

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 975**

51 Int. Cl.:

C12N 15/77 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2016 PCT/KR2016/008233**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17034165**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2016 E 16839455 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3342870**

54 Título: **Corynebacterium**

30 Prioridad:

27.08.2015 KR 20150120739

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

05.05.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEE, SEUNG BIN;
CHUNG, YOON HEE;
KIM, HYUNG JOON;
KANG, DOO JIN;
BANG, SEONG EUN y
RYU, SONG GI**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 822 975 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

Corynebacterium

5 [Campo técnico]

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

10 [Antecedentes de la técnica]

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

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

25 Por consiguiente, los presentes inventores han llevado a cabo extensos estudios para identificar las características efectivas capaces de aumentar la productividad de lisina. Como resultado, los presentes inventores han detectado un microorganismo que produce una alta concentración de L-lisina mediante la interrupción aleatoria de los genes endógenos de un microorganismo del género *Corynebacterium*, y descubrieron que cuando un gen cuya función no se ha notificado aún, se interrumpe en el microorganismo detectado, aumenta la productividad de la L-lisina del microorganismo, de esta manera se completa la presente invención.

30 Documentos de la Técnica Anterior

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

35 [Descripción]

[Problema técnico]

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

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

45 [Solución técnica]

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

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

[Efectos ventajosos]

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

[Modo para la invención]

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

65

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

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

15 Cualquier secuencia de nucleótidos capaz de codificar la proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se incluye en el alcance de la presente invención. Específicamente, el gen que codifica la proteína de la SEQ ID NO: 1 puede tener una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. Además, una secuencia de nucleótidos que tiene una homología de al menos 80 %, específicamente al menos 90 %, más específicamente 95
20 %, de manera particular específicamente 97 %, a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, puede incluirse, además, en el alcance de la presente invención. Además, las variantes de la secuencia, que codifican el mismo aminoácido debido a la redundancia del código genético, pueden incluirse, además, en el alcance de la presente invención.

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

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

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

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

55 Los ejemplos de un vector que puede usarse para inactivar la proteína diana incluyen plásmidos naturales o recombinantes, cósmidos, virus y bacteriófagos. Por ejemplo, el vector fago o el vector cósmido que se usa en la presente invención puede ser pWE15, M13, AMBL3, AMBL4, λ FIXII, λ DASHII, λ ZAPII, lgt10, lgt11, Charon4A, Charon21A o similares, y el vector plasmídico que se usa en la presente invención puede ser de 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
60 presente invención no se limita particularmente, y puede ser un vector de expresión conocido en la técnica.

La introducción del vector puede realizarse fácilmente de acuerdo con cualquier método convencional conocido en la técnica. Generalmente, los ejemplos de este método incluyen un método de precipitación con CaCl_2 , el método de Hanahan con una eficiencia mejorada mediante el uso de sulfóxido de dimetilo (DMSO) como un agente reductor en
65 el método de precipitación con CaCl_2 , electroporación, un método de precipitación con fosfato de calcio, un método

de fusión de protoplastos, un método de agitación que usa fibra de carburo de silicio, un método de transformación que usa PEG, transformaciones mediadas por sulfato de dextrano, lipofectamina y supresión/seco, etcétera.

Como se usa en la presente descripción, el término "transformación" significa introducir un vector que comprende un polinucleótido que codifica una proteína diana en una célula huésped para que permita que el polinucleótido se exprese o inactive en la célula huésped. El polinucleótido puede incluir ADN y ARN, que codifican la proteína diana, o un promotor que reduce la expresión de la proteína diana, o un gen marcador capaz de inactivar la expresión de la proteína diana, etcétera. Siempre que el polinucleótido pueda introducirse en la célula huésped y se exprese en ella, puede introducirse de cualquier forma.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El pH del medio de cultivo puede controlarse mediante el uso de compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico de una manera adecuada. La formación de espuma puede controlarse mediante el uso de agentes antiespumantes tales como los ésteres de poliglicol de ácidos grasos. Las condiciones aeróbicas pueden mantenerse mediante la introducción de oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno (por ejemplo, aire) en el cultivo. La temperatura

de cultivo es generalmente de 20 °C a 45 °C, específicamente de 25 °C a 40 °C. El cultivo puede continuar hasta que la cantidad de L-lisina producida alcance el nivel deseado. Específicamente, el tiempo de cultivo es de 10 a 160 horas.

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

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

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

20 Ejemplos

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

Para obtener una cepa que tenga un aumento de la productividad de L-lisina, se construyó una biblioteca de vectores de la siguiente manera.

25 Primero, mediante el uso de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P (este microorganismo se describió como KFCC10881, y se volvió a depositar con una Autoridad Internacional de Depósito bajo el Tratado de Budapest con el número de acceso KCCM11016P; patente coreana núm. 10-0159812) como una cepa parental, un plásmido obtenido mediante el uso del kit EZ-Tn5™ <R6Kγori/KAN-2>Tnp Transposome™ (Epicentre) se transformó en la
30 cepa parental mediante un método de pulso eléctrico (Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52:541-545). Después, la cepa se extendió en una placa de medio complejo que contenía kanamicina (25 mg/L), de esta manera se obtienen aproximadamente 20 000 colonias.

35 Placa de medio complejo (pH 7,0):

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

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

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

45 Medio selectivo (pH 8,0):

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

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

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

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

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

Con el objetivo de seleccionar finalmente las cepas cuya productividad de L-lisina se incrementó de forma reproducible a partir de los diez mutantes seleccionados en el Ejemplo 2, se realizó el cultivo en matraz mediante el uso del siguiente medio. Después de completar el cultivo, la concentración de L-lisina en el cultivo se analizó por HPLC. La concentración de L-lisina producida por cada una de las cepas mutantes se muestra en la Tabla 1 a continuación.

Medio del cultivo semilla (pH 7,0):

20 g de glucosa, 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 1,5 g de urea, 4 g de KH_2PO_4 , 8 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 g de proteína de soja, 5 g de sólidos de maceración del maíz, 3 g de urea, 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 μg de biotina, 1000 μg de cloruro de tiamina, 2000 μg de pantotenato de calcio, 3000 μg de nicotinamida y 30 g de CaCO_3 (por litro de agua destilada).

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

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

Entre las 10 cepas mutantes seleccionadas, la KCCM11016P/mt-8 se seleccionó finalmente como una cepa cuya productividad de L-lisina aumentó significativamente.

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

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

El ADN genómico se extrajo de KCCM11016P/mt-8, se digirió y después se ligó, y el producto de la ligación se transformó en *E. coli* DH5 α . Las células de *E. coli* transformadas se sembraron en placa en un medio LB sólido que contenía kanamicina (25 mg/L). Se seleccionaron veinte colonias transformadas, y después se obtuvieron los plásmidos que contenían una porción de gen desconocida. Se realizó la secuenciación mediante el uso del cebador 1 (SEQ ID NO: 3) y el cebador 2 (SEQ ID NO: 4) del kit EZ-Tn5™ <R6K γ ori/KAN-2>Tnp Transposome™. Como resultado, en base a las secuencias de nucleótidos registradas en el NIH Genbank, pudo verse que el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 estaba inactivado.

Cebador 1 (SEQ ID NO: 3): ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC;

Cebador 2 (SEQ ID NO: 4): CTACCCTGTGGAACACCTACATCT.

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

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

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

Gen	Cebadores usados	Secuencias de nucleótidos
SEQ ID NO.	Cebador 3 (SEQ ID NO: 5)	GAATTCTACACGCGAGTGCCGAAACTTC
	Cebador 4 (SEQ ID NO: 6)	TCGTATGTGCCTGGAATCACGAGACAGC
	Cebador 5 (SEQ ID NO: 7)	GATTCAGGCACATACGACCAGGTGCGG
	Cebador 6 (SEQ ID NO: 8)	GCAGGTCGACTACCAACACCATGACCAGCTT

Con el objetivo de eliminar la región ORF, el cebador 3 (SEQ ID NO: 5), el cebador 4 (SEQ ID NO: 6), el cebador 5 (SEQ ID NO: 7) y el cebador 6 (SEQ ID NO: 8) (Tabla 2) se sintetizaron en base a la SEQ ID NO: 2 para tener un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción EcoRI en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Sall en el extremo 3'. Mediante el uso de los cebadores sintetizados, se realizó la PCR [Sambrook y otros, Molecular Cloning, a Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratories] mediante el uso del ADN cromosómico de tipo silvestre de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, como molde. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN que comprende una región aguas arriba de 500 pb y una región aguas abajo de 500 pb, que corresponden al gen que codifica la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos, cada uno de los cuales consiste en la desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 50 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 1 min; seguido de polimerización a 72 °C durante 7 min. Un vector pDZ (patente coreana núm. 10-0924065), que no se replica en *Corynebacterium glutamicum*, y el fragmento amplificado por PCR, se trataron con las enzimas de restricción EcoRI y Sall, y después se ligaron mediante el uso de la ADN ligasa. El producto de la ligadura se transformó en *E. coli* DH5α que después se sembraron en placa en un medio LB sólido que contenía kanamicina (25 mg/L).

Una colonia transformada con un plásmido que tenía el gen deseado insertado en ella se seleccionó por PCR, y después el plásmido se aisló mediante el uso de una técnica de extracción de plásmido. El plásmido se denominó "pDZ-ΔMT8EH".

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

El plásmido recombinante pDZ-ΔMT8EH construido en el Ejemplo 5 se transformó en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, que es una cepa productora de L-lisina, mediante recombinación homóloga en el cromosoma (van der Rest y otros, Appl Microbiol Biotechnol 52:541-545, 1999).

A continuación, la cepa transformada se sometió a una segunda recombinación en un medio de placa sólida que contenía sacarosa al 4 %. Después de completar la segunda recombinación, la interrupción del gen de la SEQ ID NO: 2 en el cromosoma de la cepa de *Corynebacterium glutamicum* transformada se confirmó por PCR mediante el uso del cebador 3 y el cebador 6. La cepa recombinante se denominó "*Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-MT8EH".

Con el objetivo de analizar la productividad de L-lisina de la cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-MT8EH construida, la cepa construida junto con la cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P parental se cultivó de la siguiente manera.

Cada una de la cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P parental y de la cepa *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P-MT8EH construida en el Ejemplo 6 se inoculó en un matraz con defletores de 250 ml que contiene 25 ml de medio del siguiente medio de cultivo semilla, y se cultivaron con agitación a 200 rpm, a 30 °C durante 20 horas. A continuación, se inoculó 1 ml de cada uno de los medios de cultivo semilla en un matraz con defletores de 250 ml que contenía 24 ml del siguiente medio de producción y se cultivó con agitación a 200 rpm, a 30 °C durante 72 horas. La composición del medio de cultivo semilla y la composición del medio de producción fueron las siguientes.

Medio del cultivo semilla (pH 7,0):

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

5 Medio de producción (pH 7,0):

100 g de glucosa, 40 g de (NH₄)₂SO₄, 2,5 g de proteína de soja, 5 g de sólidos de maceración del maíz, 3 g de urea, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de MgSO₄·7H₂O, 100 µg de biotina, 1000 µg de tiamina HCl, 2000 µg pantotenato de calcio, 3000 µg de nicotinamida y 30 g de CaCO₃ (por litro de agua destilada).

10 Después de completar el cultivo, la cantidad de L-lisina producida se midió por HPLC (Waters 2478) y la concentración de L-lisina analizada se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Análisis de la productividad de L-lisina de la KCCM11016P-MT8EH derivada de KCCM11016P

	Cepas	L-lisina (g/L)				
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	
15	Grupo de control	KCCM11016P	41,2	41,7	41,8	41,6
20	Grupo de Prueba	KCCM11016P-MT8EH	54,9	55,2	54,5	54,9

25 A partir de los resultados en la Tabla 3 anterior, se demostró que cuando el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpió en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, que es una cepa productora de L-lisina, la productividad de L-lisina de la cepa recombinante aumentó un 32 % en promedio en comparación con la de la cepa parental.

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

35 A partir de los resultados anteriormente descritos, se observó que la inactivación de una proteína hipotética con una función desconocida mediante la interrupción del gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 en la cepa productora de L-lisina, fue eficaz para aumentar la productividad de L-lisina de la cepa. La cepa KCCM11016P-MT8EH se denominó "CA01-2295" y fue depositada internacionalmente bajo el número de acceso KCCM11697P con el Centro de cultivo coreano de microorganismos (KCCM) el 15 de mayo de 2015.

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

45 Con el objetivo de examinar otras cepas de *Corynebacterium glutamicum* productoras de L-lisina que también tienen el mismo efecto como se describió anteriormente, se construyó una cepa en donde el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpió, a partir de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P productora de L-lisina (este microorganismo se describió como KFCC10750, y se volvió a depositar con una Autoridad Internacional de Depósito bajo el Tratado de Budapest con el número de acceso KCCM11347P; patente coreana núm. 10-0073610) de acuerdo con el mismo método que se describió en el Ejemplo 6. La cepa construida se denominó "KCCM11347P-MT8EH".

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

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

	Cepa	L-lisina (g/L)				
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	
55	Grupo de control	KCCM11347P	37,9	38,1	37,9	38,0
60	Grupo de prueba	KCCM11347P-MT8EH	47,5	47,4	47,6	47,5

65 A partir de los resultados en la Tabla 4 anterior, se demostró que cuando el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpió en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11347P, que es una cepa productora de L-lisina, la productividad de L-lisina de la cepa aumentó un 25 % en promedio.

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

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

10 Con el objetivo de examinar si otras cepas de *Corynebacterium glutamicum* productoras de L-lisina también tienen el mismo efecto como se describió anteriormente, se construyó una cepa en donde el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpió a partir de *Corynebacterium glutamicum* CJ3P productora de L-lisina (Binder y otros, Genome Biology 2012, 13:R40), obtenida mediante la introducción de tres mutaciones [pyc(P458S), hom(V59A) y lysC(T311I)] en una cepa de tipo silvestre, de acuerdo con el mismo método que se describió en el Ejemplo 6. La cepa construida se denominó "CJ3P-MT8EH".

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

20

Tabla 5: Productividad de L-lisina de CJ3P-MT8EH derivada de CJ3P

	Cepa	L-lisina (g/L)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
25 Grupo de control	CJ3P	8,2	8,1	8,4	8,2
Grupo de prueba	CJ3P-MT8EH	10,1	10,3	9,8	10,1

30 A partir de los resultados en la Tabla 5 anterior, se demostró que cuando el gen que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 se interrumpe en *Corynebacterium glutamicum* CJ3P, que es una cepa productora de L-lisina, la productividad de L-lisina de la cepa aumentó un 23 % en promedio.

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

40 Número de acceso

Nombre de la institución depositaria: Centro Coreano de Microorganismos de Cultivo;
 Número de Acceso: KCCM11697P;
 Fecha de depósito: 15 de mayo de 2015.

5

Solicitante o agente referencia de archivo	PP16-0105	Solicitud internacional Núm.
---	------------------	------------------------------

10

**INDICACIONES RELATIVAS AL MICROORGANISMO DEPOSITADO
U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO**
(Regla 13 del PCT *bis*)

15

A. Las indicaciones que se hacen a continuación se refieren al microorganismo depositado u otro material biológico al que se hace referencia en la descripción en la página 13, línea 7.

20

B. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO B. Los depósitos adicionales se identifican en una hoja adicional

Nombre de la institución depositaria
Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos

25

Dirección de la institución depositaria (*que incluye el código postal y el país*)
Yurim Bldg, 45, Hongjengae 2ga-gil, Seodaemun-gu, Seoul, 120-861, Korea

Fecha de depósito 15 de mayo de 2015	Número de acceso KCCM11697P
--	---------------------------------------

30

C. INDICACIONES ADICIONALES (*dejar en blanco si no aplica*) Esta información continúa en una hoja adicional

35

D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HACEN INDICACIONES (*si las indicaciones no son para todos los Estados designados*)

40

E. SUMINISTRO DE INDICACIONES POR SEPARADO (*dejar en blanco si no aplica*)
Las indicaciones que se enumeran a continuación se presentarán posteriormente a la Agencia Internacional (*especifique la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo, "Número de Acceso del Depósito"*)

45

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

Para uso exclusivo de la Agencia Internacional <input type="checkbox"/> Esta hoja se recibió por la Agencia Internacional sobre:

50

Oficial autorizado

Oficial autorizado

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

55

<110> CJ Cheiljedang Corporation

60

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

<130> PP16-0105

<160> 8

65

<170> KopatentIn 2.0

ES 2 822 975 T3

<210> 1
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

5

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 582
 <212> ADN
 <213> Corynebacterium glutamicum

55

<400> 2

ES 2 822 975 T3

5
 ttggcagctg atgtagccac cagcgcgccc gcccgaggat tcttccatcc ctccagaaac 60
 tctcgcgacc tggtcgtatg tggaggtttc gctgcgaccg gtgcagcttc agaaatacgc 120
 10 cgagccaacg tggcgcttgt gctgggcgcc ggtttgaacc aattcaccat ggcattcggg 180
 gaggctttcg gtgaactcgc ggaagtgtc caagtggatc ttgaaacaca gaccaccaac 240
 ccgcgatta accatttcat tagcgcagat aacacaactg ttgtagccgc agtgctttta 300
 15 aagcttcgta cacaaaattt ccacgcaccg cgccggctat acctggacga taatcctctg 360
 acatgccctg gcggcgacgc ccttgcagcc gacggccgac tcgatccaca cagcctcatg 420
 20 cgccaactta acggtatttt gccagctaac aagttcgtcg cctccgatgg cggacacttc 480
 atcggagggg ccaacaccta cttcgacctg gaatcacgag acagcatcgt gcttttggga 540
 accgccttca atccatcggc ctcggcttcc ccaccgcgt ag 582

25
 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Cebador 1

35
 <400> 3
 acctacaaca aagcttcat caacc 25

40
 <210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 2

45
 <400> 4
 ctaccctgtg gaacacctac atct 24

50
 <210> 5
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 3

55
 <400> 5
 gaattctaca cgcagtgccg aaacttc 27

60
 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <223> Cebador 4

ES 2 822 975 T3

<400> 6
tcgtatgtgc ctggaatcac gagacagc 28

5 <210> 7
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador 5

<400> 7
gattccaggc acatacgacc aggtcgcg 28

15 <210> 8
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador 6

<400> 8
gcaggtcgac tcaccaacac catgaccacg ctt 33

25

REIVINDICACIONES

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