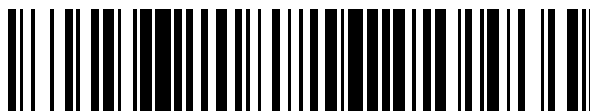


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 145**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/77 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.04.2015 PCT/KR2015/004092**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15174655**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2015 E 15792954 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3144383**

54 Título: **Microorganismo del género *Corynebacterium* de producción de lisina y procedimiento de producción de lisina usando el mismo**

30 Prioridad:

14.05.2014 KR 20140057966

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

25.02.2021

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
Dongho-ro 330, Ssangnim-dong, Jung-gu
Seoul 100-400, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SEUNG BIN;
KIM, HYUNG JOON;
HUR, LAN y
MOON, JUN OK**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 808 145 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* de producción de lisina y procedimiento de producción de lisina usando el mismo

Campo técnico

- 5 La presente solicitud se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* productor de L-lisina y a un procedimiento de producción de L-lisina usando el mismo.

Técnica anterior

La L-lisina es biosintetizada a partir de un precursor oxalacetato por una vía biosintética de lisina, y el oxalacetato es degradado a piruvato y dióxido de carbono por oxalacetato-decarboxilasa (odx).

- 10 Anteriormente, Simon Klaffl and Bernhard J. Eikmanns simplemente demostraron que un gen cg1458 codifica la oxalacetato-decarboxilasa confirmando que la sobreexpresión del gen intrínseco cg1458 en *Corynebacterium glutamicum* aumenta la actividad de la oxalacetato-decarboxilasa y también disminuye la producción de L-lisina, y la actividad de la oxalacetato-decarboxilasa se ve atenuada por la inactivación del gen, pero no demostraron cambios en la producción de L-lisina por la inactivación del cg1458 (Klaffl S, Eikmanns BJ, et al., J. Bacteriol., May 2010, 192(10), p.2604-12). Sin
15 embargo, los inventores de la presente predijeron que cuando es inhibida la actividad de oxalacetato-decarboxilasa intrínseco en una cepa de *Corynebacterium* productora de L-lisina, el suministro de oxalacetato para la vía biosintética de L-lisina aumenta sin que sea consumido oxalacetato en otras vías, e inactivaron el gen de la oxalacetato-decarboxilasa en diferentes clases de cepas productoras de L-lisina. Como resultado, los inventores de la presente descubrieron que la inactivación del gen de oxalacetato-decarboxilasa da lugar a la mejora de la capacidad de producción de L-lisina de la
20 cepa, completando así la presente solicitud.

Descripción detallada de la invención

Problema técnico

La invención es definida en las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, un objeto de la presente solicitud es proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* productor de L-lisina.

- 25 Otro objeto de la presente solicitud es proporcionar un procedimiento de producción de L-lisina usando el microorganismo del género *Corynebacterium*.

Solución técnica

Para lograr los objetos mencionados con anterioridad, un aspecto de la presente solicitud proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* productor de L-lisina, en el que una actividad de oxalacetato-decarboxilasa es inactivada.

- 30 Además, otro aspecto de la presente solicitud proporciona un procedimiento de producción de L-lisina mediante el cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium*.

Efectos ventajosos de la invención

- 35 La presente solicitud proporciona un microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* con producción potenciada de L-lisina por la inactivación de un gen de oxalacetato-decarboxilasa en una cepa de *Corynebacterium* productora de L-lisina. El microorganismo recombinante del género *Corynebacterium* es capaz de producir L-lisina con un alto rendimiento, por lo que tiene aplicaciones de utilidad industrial.

Descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un vector pDZ- Δ odx para eliminar un gen odx en el cromosoma de *Corynebacterium*.

Modo de la invención

- 40 En adelante en la presente memoria, la presente solicitud es descrita en detalle.

- Un aspecto de la presente solicitud proporciona un microorganismo del género *Corynebacterium* con producción potenciada de L-lisina por la inactivación de la actividad de oxalacetato-decarboxilasa, en el que oxalacetato-decarboxilasa tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NÚM.: 1, en el que el microorganismo tiene una productividad de L-lisina potenciada en comparación con un microorganismo no modificado, y en el que el
45 microorganismo comprende el gen *aspB*, el gen *lysC*, el gen *asd*, el gen *dapA*, el gen *dapB* y el gen *lysA*.

Oxalacetato-decarboxilasa (odx) es una enzima que cataliza la degradación del oxalacetato en piruvato y dióxido de carbono, y puede ser usada una enzima derivada de cualquier microorganismo, a condición de que la enzima tenga la

actividad mencionada. Específicamente, puede ser usada una enzima derivada de un microorganismo Corniforme y, más específicamente, una enzima derivada de *Corynebacterium glutamicum*, pero sin limitación a esta.

La oxalacetato Descarboxilasa de la presente solicitud tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NÚM.: 1, y puede ser codificada por el gen *odx* que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NÚM.: 2. También puede ser incluida en la presente solicitud cualquier variante de la secuencia de nucleótidos anterior que codifica la misma secuencia de aminoácidos, que resulta de la degeneración del código genético.

El término "homología", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grado de coincidencia con una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos determinada, y la homología puede ser expresada como un porcentaje. Una homología de secuencia que tiene una actividad idéntica o similar a la secuencia de aminoácidos o a la secuencia de nucleótidos dada es expresa como "% de homología". La homología de secuencia puede ser determinada, por ejemplo, mediante el algoritmo BLAST [véase Karlin and Altschul, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)] o FASTA de Pearson [véase Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]. En base a este algoritmo, ha sido desarrollado un programa denominado BLASTN o BLASTX [véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. La homología de secuencia también puede ser identificada por comparación de las secuencias en un experimento de hibridación Southern bajo condiciones rigurosas como las definidas, y la definición de condiciones de hibridación adecuadas están dentro de la habilidad de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, infra.), y pueden ser determinadas por un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica.

El término "inactivación", como se usa en la presente memoria, significa que la actividad es atenuada en forma adicional o eliminada, en comparación con la actividad de una proteína producida en estado natural o en estado no modificado de un microorganismo original, y la inactivación puede ser realizada mediante cualquier procedimiento de inactivación conocido en la técnica. En la presente solicitud, la inactivación de oxalacetato Descarboxilasa significa que el gen *odx* intrínseco es expresado a un nivel bajo o no es expresado, en comparación con el de una cepa madre o una cepa no modificada, o la actividad es eliminada o disminuida, aunque el gen sea expresado.

Específicamente, la actividad intrínseca de oxalacetato Descarboxilasa puede ser inactivada por la introducción de un vector recombinante que incluya una parte del gen que codifica oxalacetato Descarboxilasa en un microorganismo para eliminar o mutar el gen intrínseco de oxalacetato Descarboxilasa, la expresión de la proteína puede ser atenuada mediante la modificación de una secuencia de nucleótidos de una región promotora o una región 5'-UTR del gen, o la actividad de la proteína puede ser atenuada introduciendo una mutación en una región ORF del gen correspondiente. Además, la inserción del gen en el cromosoma puede ser realizada por cualquier procedimiento conocido en la técnica.

El término "actividad intrínseca", como se usa en la presente memoria, se refiere a la actividad de proteína de un microorganismo original en estado natural o no modificado.

Más específicamente, la inactivación puede ser causada por una alteración genética específica del sitio, pero no está limitada a esto.

El término "vector recombinante", como se usa en la presente memoria, se refiere a una construcción de ADN que incluye una secuencia de polinucleótidos de un polinucleótido que codifica una proteína diana, que está vinculada operativamente a una secuencia reguladora adecuada para que la proteína diana pueda ser expresada en un huésped adecuado. La secuencia reguladora puede incluir un promotor capaz de iniciar la transcripción, cualquier secuencia operadora para regular la transcripción, una secuencia que codifique un sitio adecuado de unión al ribosoma del ARNm y una secuencia que regule la terminación de la transcripción y la traducción. El vector, tras ser transformado en una célula huésped adecuada, puede replicarse o funcionar independientemente del genoma huésped, o puede ser integrado en el propio genoma. El vector usado en la presente solicitud no está particularmente limitado, a condición de que el vector sea replicable en el huésped, y pueda ser usado cualquier vector conocido en la técnica.

El término "transformación", como se usa en la presente memoria, significa que un gen es introducido en una célula huésped, permitiendo así la expresión del gen en la célula huésped. El gen transformado puede estar localizado dentro o fuera del cromosoma de la célula huésped, a condición de que pueda ser expresado en la célula huésped. El gen puede ser introducido en cualquier forma, a condición de que pueda ser introducido en la célula huésped y expresado en esta.

Como una célula madre en la que es introducido el vector recombinante, puede ser usado cualquier microorganismo del género *Corynebacterium*, a condición de que el microorganismo sea capaz de producir L-lisina. Específicamente, puede ser usada *Corynebacterium glutamicum*.

En una realización específica de la presente solicitud, es construido un vector recombinante por la inserción de una parte del gen *odx* en un vector pDZ (Patente de Corea Núm. 0924065) que no es replicable en *Corynebacterium glutamicum*, y es permitida la transformación del vector recombinante en un microorganismo y la recombinación homóloga del vector recombinante en el cromosoma para la preparación del microorganismo del género *Corynebacterium* con una producción potenciada de L-lisina, en el que oxalacetato-carboxilasa es inactivada, pero la presente solicitud no se limita a esto.

Todas las cepas de *Corynebacterium glutamicum* preparadas en una realización de la presente solicitud mostraron una producción potenciada de L-lisina, en comparación con la cepa madre, lo que indica que son capaces de producir L-lisina con un alto rendimiento por inactivación del gen *odx*.

Otro aspecto de la presente solicitud proporciona un procedimiento de producción de L-lisina mediante el cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium*. Más detalladamente, es proporcionado un procedimiento de producción de L-lisina, incluyendo el procedimiento la producción de L-lisina en un cultivo o células del microorganismo mediante el cultivo del microorganismo de la presente solicitud; y la recuperación de L-lisina a partir del cultivo o células del microorganismo, en el que el microorganismo es del género *Corynebacterium* en el que la vía de biosíntesis de L-lisina está potenciada y oxalacetato-decarboxilasa que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NÚM.: 1 es inactivada, y en el que el microorganismo es un microorganismo definido en las reivindicaciones.

En el procedimiento de la presente solicitud, el cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium* puede ser realizado usando cualquier condición y procedimiento de cultivo conocido en la técnica, pero no está limitado al siguiente ejemplo.

Un medio que puede ser usado para el cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium* puede ser ejemplificado por los medios desvelados en Manual of Methods for General Bacteriology by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

Las fuentes de carbono a ser usadas en el medio pueden incluir sacáridos y carbohidratos tal como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, el almidón y celulosa, aceites y lípidos tal como aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos tal como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tal como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tal como ácido acético. Estos materiales pueden ser usados por separado o en una mezcla.

Las fuentes de nitrógeno a ser usadas pueden incluir peptona, extracto de levadura, caldo de carne, extracto de malta, licor de maíz, harina de soja y urea, o los compuestos inorgánicos, por ejemplo, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno también pueden ser usadas por separado o en una mezcla.

Las fuentes de fósforo a ser usadas pueden ser hidrógeno fosfato dipotásico, dihidrógeno fosfato potásico, o sales que contienen sodio correspondientes, y el medio de cultivo puede incluir sales metálicas tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro requerido para el crecimiento. Además de estos materiales, pueden ser usados materiales de crecimiento esenciales tal como aminoácidos y vitaminas. Además, pueden ser añadidos precursores adecuados al medio de cultivo. Estos materiales pueden ser añadidos al cultivo durante el cultivo por un procedimiento adecuado en un lote o en modo continuo.

Durante el cultivo del microorganismo, el pH del cultivo puede ser ajustado con un compuesto básico tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amoníaco, o un compuesto ácido tal como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. La generación de espuma puede ser restringida usando un agente antiespumante tal como éster de poliglicol de ácidos grasos. Para mantener las condiciones aeróbicas, puede ser introducido en el cultivo oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire). La temperatura del cultivo puede estar generalmente entre 20°C y 45°C, y específicamente, entre 25°C y 40°C. El cultivo puede continuar hasta que sea producida una cantidad deseada de L-lisina. Específicamente, el tiempo de cultivo puede ser de 10 a 160 horas.

En el procedimiento de la presente solicitud, el cultivo puede ser realizado de manera continua o por lotes, tal como un proceso por lotes, un proceso de alimentación por lotes y un proceso de alimentación por lotes repetido. El procedimiento de cultivo es bien conocido en la técnica, y puede ser usado cualquier procedimiento.

En adelante en la presente memoria, la presente solicitud será descrita con más detalle con referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos tienen sólo fines ilustrativos, y el alcance de la presente solicitud no pretende ser limitado por estos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: construcción de un vector recombinante para inactivación del gen *odx* derivado de *Corynebacterium*

Con el fin de inactivar un gen *odx* (SEQ ID NÚM.: 2) que codifica oxalacetato-decarboxilasa de *Corynebacterium glutamicum* que tiene una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NÚM.: 1 por la alteración de un gen específico del sitio, fue construido un vector plásmido por el siguiente procedimiento. En primer lugar, en base a NIH Genbank (USA), fue obtenida una secuencia nucleotídica del gen *odx*, y en base a esta secuencia fueron sintetizados cebadores para la preparación de fragmentos inactivados del gen *odx*.

Fue realizada PCR [Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] usando el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 de tipo silvestre como plantilla e iniciadores de la SEQ ID NÚM.: 3 y SEQ ID NÚM.: 4, SEQ ID NÚM.: 5 y SEQ ID NÚM.: 6. Después de la desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, fueron repetidos 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, recocido a 55°C durante 30 segundos, y polimerización a 72°C durante 30 segundos, y luego fue realizada la polimerización a 72°C durante 7 minutos. Como un resultado, fueron obtenidas la SEQ ID NÚM.: 7 de 536 pb y la SEQ ID NÚM.: 8 de 534 pb incluyendo el extremo 5' y el extremo 3' del gen *odx*, respectivamente.

SEQ ID NÚM.: 3: 5'-TCTAGAACGATGAAATCGCCGCGGGT-3'

SEQ ID NÚM.: 4: 5'-GGGTTGCCAGCTTGCCGATCACGGGGGTGAGGTTAGCT-3'

SEQ ID NÚM.: 5: 5'-AGCTAACCTCCCCCGTGATCGGCAAGCTGGGCAACCC-3'

SEQ ID NÚM.: 6: 5'-TCTAGAGGTTGCTGCGGATTCTGATT-3'

5 Fue realizado PCR usando la SEQ ID NÚM.: 7 y la SEQ ID NÚM.: 8 amplificados como una plantilla y la SEQ ID NÚM.: 3 y la SEQ ID NÚM.: 6. Después de la desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, fueron repetidos 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, recocido a 55°C durante 30 segundos y polimerización a 72°C durante 60 segundos, y luego fue realizada la polimerización a 72°C durante 7 minutos. Como un resultado, fue amplificada la SEQ ID NÚM.: 9 (en adelante en la presente memoria, referida Δ odx) de 1030 pb, en la que el extremo 5' y el extremo 3' del gen *odx* estaban unidos entre sí.

Un vector pDZ (Patente de Corea Núm. 0924065) no replicable en *Corynebacterium glutamicum* y el fragmento de ADN amplificado Δ odx fueron tratados con una enzima de restricción XbaI, respectivamente, y luego, ligados entre sí usando ADN ligasa. Fue realizada clonación para obtener un plásmido. Este plásmido fue designado pDZ- Δ odx (FIG. 1).

Ejemplo 2: inactivación de *odx* en *Corynebacterium productora de L-lisina* y análisis de la producción de L-lisina

15 pDZ- Δ odx preparado en el Ejemplo 1 fue transformado en cepas productoras de L-lisina, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P y KCCM11347P por un procedimiento de pulso eléctrico (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545), respectivamente, y las cepas transformadas fueron obtenidas en un medio de selección que contenía 25 mg/L de kanamicina. Las cepas que tenían el gen *odx* inactivado fueron obtenidas mediante el fragmento de ADN Δ odx insertado en el genoma por recombinación secundaria (cross-over), y las cepas fueron designadas KCCM11016P/ Δ odx y KCCM11347P/ Δ odx, respectivamente.

Con el fin de examinar si la inactivación del gen *odx* realmente influye en el aumento de la producción de lisina, las cepas inactivadas por *odx*, KCCM11016P/ Δ odx y KCCM11347P/ Δ odx fueron cultivadas por el siguiente procedimiento y su producción fue examinada.

25 Cada una de las cepas fue inoculada en un matraz de 250 ml con deflectores en las esquinas que contenía 25 ml del siguiente medio de cultivo, seguido de un cultivo a 37°C durante 20 horas bajo agitación a 200 rpm. Fue inoculado 1 ml del cultivo de semillas en un matraz de 250 ml con deflectores en las esquinas que contenía 24 ml del siguiente medio de producción, seguido de un cultivo a 30°C durante 72 horas con agitación a 200 rpm.

*** Composición del medio de siembra (pH 7,0):**

30 20 g de glucosa, 10 g de peptona, 10 g de extracto de levadura, 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 HCl de tiamina (en 1 litro de agua de proceso).

*** Composición del medio de producción (pH 7,0):**

35 80 g de glucosa, 20 g de melaza o melaza pretratada (como azúcar reductor), 5 g de licor de maíz, 40 g de (NH₄)₂SO₄, 4 g de urea, 1 g de KH₂PO₄, 2,5 g de NaCl, 1 g de MgSO₄·7H₂O, 10 mg de FeSO₄·7H₂O, 10 mg de MnSO₄·5H₂O, 100 µg de biotina, 200 µg de tiamina HCl, 40 g de CaCO₃, si es necesario, 0,4 g de L-leucina, si es necesario, 0,1 g de L-treonina, si es necesario, 0,1 g de L-metionina (en 1 litro de agua de proceso).

Una vez completo el cultivo, la producción de L-lisina fue medida por HPLC. Como un resultado, el contenido de L-lisina en el cultivo de cada cepa era como en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

	Cepa	L-lisina (g/l)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
Grupo de control	KCCM11016P	43,1	43,0	43,0	43,0
Grupo experimental	KCCM11016P/ Δ odx	44,8	44,8	44,9	44,8
Grupo de control	KCCM11347P	38,1	38,1	37,9	38,0
Grupo experimental	KCCM11347P/ Δ odx	39,5	39,6	39,6	39,6

Como es mostrado en la Tabla 1, las cepas inactivadas por *odx*, KCCM11016P/ Δ *odx* y KCCM11347P/ Δ *odx* demostraron un aumento de aproximadamente 4,2% en la producción de L-lisina, en comparación con sus cepas madre, KCCM11016P y KCCM11347P, respectivamente.

Entre estas, la cepa KCCM11016P/ Δ *odx* fue designada como CA01-2276, y depositada en la autoridad internacional de depósito, el Korean Culture Center of Microorganisms, que es la Subsidiary Culture Collection of the Korean Federation of Culture Collections ubicada en 361-221, Hongje-1-Dong, Seodaemun-gu, Seoul, Korea, el 22 de noviembre de 2013 bajo el número de adhesión KCCM11478P.

Ejemplo 3: inactivación de *odx* en *Corynebacterium* con vía biosintética de L-lisina, productora de L-lisina, y análisis de la producción de lisina

pDZ- Δ *odx* preparado en el Ejemplo 1 fue transformado en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* KCCM10770P (Patente de Corea Núm. 10-0924065) productora de L-lisina potenciada por vía biosintética, de la misma manera que en el Ejemplo 2 para preparar una cepa transformada, que fue designada KCCM10770P/ Δ *odx*.

A fin de examinar si la inactivación del gen *odx* influye realmente en el aumento de la producción de L-lisina, la cepa inactivada por *odx*, KCCM10770P/ Δ *odx* fue cultivada de la misma manera que en el Ejemplo 2, y su producción fue examinada. El contenido de L-lisina en el cultivo de cada cepa era como en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2

	Cepa	L-lisina (g/l)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
Grupo de control	KCCM10770P	47,0	47,1	46,9	47,0
Grupo experimental	KCCM10770P/ Δ <i>odx</i>	50,1	50,0	50,0	50,0

Como es mostrado en la Tabla 2, la cepa activada por *odx*, KCCM10770P/ Δ *odx* mostró un aumento de 6,4% en la producción de L-lisina, en comparación con la cepa madre, KCCM10770P.

Ejemplo 4: inactivación de *odx* en *Corynebacterium* productora de L-lisina de origen silvestre y análisis de producción de lisina

pDZ- Δ *odx* preparado en el Ejemplo 1 fue transformado en una cepa de *Corynebacterium glutamicum* CJ3P (Binder *et al.* Genome Biology 2012, 13:R40, pyc (P458S), hom (V59A), lysC (T311I)) productora de L-lisina de origen silvestre, de la misma manera que en el Ejemplo 2 para preparar una cepa transformada, que fue designada CJ3P/ Δ *odx*.

A fin de examinar si la inactivación del gen *odx* influye realmente en el aumento de la producción de lisina, la cepa inactivada por *odx*, CJ3P/ Δ *odx* fue cultivada de la misma manera que en el ejemplo 2, y su producción fue examinada. El contenido de L-lisina en el cultivo de cada cepa era como en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3

	Cepa	L-lisina (g/l)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
Grupo de control	CJ3P	7,9	8,0	8,0	8,0
Grupo experimental	CJ3P/ Δ <i>odx</i>	8,2	8,3	8,3	8,3

Como es mostrado en la Tabla 3, cuando fue inactivado *odx* en la cepa madre CJ3P, que es la cepa productora de L-lisina de origen silvestre, también fue observado un aumento de aproximadamente 3,8% en la producción de lisina.

En consecuencia, los solicitantes de la presente demostraron en los Ejemplos 2 a 4 que el aumento de la producción de lisina era observada comúnmente en diferentes clases de microorganismos del género *Corynebacterium* mediante la inactivación del gen *odx*, lo que indica que la inactivación del gen *odx* es un rasgo eficaz en la producción de L-lisina.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Un microorganismo del género *Corynebacterium* con productividad potenciada de lisina y procedimiento de producción de lisina usando el mismo

<130> PX048854PCT

5 <150> KR 14/057,966

<151> 2014-05-14

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

10 <211> 268

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 1

```

Met Arg Phe Gly Arg Ile Ala Thr Pro Asp Gly Met Cys Phe Cys Ser
 1          5          10          15

Ile Glu Gly Glu Gly Asp Asp Val Ala Asn Leu Thr Ala Arg Glu Ile
      20          25          30

Glu Gly Thr Pro Phe Thr Glu Pro Lys Phe Thr Gly Arg Glu Trp Pro
      35          40          45

Leu Lys Asp Val Arg Leu Leu Ala Pro Met Leu Pro Ser Lys Val Val
 50          55          60

Ala Ile Gly Arg Asn Tyr Ala Asp His Val Ala Glu Val Phe Lys Lys
 65          70          75          80

Ser Ala Glu Ser Leu Pro Pro Thr Leu Phe Leu Lys Pro Pro Thr Ala
      85          90          95

Val Thr Gly Pro Glu Ser Pro Ile Arg Ile Pro Ser Phe Ala Thr Lys
      100          105          110

Val Glu Phe Glu Gly Glu Leu Ala Val Val Ile Gly Lys Pro Cys Lys
      115          120          125

Asn Val Lys Ala Asp Asp Trp Lys Ser Val Val Leu Gly Phe Thr Ile
      130          135          140

Ile Asn Asp Val Ser Ser Arg Asp Leu Gln Phe Ala Asp Gly Gln Trp
      145          150          155          160

Ala Arg Ala Lys Gly Ile Asp Thr Phe Gly Pro Ile Gly Pro Trp Ile
      165          170          175

Glu Thr Asp Ile Asn Ser Ile Asp Leu Asp Asn Leu Pro Ile Lys Ala
      180          185          190

Arg Leu Thr His Asp Gly Glu Thr Gln Leu Lys Gln Asp Ser Asn Ser
      195          200          205

Asn Gln Met Ile Met Lys Met Gly Glu Ile Ile Glu Phe Ile Thr Ala
      210          215          220

Ser Met Thr Leu Leu Pro Gly Asp Val Ile Ala Thr Gly Ser Pro Ala

```

15

ES 2 808 145 T3

225					230					235					240
Gly	Thr	Glu	Ala	Met	Val	Asp	Gly	Asp	Tyr	Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Pro
				245					250					255	
Gly	Ile	Gly	Lys	Leu	Gly	Asn	Pro	Val	Val	Asp	Ala				
			260					265							

$\langle 210 \rangle$ 2

<211> 807

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

$\langle 400 \rangle$ 2

atg	cgtttttg	gacgaattgc	caccccgat	ggaatgtgtt	tttgctcaat	tgaaggcgaa	60
ggc	gatgatg	tagctaacct	caccgcccgt	gagatcgagg	gtaccccctt	cactgaacca	120
aag	ttaccg	gtcgcgaatg	gccacttaaa	gatgtacgcc	tgctggcacc	aatgctgcc	180
agc	aaagtcg	tcgcgattgg	ccgtaactac	gccgatcacg	ttgctgaggt	gtttaagaag	240
tcc	gcagaat	cactgccacc	aaccctgttc	ctgaagccac	caacagctgt	caccggacca	300
gag	tcccca	tccgaatccc	ttcctttgcc	accaaggtgg	aattcgaagg	tgagctcgca	360
gtag	ttatcg	gcaagccctg	caagaacgtc	aaggctgatg	actggaagtc	tgtcgttttg	420
ggc	ttacca	tcatacaacg	cgtctcctcc	cgtgacctcc	agttcgtcga	cggccagtgg	480
gcac	gcgcta	agggcattga	caccttcggc	cccacggac	catggattga	aactgacatc	540
aact	ccatcg	acttggaaca	cctgcccatc	aaggcacgcc	tcacccaacg	cggcgaaacc	600
caatt	gaagc	aggactccaa	ctccaaccag	atgatcatga	agatgggcga	aattatcgag	660
ttcat	caccg	cctccatgac	cctgctccca	ggcgacgtta	ttgcaaccgg	ttctccagca	720
ggc	accgaag	caatggttga	cggcgactac	atcgaaatcg	aaattccagg	catcggcaag	780
ctggg	caacc	cagttgtgga	cgcctaa				807

$\langle 210 \rangle$ 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 3

tctagaacga tgaaatcgcc gcggggt 26

<210> 4

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 808 145 T3

<220>
 <223> cebador
 <400> 4
 ggggtgcccc gcttgccgat cacgggcggt gaggttagct 40
 5 <210> 5
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> cebador
 <400> 5
 agctaaccct accgcccgtg atcggaagc tgggcaacc 40
 <210> 6
 <211> 26
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
 20 tctagaggtt gctgcggatt ctgatt 26
 <210> 7
 <211> 536
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> odx terminal 5'
 <400> 7
 tctagaacga tgaaatcgcc gcgggtatcg acatcaaaga ggcgcttggc caactactgc 60
 aggcgctcca gggacgcgcc atgctggcgc atttttcacc catcgagcgc gattttattt 120
 cgcccgcatg cctcaagcat ttcggaacgc ttctcgacgt cccctcgtg gatacttttg 180
 ccatggaacg ccgccacatg gagaggatgt ccacctacc acgtggcgaa gacctccggc 240
 ttgcacgcat tcgacaacga tatggtcttc ccaattactc caatcaccag gcattaaccg 300
 acgcttttggc gtgcgccgag gtgtatttgg tgcagatcac gcaccttcgg gcgaacaccc 360
 tcaaagatat ttgggaatag gggcatcgt gcaggccccc acaccaacg cgtaacataa 420
 cggtcatgcg ttttggacga attgccaccc cagatggaat gtgtttttgc tcaattgaag 480
 gcgaaggcga tgatgtagct aacctcaccg cccgtgatcg gcaagctggg caaccc 536

ES 2 808 145 T3

<210> 8

<211> 534

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> odx terminal 3'

<400> 8

agctaaccctc accgcccgtg atcggcaagc tgggcaaccc agttgtggac gcctaaaatg	60
gatcaccacc atcacgatca tggggagaag cgtccgtacg accaggtcac cccagaatcc	120
atggagaatc aatacaccac cacggaacaa gtctggagcg gcaaccccaa ccaagcactc	180
atcgcctact tgggtgaaga gccagctgaa ggcaccgcac tagacattgg ctgtggcgaa	240
ggcgtgacc tcgtgtggct gtcctccaag ggatacgtca ccaccggcat cgacttcgca	300
ccaactgcag tgaagcgcgc gaaacaaaac gccccatcag ccgaagtcct cttggtatca	360
ttcaccgaat tcgccatcga atccggtcgc caattcgacc tcgtcagctg ctcgtacggc	420
caaatcccag ccaacgacac ctccgtcgcg caactggaaa acctcgtcgc acccggcgga	480
accctcctgt tcaccacca cgactttgaa tcagaatccg cagcaacctc taga	534

10

<210> 9

<211> 1030

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> odx

<400> 9

ES 2 808 145 T3

tctagaacga tgaaatcgcc gcgggtatcg acatcaaaga ggcgcttggc caactactgc	60
aggcgctcca gggacgcgcc atgctggcgc atttttcacc catcgagcgc gattttattt	120
cggccgcatg cctcaagcat ttcggaacgc ttctcgacgt cccctcgtg gatacttttg	180
ccatggaacg ccgccacatg gagaggatgt ccacctaccc acgtggcgaa gacctccggc	240
ttgcacgcat tcgacaacga tatggtcttc ccaattactc caatcaccag gcattaaccg	300
acgctttggc gtgcgcgag gtgtatttgg tgcagatcac gcaccttcgg gcgaacaccc	360
tcaaagatat ttgggaatag gggtcacgt gcaggcccc acaccaacg cgtaacataa	420
cggtcatcgc ttttggaacga attgccaccc cagatggaat gtgtttttgc tcaattgaag	480
gcgaaggcga tgatgtagct aacctcaccg ccctgatcg gcaagctggg caaccagtt	540
gtggacgcct aaaatggatc accaccatca cgatcatggg gagaagcgtc cgtacgacca	600
ggtcacccca gaatccatg agaatcaata caccaccag gaacaagtct ggagcggcaa	660
ccccaaccaa gcactcatcg cctacttggg tgaagagcca gctgaaggca ccgcactaga	720
cattggctgt gccgaaggcg ctgacctcgt gtggctgtcc tccaagggat acgtcaccac	780
cggcatcgac ttgcaccaa ctgcagtga ggcgcgaaa caaaacgccc catcagccga	840
agtctcttg gtatcattca ccgaattcgc catcgaatcc ggtcgccaat tcgacctcgt	900
cagctgctcg tacggccaaa tcccagccaa cgacacctcc gtcgcgcaac tggaaaacct	960
cgtcgacccc ggcggaaccc tcctgttcac ccaccacgac tttgaatcag aatccgcagc	1020
aacctctaga	1030

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo del género *Corynebacterium* productor de L-lisina, en el que la vía de biosíntesis de L-lisina está potenciada y la oxalacetato-decarboxilasa que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NÚM.: 1 está inactivada, en el que el microorganismo tiene una productividad de L-lisina potenciada en comparación con un microorganismo no modificado, y en el que el microorganismo comprende el gen *aspB*, el gen *lysC*, el gen *asd*, el gen *dapA*, el gen *dapB* y el gen *lysA*.
2. El microorganismo del género *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
- 10 3. El microorganismo del género *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el microorganismo comprende una mutación por eliminación o interrupción del gen que codifica la oxalacetato-carboxilasa.
- 15 4. Un procedimiento de producción de un microorganismo del género *Corynebacterium* con una productividad de L-lisina potenciada en comparación con un microorganismo no modificado, comprendiendo el procedimiento proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* en el que la vía de biosíntesis de L-lisina está potenciada y oxalacetato-decarboxilasa que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NÚM.:1 es inactivada, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* en el que la vía de biosíntesis de L-lisina está potenciada comprende el gen *aspB*, el gen *lysC*, el gen *asd*, el gen *dapA*, el gen *dapB* y el gen *lysA*.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
- 20 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que el procedimiento comprende inactivar la oxalacetato-decarboxilasa que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NÚM.:1, y la inactivación de la oxalacetato-decarboxilasa comprende una mutación por eliminación o interrupción del gen que codifica la oxalacetato-decarboxilasa.
- 25 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que el microorganismo no modificado es un microorganismo de la cepa KCCM10770P.
8. Un microorganismo del género *Corynebacterium* obtenible por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7.
9. Un procedimiento de producción de L-lisina, comprendiendo el procedimiento:
 - cultivar un microorganismo para obtener un cultivo o células del microorganismo; y
 - 30 recuperar L-lisina del cultivo o de las células del microorganismo,
 - en el que el microorganismo es del género *Corynebacterium* en el que la vía de biosíntesis de L-lisina está potenciada y
 - la oxalacetato-decarboxilasa que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NÚM.:1 está inactivada,
 - 35 en el que el microorganismo es el microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 8.

FIG. 1

