3	5,1	5,6	5,2
KCCM10770P-ΔNCgl0336	47,9	48,2	47,7	4,6	4,9	4,5
KCCM10770P-ΔNCgl0717	48,3	47,7	48,1	4,6	4,6	4,3
KCCM10770P-ΔNCgl2912	47,9	48,5	48,2	4,9	5,4	5,0

Como se muestra en la Tabla 2 anterior, la producción de lisina de la cepa en donde se inactivó cada uno de los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 aumentó aproximadamente un 4 % en comparación con la cepa original KCCM10770P. Además, la espuma en el cultivo de la cepa en donde se inactivó cada uno de los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 disminuyó aproximadamente de 4-18 % en comparación con el de la cepa original.

Por lo tanto, se encontró que, cuando las principales proteínas secretoras de *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (Patente coreana núm. 10-0924065), que son innecesarias para la producción de lisina, se inactivan, la generación de espuma durante el cultivo de los microorganismos puede controlarse eficazmente, por consiguiente, aumenta la producción de L-lisina, similar a los resultados del Ejemplo 6.

Ejemplo 7: Construcción y evaluación de cepas con proteína secretora inactivada a partir de la cepa productora de L-lisina KCCM11347P

Con el fin de examinar los efectos de la inactivación de las proteínas secretoras en la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (este microorganismo se describió como KFCC10750, y se redepositó con una Autoridad Depositaria Internacional bajo el Tratado de Budapest bajo el núm. de orden KCCM11347P; Patente coreana núm. 10-0073610) construida por mutación artificial, las cepas en las que cada una de las tres proteínas secretoras se inactivaron se construyeron de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5 o 6. Las cepas construidas se denominaron "KCCM11347P-ΔNCgl0336", "KCCM11347P-ΔNCgl0717" y "KCCM11347P-ΔNCgl2912". Se examinó la cantidad de producción de L-lisina de cada una de las cepas construidas junto con la cantidad de espuma generada.

Para examinar la producción de lisina de las cepas, cada una de las cepas junto con la cepa control se cultivó de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5 o 6. Después de completar el cultivo, la cantidad de espuma generada se midió de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5 o 6, y la concentración de L-lisina se midió por HPLC. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 3 a continuación. Los resultados en la Tabla 3 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la producción de L-lisina se evaluó en función del valor promedio.

Tabla 3

	Lisina (g/l)			Espuma (cm/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11347P	38,6	38,2	38,3	5,4	6,0	5,7
KCCM11347P-ΔNCgl0336	40,1	40,2	40,1	5,1	5,1	5,3
KCCM11347P-ΔNCgl0717	40,1	39,7	40,5	4,7	5,1	5,0
KCCM11347P-ΔNCgl2912	39,8	40,3	40,3	5,1	5,6	5,4

Como se muestra en la Tabla 3 anterior, la producción de lisina de la cepa en donde se inactivó cada uno de los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 aumentó aproximadamente un 5 % en comparación con la cepa original KCCM11347P. Además, la espuma en el cultivo de la cepa en donde se inactivó cada uno de los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 disminuyó aproximadamente del 4-15 % en comparación con el de la cepa original.

Por lo tanto, se encontró que, cuando las principales proteínas secretoras de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P (Patente coreana núm. 94-0001307), que son innecesarias para la producción de lisina, se inactivan, la generación de espuma durante el cultivo de los microorganismos puede controlarse eficazmente, por consiguiente, aumenta la producción de L-lisina, similar a los resultados de los Ejemplos 5 y 6.

Ejemplo 8: Construcción y evaluación de cepas con proteína secretora inactivada a partir de la cepa productora de L-lisina CJ3P

Para examinar los efectos de la inactivación de proteínas secretoras en *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder y otros Genome Biology 2012, 13: R40) que tienen la capacidad de producir L-lisina, construida mediante la introducción de tres mutaciones [pyc(P458S), hom(V59A) y lysC(T311I)] en una cepa de tipo salvaje, como en los Ejemplos 5, 6 y 7, las cepas en las que cada una de las tres proteínas secretoras se inactivaron se construyeron de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6 o 7. Las cepas construidas se denominaron "CJ3P-ΔNCgl0336", "CJ3P-ΔNCgl0717" y "CJ3P-ΔNCgl2912". Se examinó la cantidad de producción de L-lisina de cada una de las cepas construidas junto con la cantidad de espuma generada.

Para examinar la producción de lisina de las cepas, cada una de las cepas junto con la cepa control se cultivó de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6 o 7. Después de completar el cultivo, la cantidad de espuma generada se midió de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6 o 7, y la concentración de L-lisina se midió por HPLC. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 4 a continuación. Los resultados en la Tabla 4 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la producción de L-lisina se evaluó basada en el valor promedio.

Tabla 4

	Lisina (g/l)			Espuma (cm/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
CJ3P	7,9	8	8,1	8,7	9,1	8,6
CJ3P-ΔNCgl0336	8,5	8,6	8,8	7,8	8,3	7,9
CJ3P-ΔNCgl0717	8,4	8,5	8,7	7,7	7,5	7,2
CJ3P-ΔNCgl2912	8,7	8,6	8,6	8,4	8,6	8,2

Como se muestra en la Tabla 4 anterior, la producción de lisina de la cepa en donde se inactivó cada uno de los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 aumentó aproximadamente un 8 % en comparación con la cepa original CJ3P. Además, la espuma en el cultivo de la cepa en donde se inactivó cada uno de los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 disminuyó aproximadamente de 5-17 % en comparación con el de la cepa original.

Por lo tanto, se encontró que, cuando las principales proteínas secretoras de *Corynebacterium glutamicum* CJ3P, que son innecesarias para la producción de lisina, se inactivan, la generación de espuma durante el cultivo del microorganismo puede controlarse eficazmente, por consiguiente, aumenta la producción de L-lisina, similar a los resultados de los Ejemplos 5, 6 y 7.

Ejemplo 9: Construcción y evaluación de cepas con proteína secretora inactivada a partir de la cepa productora de L-lisina KCCM11016P

Para examinar los efectos de la inactivación conjunta de proteínas secretoras en la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, se construyeron tres cepas en las que los genes de la proteína secretora se inactivaron conjuntamente de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6, 7 y 8. Las cepas construidas en las que se inactivó una combinación de los genes se denominaron "KCCM11016P-ΔNCgl0336/ΔNCgl0717", "KCCM11016P-ΔNCgl0336/ΔNCgl2912", y "KCCM11016P-ΔNCgl0717/ΔNCgl2912", y se examinó la cantidad de producción de L-lisina de cada una de las cepas construidas junto con la cantidad de espuma generada.

Para comparar la producción de lisina de las cepas, cada una de las cepas junto con la cepa control se cultivó de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6, 7 u 8. Después de completar el cultivo, la cantidad de espuma generada se midió de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6, 7 u 8, y la concentración de L-lisina se midió por HPLC. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 5 a continuación. Los resultados en la Tabla 5 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la producción de L-lisina se evaluó basada en el valor promedio.

Tabla 5

	Lisina (g/l)			Espuma (cm/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	43,3	43,1	43,4	4,6	4,9	4,7
KCCM11016P-ΔNCgl0336/ΔNCgl0717	46,1	45,7	45,2	4,4	4	4,2
KCCM11016P-ΔNCgl0336/ΔNCgl2912	45,5	45,9	46,1	4,2	4,3	4,4
KCCM11016P-ΔNCgl0717/ΔNCgl2912	46	45,1	45,7	4	3,9	4,5

5

10 Como se muestra en la Tabla 5 anterior, la producción de lisina de la cepa en la que los genes NCgl0336/NCgl0717, NCgl0336/NCgl2912 o NCgl0717/NCgl2912 se inactivaron conjuntamente aumentó aproximadamente un 5 % en comparación con la cepa original KCCM11016P. Además, la espuma en el cultivo de la cepa en la que los genes NCgl0336/NCgl0717, NCgl0336/NCgl2912 o NCgl0717/NCgl2912 se inactivaron conjuntamente disminuyó aproximadamente de 10-14 % en comparación con la cepa original.

15

Por lo tanto, se encontró que, cuando las principales proteínas secretoras de un microorganismo del género *Corynebacterium*, que son innecesarias para la producción de lisina, se inactivan, la generación de espuma durante el cultivo del microorganismo puede controlarse eficazmente, por consiguiente, aumenta la producción de L-lisina.

20

Ejemplo 10: Construcción y evaluación de la cepa, en la que se inactivaron todas las proteínas secretoras, de la cepa productora de L-lisina KCCM11016P

25

Para examinar los efectos de la inactivación de todas las proteínas secretoras en la cepa productora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, se construyó una cepa en la que las tres proteínas secretoras se inactivaron de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6, 7, 8 o 9. La cepa se denominó "KCCM11016P-ΔNCgl0336/ΔNCgl0717/ΔNCgl2912". Se examinó la cantidad de producción de L-lisina de la cepa construida junto con la cantidad de espuma generada.

30

Para examinar la producción de lisina de la cepa, la cepa junto con la cepa control se cultivó de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6, 7, 8 o 9. Después de completar el cultivo, la cantidad de espuma generada se midió de la misma manera que se describe en los Ejemplos 5, 6, 7, 8 o 9, y la concentración de L-lisina se midió por HPLC. Los resultados de la medición se muestran en la Tabla 6 a continuación. Los resultados en la Tabla 6 son los resultados de tres experimentos repetidos, y la producción de L-lisina se evaluó basada en el valor promedio.

35

Tabla 6

	Lisina (g/l)			Espuma (cm/l)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 1	Lote 2	Lote 3
KCCM11016P	43,4	43,3	43,1	4,7	4,6	5,0
KCCM11016P-ΔNCgl0336/ΔNCgl0717/ΔNCgl2912	46,4	46,3	46,7	3,9	4,1	3,8

40

45 Como se muestra en la Tabla 6 anterior, la producción de L-lisina de la cepa en la que se inactivaron los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 aumentó aproximadamente un 7 % en comparación con la cepa original KCCM11016P. Además, la espuma en el cultivo de la cepa en la que se inactivaron los genes NCgl0336, NCgl0717 y NCgl2912 disminuyó aproximadamente un 17 % en comparación con la cepa original.

50 Por lo tanto, se encontró que, cuando las principales proteínas secretoras de un microorganismo del género *Corynebacterium*, que son innecesarias para la producción de lisina, se inactivan, la generación de espuma durante el cultivo del microorganismo puede controlarse eficazmente, por consiguiente, aumenta la producción de L-lisina.

A partir de los resultados descritos anteriormente, se encontró que la inactivación de las principales proteínas secretoras en la cepa productora de L-lisina tiene el efecto de controlar la espuma que se produce en exceso durante el cultivo, que aumenta por consiguiente la capacidad de producir L-lisina junto con el crecimiento de las células. Las cepas KCCM11016P-ΔNCgl0336, KCCM11016P-ΔNCgl0717 y KCCM11016P-ΔNCgl2912 se denominaron "CA01-2281", "CA01-2279" y "CA01-2280", respectivamente. CA01-2279 y CA01-2280 se depositaron internacionalmente con Korean Culture Center of Microorganisms el 22 de noviembre de 2013 bajo los núms. de orden KCCM11481P (CA01-2279) y KCCM11482P (CA01-2280), respectivamente, y CA01-2281 se depositó internacionalmente con Korean Culture Center of Microorganisms el 13 de diciembre de 2013 bajo el núm. de orden KCCM11502P (CA01-2281).

60

Números de orden

Autoridad depositaria: *Korean Culture Center of Microorganisms*;

Núm. de orden: KCCM11481P;

65

Fecha de depósito: 22 de noviembre de 2013.

Autoridad depositaria: *Korean Culture Center of Microorganisms*;

Núm. de orden: KCCM11482P;

Fecha de depósito: 22 de noviembre de 2013.

Autoridad depositaria: *Korean Culture Center of Microorganisms*;

Núm. de orden: KCCM11502P;

5 Fecha de depósito: 13 de diciembre de 2013.

<110> Corporación CJ Cheiljedang

10 <120> Un microorganismo que ha aumentado la productividad de la L-lisina y el método de producción de la L-lisina utilizando la misma

<130> PA13-0400

15 <160> 18

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 365

20 <212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> PEPTIDO

25 <222> (1)..(365)

<223> Esterasa codificada por el gen NCgl0336

<400> 1

```

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

```

ES 2 796 960 T3

210	215	220
Glu Tyr Leu Lys Leu Thr	Leu Asp Arg Gly Asn Ala Thr Pro Glu Gln	
225	230	235
Met Trp Gly Pro Arg Gly Gly Glu Tyr Asn Ile Tyr Asn Asp Ala Leu		
	245	250
Ile Asn Ser Asp Lys Leu Arg Gly Thr Glu Leu Tyr Val Ser Asn Ala		
	260	265
Ser Gly Leu Ala Gly Glu Trp Glu Ser Val Asp Ser Pro Arg Phe Glu		
	275	280
Gly Leu Asn Gln Gln Val Gln Ser Ile Ala Met Ala Glu Thr Val Val		
	290	295
Thr Gly Gly Ile Ile Glu Ala Ala Thr Asn Lys Cys Thr His Asp Leu		
	300	305
Lys Ala Lys Leu Asp Ser Ala Gly Ile Pro Ala Asp Trp Asn Leu Arg		
	310	315
Pro Thr Gly Thr His Ser Trp Gly Trp Trp Gln Asp Asp Leu Arg Gly		
	325	330
Ser Trp Thr Thr Phe Ala Arg Ala Phe Glu Leu Glu Ala		
	335	340
		345
		350
		355
		360
		365

<210> 2
 <211> 1098
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1098)
 <223> gen NCgl0336

<400> 2

atgaagcttc ttgcgcgcac cgctgcacca gccatcgcgc tgggaattgc gatgtccacc	60
attgtcacgc catccaccgc aggcgctgcc gaagtaaccc cagcagacgt tgctggcgat	120
actgcactat ccaccatctc cgatagtgtc cctgcagatg aagcctctgc acctcgtctg	180
cgcgcacacg tcaacgcagc agacgagcgc gtcaaagaaa tgtgggcata ctccccttcc	240
atggaccgca atgtgccact ggtagttata actgccgatg agtccgcagg tcctcgtcct	300
gtgatttacc ttcttaacgg tggcgacggt ggcgaagggt cgcctaactg ggttatgcag	360
actgacgttc tggatttcta cctagaaaag aacgttaacg ttgttattcc aatggaaggc	420
aagttttcct actacaccga ctgggtagaa gagaatgcgt ccctcgggtg caagcaaagc	480
tgggaaacct tcctggtgaa ggaacttcca ggaccattgg aagaaaagct caacactgac	540
ggtcagcgtg caattgctgg catgtccatg tccgcaacta cttccctact cttcccacaa	600
cacttcccag gcttctacga cgcagcagca tccttctcag gatgcgcagc aacctcaagc	660
ctgctcccat gggaatacct caaactcacc cttgaccgcg gcaacgcaac ccagaacaa	720
atgtggggac cacgtggtgg cgaatacaac atctacaacg acgcactgat caactccgac	780
aaactacgcg gaaccgaact atacgtctcc aacgcacccg gccctgctgg tgaatgggaa	840
tccgtcgaca gccacgcgtt cgaaggactc aaccaacaag ttcagtccat cgcaatggca	900
gaaactgtgg taaccggcgg catcatcgaa gctgcaacca acaagtgcac ccacgacctc	960
aaggcaaaac ttgactccgc cggcatccca gccgactgga acctccgccc aaccggcacc	1020
cactcatggg gctggtggca agatgacctc cgcggatctt ggaccacott cgctcgtgcg	1080
tttgagctag aggcctag	1098

5 <210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 3
 atcctctaga gtcgacgaag cctctgcacc tcgctg 36
 <210> 4
 <211> 35
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 4
 tatagttcgg ttccgctct ccaacgcac cggcc 35
 <210> 5
 <211> 35
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 5
 cggaaccgaa ctataccacc gagggacgca ttctc 35
 <210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 6
 atgcctgcag gtcgacgctc aaacgcacga gcgaag 36
 45 <210> 7
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 50 <220>
 <221> PEPTIDO
 <222> (1)..(261)
 <223> Esterasa codificada por el gen NCgl0717
 55 <400> 7

ES 2 796 960 T3

5 Met Lys Thr Glu Thr Arg Arg Ala Leu Val Phe Ile Val Ala Gly Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Thr Ala Leu Gly Phe Met Val Trp Gln Met Ser Ser Pro
 20 25 30
 Ser Arg Pro Thr Ser Asp Ile Ala Thr Ser Thr Thr Thr Ser Thr Thr
 35 40 45
 Gln Thr Gln Ala Arg Tyr Asp Ser Pro Gly Asn Thr Glu Thr Lys Glu
 50 55 60
 10 Ala Glu Pro Asp Leu Glu Asn Gln Thr Leu Ala Pro Ile Asn Thr Glu
 65 70 75 80
 Asp Pro Tyr Leu Pro Pro Asn Ala Phe Val Arg Pro Asp Asn Gly Arg
 85 90 95
 15 Ser Ser Gly Leu Thr Pro Ser Gly Ser Ser Pro Thr Thr Thr Ser Arg
 100 105 110
 Val Ser Ser Pro Ser Ser Ala Gly Ser Ala Ser Pro Thr Gln Ile Thr
 115 120 125
 20 Ser Arg Ser Asn Glu Pro Ser Glu Pro Gly Asp Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140
 Thr Gln Pro Ser Ser Pro Asp Arg Pro Thr Glu Pro Thr Asn Pro Val
 145 150 155 160
 25 Asp Pro Thr Gly Pro Ser Glu Pro Thr Glu Pro Thr Asp Pro Ile Glu
 165 170 175
 Thr Thr Asp Pro Ile Glu Thr Thr Thr Asp Pro Val Ala Pro Ser Thr Pro
 180 185 190
 Pro Thr Ser Asp Asp Ser Thr Ser Thr Pro Gln Pro Asp Glu Ser Asp
 195 200 205
 30 Thr Pro Pro Thr Asp Phe Val Glu Glu Pro Thr Ala Pro Leu Asn Pro
 210 215 220
 Asp Gln Pro Ala Gly Ser Thr Thr Asp Ala Thr Pro Asn Ala Thr Pro
 225 230 235 240
 35 Ser Ala Pro Ala Asp Thr Thr Ser Asn Ser Val Ala Asn Ser Val Glu
 245 250 255
 Pro Thr Ala Thr Ser
 260

40 <210> 8
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium glutamicum*
 45 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(786)
 <223> gen NCgl0717
 50 <400> 8

ES 2 796 960 T3

	atgaaaacag aaactcgacg agccctcgtc ttcctcgctg ccggtgttt agccgccacc	60
5	gccctgggtt ttatggtctg gcagatgtcc agcccaagcc gaccacctc tgatattgcc	120
	acgtctacta ctacgtctac caccctaaacc caggctaggt acgattcccc aggtaataca	180
	gagaccaaag aggcggaacc tgacctagaa aaccaaactt tggcgcccat caacaccgaa	240
10	gatccatata ttccaccgaa tgcttttctg cgtccagaca atggccgaag ctccggttta	300
	acccttctg gcagttctcc aactaccacc tctcgggtga gttctccctc ctcagcagga	360
15	tcggaagcc cgactcaaat cacctccagg tcaaacgagc ctagtgaacc tggatgatgag	420
	tcaactgctg ctacacaacc gtcgagccca gacaggccaa ccgaacctac aaatccggtta	480
	gacccaactg gaccttctga acctaccgaa cccaccgata cgattgagac aaccgatccg	540
20	attgagacaa ccgatccggt agctccgtcc accccgcca cgagcgatga ttcaacaagc	600
	actcccaac cagatgagtc tgatacgcca cctaccgatt tcgtagagga acctactgct	660
25	cctctcaatc cggatcagcc agccggttca actactgatg cgacgcaaaa cgcaacacca	720
	agcgccaccg ctgacacaac atccaattct gtatctaact ctgtggaacc aactgccacg	780
	agctaa	786
30	<210> 9	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 9	
40	ccggggatcc tctagagttc gcggataaat ggg 33	
	<210> 10	
	<211> 36	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
50	<400> 10	
	cacgtgaaat tcaggctcgc tgggtcacct ccgaag 36	
	<210> 11	
	<211> 36	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
60	<400> 11	
	cttcggaggt gaaccacgcg acctgaattt cacgtg 36	
	<210> 12	
65	<211> 34	
	<212> ADN	

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador

5
<400> 12
gcaggtcgac tctagaggtc ccatgattgt tctg 34

10
<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> *Corynebacterium glutamicum*

15
<220>
<221> PEPTIDO
<222> (1)..(107)
<223> Esterasa codificada por el gen NCgl2912

20
<400> 13

Met	Arg	Lys	Leu	Arg	Thr	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Ala	
1				5					10					15		
Leu	Ala	Leu	Thr	Ala	Thr	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Ser	Thr	Thr	Gly	Ser	
			20				25						30			
Ser	Ala	Ser	Ser	Gln	Val	Gly	Asp	Ala	Leu	Gly	Ala	Ser	Asp	Tyr	Glu	
		35				40						45				
Arg	Asp	Ile	Trp	Gly	Ser	Ser	Lys	Asp	Phe	Asp	Asp	Val	Thr	Pro	Phe	
	50					55					60					
Gly	Ser	Ala	Trp	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Leu	Ala	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Ile	
65					70					75					80	
Ser	Gly	Leu	Val	Tyr	Ala	Asn	Leu	Pro	Ala	Ile	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	
				85					90					95		
Gln	Ala	Gly	Ile	Lys	Leu	Glu	Ile	Pro	Arg	Tyr						
			100					105								

40
<210> 14
<211> 324
<212> ADN
<213> *Corynebacterium glutamicum*

45
<220>
<221> gen
<222> (1)..(324)
<223> gen NCgl2912

50
<400> 14

atgcgtaa	ac	ttcgtact	gc	ttccgttg	ca	ctgctgacc	g	caggtgcact	tg	cactgacc		60
gctactcct	g	caatggct	ca	gtccaccacc	gg	tctctctg	catcttctca	ggttg	ggcgac		120	
gcactcggt	g	ctagcgacta	cgagcgcgac	atctgggg	tt	cctctaagga	cttcgacgat				180	
gtaaccccat	tcggttcgc	ttggtacggc	tacaccctg	ccgcaaccgc	agttgctatc						240	
tccggtcttg	tgtacgcaaa	ccttcctgca	atcgagcagg	ctgctgcaca	ggccggcatc						300	
aagctggaga	tcccacgcta	ctaa									324	

65
<210> 15
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador
 5 <400> 15
 ccggggatcc tctagagctg caagaagtgc gac 33
 <210> 16
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 16
 ctcgtagtcg ctagcaccta ttacgggagg tc 32
 <210> 17
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 17
 gacctcccg aataggtgct agcgactacg ag 32
 <210> 18
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 18
 gcaggtcgac tctagaccg agctatctaa cac 33
 40

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo productor de L-lisina del género *Corynebacterium* en el que al menos una proteína secretora seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7 y 13 se inactiva.
2. El microorganismo productor de L-lisina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
3. Un método para producir L-lisina, que comprende las etapas de:
cultivar un microorganismo para producir L-lisina en el medio de cultivo o en la célula del microorganismo; y recuperar la L-lisina del medio de cultivo o la célula, en donde el microorganismo es un microorganismo productor de L-lisina del género *Corynebacterium* en el que al menos una proteína secretora seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 7 y 13 se inactiva.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.