

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 213**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 15/77** (2006.01)

**C12P 13/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2016 PCT/KR2016/002594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16148490**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2016 E 16765246 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023 EP 3272860**

54 Título: **Mutante de piruvato deshidrogenasa, microorganismo que comprende el mutante y método para producir l-aminoácido usando el microorganismo**

30 Prioridad:

**18.03.2015 KR 20150037654**

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

**21.02.2024**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HUH, LAN;  
MOON, JUN OK;  
BAE, HYUN WON;  
KIM, HYUNG JOON y  
SONG, SUNG KI**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 959 213 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**

Mutante de piruvato deshidrogenasa, microorganismo que comprende el mutante y método para producir L-aminoácido usando el microorganismo

5

**[Campo técnico]**

La presente descripción se refiere a una nueva variante de piruvato deshidrogenasa, a un polinucleótido que codifica para la variante de piruvato deshidrogenasa, a un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene capacidad para producir L-aminoácido que comprende la variante, y a un método para producir un L-aminoácido usando el microorganismo.

10

**[Técnica anterior]**

El complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDHC) es una enzima que convierte el piruvato generado durante la glucólisis en acetil-CoA y es una enzima importante para determinar la introducción de carbono en el ciclo del TCA. PDHC consiste en piruvato deshidrogenasa (E1p), dihidrolipoamida acetiltransferasa (E2p) y dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3p). Entre ellas, la enzima E1p está codificada por el gen *aceE*. Aunque los cambios en la producción de L-lisina en la cepa que produce L-lisina debido a la delección y debilitamiento del gen *aceE* (Blombach y col., Appl. Microbiol. Biotechnol., 76: 615, 2007; Buchholz J y col., Appl Environ Microbiol., 79 (18): 5566 - 75, 2013) se han conocido, no ha habido ningún informe con respecto a la variante E1p, lo que puede mejorar las capacidades para producir L-aminoácido.

15

20

El documento EP 176.761.6 A2 se refiere a un "Método para producir L-aminoácidos o cetoácidos empleando bacterias corineformes con expresión atenuada de *aceE* (*pdhA*)".

25

El documento EP 121.971.2 A1 se refiere a un "gen enzimático del sistema de biosíntesis de aminoácidos termófilos de bacterias corineformes termotolerantes".

30

BASE DE DATOS UNIPARC: UNIPARC UP100.024.5B513 se refiere a la secuencia de "Corynebacterium diphtheriae piruvato deshidrogenasa".

Blombach y col., Appl Microbiol Biotechnol. Septiembre de 2007;76(3):615-23 se refiere al "Efecto de la deficiencia del complejo piruvato deshidrogenasa en la producción de L-lisina con *Corynebacterium glutamicum*".

35

Bucholz y col., Appl Environ Microbiol. Septiembre de 2013;79(18):5566-75 se refiere a "Ingeniería de plataforma de *Corynebacterium glutamicum* con actividad reducida del complejo piruvato deshidrogenasa para mejorar la producción de L-lisina, L-valina y 2-cetoisovalerato".

40

Schreiner y col., J Bacteriol. Septiembre de 2005;187(17):6005-18 se refiere a "Enzima E1 del complejo piruvato deshidrogenasa en *Corynebacterium glutamicum*: análisis molecular del gen y aspectos filogenéticos".

**[Descripción]**

45

**[Problema técnico]**

Los presentes autores han realizado grandes esfuerzos para desarrollar una variante E1p que pueda utilizarse en la producción de un L-aminoácido a alta concentración y un microorganismo que utilice la misma, y como resultado, han desarrollado la variante E1p y descubierto que el L-aminoácido puede producirse en alto rendimiento a partir del microorganismo que contiene la variante E1p, completando así la presente descripción.

50

**[Solución técnica]**

La invención es tal como se define en las reivindicaciones. Esta invención y otras facetas de la presente descripción pueden entenderse más completamente haciendo referencia a la siguiente descripción.

55

Un objeto de la presente descripción es proporcionar una nueva variante de piruvato deshidrogenasa.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un polinucleótido que codifica para la variante de piruvato deshidrogenasa.

60

Un objeto adicional de la presente descripción es proporcionar un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-aminoácido, que incluye la variante de piruvato deshidrogenasa.

65

Otro objeto adicional de la presente descripción es proporcionar un método para producir un L-aminoácido, que incluye: (a) cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-aminoácido, que incluye la variante

de piruvato deshidrogenasa, en un medio para producir un *L*-aminoácido; y (b) recuperar el *L*-aminoácido del microorganismo cultivado o del medio.

Efectos ventajosos

5 Una enzima con una actividad debilitada se puede obtener usando la variante de piruvato deshidrogenasa de la presente descripción. Como tal, el *L*-aminoácido se puede producir con alta eficacia usando el microorganismo, que incluye la variante de piruvato deshidrogenasa con actividad debilitada, en comparación con un microorganismo productor de *L*-aminoácidos, que incluye la proteína piruvato deshidrogenasa de tipo natural. Además, el  
10 microorganismo de la presente descripción permite una producción eficaz de un *L*-aminoácido, a la vez que rara vez inhibe el crecimiento del microorganismo, a diferencia de un microorganismo con piruvato deshidrogenasa delecionada. Por ejemplo, la lisina, como un aminoácido esencial para la alimentación animal, se requiere que se produzca a gran escala del aspecto industrial. Por tanto, la producción de *L*-lisina con alta eficiencia como en la presente descripción puede reducir el coste de fabricación de la alimentación animal.

15 **Descripción**

La presente invención se refiere a variantes de una piruvato deshidrogenasa tal como se define en las reivindicaciones. Es decir, la presente invención se refiere a variantes de una piruvato deshidrogenasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en donde las variantes tienen al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en aminoácidos en las posiciones 190, 199, 201, 418, 428, 432, 435 y 438 en la secuencia de SEQ ID NO: 1, y en donde la actividad de las variantes se debilita con respecto a la enzima de SEQ ID NO: 1.

La siguiente descripción proporciona una descripción adicional útil para la comprensión de este objeto reivindicado.

25 Se describe pero no se reivindica una variante de piruvato deshidrogenasa que incluye al menos una sustitución de aminoácidos en una región de aminoácidos en las posiciones de 190 a 205 o en una región de aminoácidos en las posiciones de 415 a 440 de SEQ ID NO: 1.

30 El término "piruvato deshidrogenasa", que es más amplio que el objeto reivindicado, se refiere a una de las enzimas que constituyen un complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDHC), que interviene en la conversión de piruvato en acetil-CoA. Dicha piruvato deshidrogenasa no está particularmente limitada mientras tenga la actividad correspondiente, y puede ser una piruvato deshidrogenasa derivada de un microorganismo del género *Corynebacterium*, específicamente, *Corynebacterium glutamicum*, pero no está limitada a ello. Por ejemplo, una  
35 piruvato deshidrogenasa puede ser una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia de aminoácidos que tenga una homología de al menos 75 %, específicamente al menos 80 %, más específicamente 85 %, e incluso más específicamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o superior a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La proteína E1p que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 puede estar codificada por el gen *aceE* que tiene la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, pero no se limita a ello. Además,  
40 si una secuencia de aminoácidos tiene una homología con la secuencia anterior y tiene sustancialmente la misma o correspondiente actividad biológica a la proteína de la SEQ ID NO: 1, es obvio que la secuencia de aminoácidos con una deleción, una modificación, una sustitución o una adición también es una piruvato deshidrogenasa pero no necesariamente cae dentro del alcance de las reivindicaciones.

45 Por ejemplo, la secuencia polinucleotídica puede ser una secuencia polinucleotídica que tenga una homología de al menos el 75 %, específicamente al menos el 80 %, más específicamente el 85 %, e incluso más específicamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o superior, con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Además, basándose en la degeneración de codones o considerando los codones preferidos por los organismos para expresar la proteína, la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína puede tener diversas  
50 variantes en la región codificante dentro del ámbito que no cambie la secuencia de aminoácidos de la proteína que se expresa a partir de la región codificante.

Las variantes de piruvato deshidrogenasa descritas pero no reivindicadas pueden incluir al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, o al  
55 menos 10 sustituciones de aminoácidos en la región de aminoácidos en las posiciones de 190 a 205 o de 415 a 440 de SEQ ID NO: 1.

En particular, la variante de piruvato deshidrogenasa puede incluir al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro sustituciones de aminoácidos en la región de aminoácidos en las posiciones de 190 a 205 de SEQ ID NO: 1. Específicamente, la sustitución de aminoácidos en la región de aminoácidos en las posiciones de 190 a 205 de SEQ ID NO: 1 puede seleccionarse del grupo de aminoácidos en las posiciones 190, 195, 199 y 201, pero no se limita  
60 a ello.

La sustitución en la región de aminoácidos en las posiciones de 190 a 205 de SEQ ID NO: 1 puede ser una sustitución de al menos un aminoácido en la región de aminoácidos en las posiciones de 190 a 205 con un tipo diferente de un aminoácido, más específicamente, una sustitución de al menos un aminoácido en las posiciones 190, 195, 199, y 201  
65

con un tipo diferente de un aminoácido, y aún más específicamente, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en una sustitución del ácido glutámico en la posición 190 por valina (E190V), una sustitución de la glutamina en la posición 195 por histidina (Q195H), una sustitución de la prolina en la posición 199 por serina (P199S), y una sustitución de la tirosina en la posición 201 por alanina (Y201A), pero no está particularmente limitado a ello.

5 Las variantes de piruvato deshidrogenasa descritas pero no reivindicadas también pueden incluir al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis sustituciones de aminoácidos en la región de aminoácidos en las posiciones de 415 a 440 de SEQ ID NO: 1. Específicamente, la sustitución de aminoácidos en la región de aminoácidos en las posiciones de 415 a 440 de SEQ ID NO: 1 puede seleccionarse del grupo que consiste  
10 en los aminoácidos en las posiciones 418, 428, 432, 435 y 438.

15 La sustitución en la región de aminoácidos en las posiciones de 415 a 440 de SEQ ID NO: 1 puede ser una sustitución de al menos un aminoácido en la región de aminoácidos en las posiciones de 415 a 440 con un tipo diferente de un aminoácido, específicamente, una sustitución de al menos un aminoácido en las posiciones 418, 428, 432, 435, y 438 con un tipo diferente de un aminoácido, y aún más específicamente, al menos uno seleccionado del grupo que consiste  
20 en una sustitución de tirosina en la posición 418 con histidina (Y418H), una sustitución de la asparagina en la posición 428 por alanina (N428A), una sustitución de la glutamina en la posición 432 por ácido glutámico (Q432E), una sustitución de la glutamina en la posición 432 por alanina (Q432A), una sustitución de la lisina en la posición 435 por alanina (K435A), y una sustitución de la leucina por prolina (L438P), pero sin limitarse particularmente a ello.

Más específicamente, la variante de piruvato deshidrogenasa puede incluir una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14 a 33.

25 Las variantes de piruvato deshidrogenasa reivindicadas incluyen SEQ ID NO: 14 a 16, y 18 a 33.

Las variantes de la piruvato deshidrogenasa que no entran necesariamente en el ámbito de las reivindicaciones incluyen proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 a 33, sino también la variante de piruvato deshidrogenasa que tiene una homología del 75 % o superior, específicamente del 80 % o superior, más específicamente del 85 % o superior, y aún más específicamente del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % y 99 % o superior, con las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 a 33, sin limitación, siempre que su actividad piruvato deshidrogenasa esté sustancialmente debilitada en comparación con la del tipo natural. Es obvio que las secuencias de aminoácidos que tienen sustancialmente la misma o correspondiente actividad biológica con las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 a 33 se describen pero no se reivindican, aunque las secuencias de aminoácidos pueden tener una delección, una modificación, una sustitución o una adición, en parte de las secuencias.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a un porcentaje de identidad entre dos restos de polinucleótidos o polipéptidos. La homología entre secuencias de una fracción a otra fracción puede determinarse mediante la tecnología conocida en la técnica. Por ejemplo, la homología puede determinarse ordenando directamente la información de la secuencia de dos moléculas polinucleotídicas o dos moléculas polipeptídicas mediante un programa informático de fácil acceso. Los ejemplos del programa informático pueden ser BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc.), etc. Además, la homología entre polinucleótidos puede determinarse hibridando polinucleótidos bajo la condición de formar una doble cadena estable entre las regiones homólogas, desensamblando con una nucleasa específica de cadena simple, seguido de la determinación del tamaño de los fragmentos desensamblados. Los polinucleótidos de la invención son aquellos que codifican variantes de la piruvato deshidrogenasa como se define en las reivindicaciones.

También se describe en el presente documento un polinucleótido que codifica las variantes de piruvato deshidrogenasa que se describen pero no se reivindican.

50 La variante de la piruvato deshidrogenasa es la misma que la explicada anteriormente. Específicamente, el polinucleótido que codifica la variante de la piruvato deshidrogenasa codifica proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 a 33. Además, el polinucleótido puede ser cualquier polinucleótido que tenga una homología del 75 % o superior, específicamente del 80 % o superior, más específicamente del 85 % o superior, y aún más específicamente del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, y 99 % o superior, con la secuencia polinucleotídica anterior.

60 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos longitudinalmente extendido en cadena por un enlace covalente de unidades de nucleótidos, en general ADN o ARN hebra con una cierta longitud, y en la presente descripción, se refiere a un polinucleótido que codifica la variante de la piruvato deshidrogenasa. El polinucleótido puede tener varias secuencias de nucleótidos que codifican el mismo aminoácido basándose en la degeneración del codón. Además, para la optimización de la expresión según el tipo de células huésped, el polinucleótido puede tener un codón optimizado.

65 La invención reivindicada incluye un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-aminoácido, en donde el microorganismo comprende una variante de piruvato deshidrogenasa de la secuencia de la invención.

También se describe pero no se reivindica

5 un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-aminoácido, que incluye las variantes de piruvato deshidrogenasa que se describen pero no se reivindican.

Específicamente, el microorganismo puede incluir la variante de piruvato deshidrogenasa por una mutación, o puede ser uno transformado por un vector que incluye un polinucleótido, que codifica la variante de piruvato deshidrogenasa.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a cualquier portador para clonar y/o transferir bases a una célula huésped. Un vector puede ser un replicón para permitir la replicación de otro(s) fragmento(s) de ADN que se combine(n) con el vector. "Replicón" se refiere a cualquier unidad genética que actúe como unidad de replicación del ADN *in vivo*, es decir, unidades genéticas (por ejemplo, plásmidos, fagos, cósmidos, cromosomas y virus) replicables por autorregulación. Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" no está particularmente limitado, siempre que pueda replicarse en un huésped, y puede usarse cualquier vector conocido en la técnica. El vector usado en la construcción del vector recombinante puede estar en estado natural o ser plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos en estado recombinante. Por ejemplo, como vector fágico o vector cósmido, pueden utilizarse *pWE15*, *M13*, *λEMBL3*, *λEMBL4*, *λFIXII*, *λDASHII*, *λZAPII*, *λgt10*, *λkgt11*, *Charon4A*, *Charon21A*, etc., y como vector plasmídico, pueden utilizarse los basados en el vector *pDZ*, *pBR*, *pUC*, *pBluescriptII*, *pGEM*, *pTZ*, *pCL*, *pET*, etc. Los vectores que pueden utilizarse no están particularmente limitados, sino que puede utilizarse cualquier vector de expresión conocido. Específicamente, puede usarse *pDZ* (patente coreana n.º 10-092.406.5), pero sin limitarse a lo mismo.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "transformación" se refiere a un proceso de introducción de un gen en una célula huésped, permitiendo así la expresión del gen en la célula huésped. El gen transformado puede incluir, sin limitación, cualquier gen, tanto si está insertado en el cromosoma de una célula huésped y localizado en él como si está localizado fuera del cromosoma, siempre que pueda expresarse en la célula huésped. El polinucleótido puede introducirse en una célula huésped en forma de casete de expresión, que es una construcción polinucleotídica que incluye todos los elementos esenciales necesarios para la autoexpresión. El casete de expresión puede incluir convencionalmente un promotor operablemente conectado al gen, una señal de terminación de la transcripción, un dominio 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 capaz de autorreplicarse. Además, el polinucleótido puede introducirse en una célula huésped tal cual o en forma de construcción polinucleotídica y conectarse operablemente a una secuencia necesaria para su expresión en la célula huésped, pero sin limitarse a ello.

35 El microorganismo descrito pero no necesariamente reivindicado puede ser cualquier microorganismo procarionta o eucariota siempre que el microorganismo incluya la actividad de la variante de piruvato deshidrogenasa correspondiente o el microorganismo se transforme para expresar la proteína correspondiente. Los ejemplos del microorganismo pueden incluir cepas microbianas del género *Escherichia*, del género *Erwinia*, del género *Serratia*, del género *Providencia*, del género *Enterobacteria*, del género *Salmonella*, del género *Streptomyces*, del género *Pseudomonas*, del género *Brevibacterium*, del género *Corynebacterium*, etc., específicamente, un microorganismo del género *Corynebacterium*, y más concretamente, *Corynebacterium glutamicum*, pero sin limitarse a ello.

45 Además, cuando la variante de piruvato deshidrogenasa se incluye en el microorganismo que tiene capacidad para producir L-aminoácido, la capacidad para producir L-aminoácido puede mejorarse significativamente sin inhibir considerablemente el crecimiento de las células, en comparación con el microorganismo que incluye la piruvato deshidrogenasa de tipo natural.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "L-aminoácido" se refiere a todos los L-aminoácidos que pueden producirse a partir de diversas fuentes de carbono a través del piruvato, y específicamente, puede referirse a un L-aminoácido que no pasa por un proceso de conversión de piruvato en acetil CoA en una vía biosintética. Más específicamente, el L-aminoácido puede incluir L-lisina, L-treonina, L-metionina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina o L-alanina, y aún más específicamente, L-lisina o L-valina.

55 El microorganismo productor de L-aminoácido puede incluir tanto microorganismos eucariotas como procariontas que puedan producir L-aminoácido *in vivo*, y los ejemplos de los microorganismos son los mismos que los descritos anteriormente. El microorganismo productor de L-aminoácido puede ser cualquier microorganismo sin limitación, siempre que el microorganismo tenga la capacidad de producir L-aminoácido, incluyendo tanto cepas de tipo natural como cepas recombinantes.

60 Por ejemplo, un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-lisina puede modificarse para que sea resistente a un análogo de la L-lisina o para que tenga una mayor actividad de la proteína relacionada con la biosíntesis de la L-lisina en comparación con la del microorganismo no modificado. Específicamente, la expresión de al menos un tipo de gen relacionado con la biosíntesis de la L-lisina se mejora mediante la amplificación génica; sustitución o modificación de secuencias tales como un promotor o un codón de inicio; introducción de una modificación para la mejora de la expresión, etc., pero no se limita a esto.

65

Además, los ejemplos del gen relacionado con la biosíntesis de *L*-lisina pueden incluir los genes localizados en la ruta de la biosíntesis de *L*-lisina, y específicamente, el gen de la sintasa del ácido dihidrodipicolínico (*dapA*), el gen de la asparto cinasa (*lysC*), el gen de la reductasa del ácido dihidrodipicolínico (*dapB*), gen de la descarboxilasa del ácido diaminopimélico (*LysA*), gen de la deshidrogenasa del ácido diaminopimélico (*ddh*), gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (*ppc*), gen de la aspartato semialdehído deshidrogenasa (*asd*), gen de la aspartasa (*aspB*) y piruvato carboxilasa (*Pyc*), pero sin limitarse a ellos. Además, ejemplos del gen relacionado con la biosíntesis de *L*-lisina pueden incluir la transketolasa (*tkt*), etc., presente en la ruta de las pentosas fosfato, pero sin limitarse a ello.

En particular, el microorganismo del género *Corynebacterium* que produce *L*-lisina puede exhibir la capacidad de producir *L*-lisina incluyendo la modificación, relacionada con la producción de *L*-lisina, descrita en la técnica, pero sin limitarse a ella.

El microorganismo que produce *L*-treonina puede ser un microorganismo que tenga una necesidad de metionina, una resistencia a los análogos de la treonina, una resistencia a los análogos de la lisina, una resistencia a los análogos de la isoleucina y/o una resistencia a los análogos de la metionina, aunque no está particularmente limitado a ello. Los análogos de la metionina pueden ser al menos un compuesto seleccionado del grupo formado por *D,L*-etionina, norleucina,  $\alpha$ -metilmetionina y *L*-metionina-*D,L*-sulfoximina; los análogos de la treonina pueden ser al menos un compuesto seleccionado del grupo formado por el ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi valérico y el hidroxamato de *D,L*-treonina; y los análogos de la lisina pueden ser al menos un compuesto seleccionado del grupo formado por *S*-(2-aminoetil)-*L*-cisteína y  $\delta$ -metil-*L*-lisina.

Además, el microorganismo productor de *L*-treonina puede incluir un microorganismo en el que la actividad de PckA implicada en la conversión de oxaloacetato (OAA), que es un intermediario para la biosíntesis de *L*-treonina, en fosfoenolpiruvato (PEP) esté debilitada o inactivada; o un microorganismo, en el que se debilita o inactiva la actividad de *TyrR*, que inhibe el gen *lysC* implicado en la conversión de oxaloacetato en aspartato; o un microorganismo, en el que la actividad de GalR, que inhibe la expresión del gen *galP* implicado en la introducción de glucosa, está debilitada o inactivada, pero sin limitarse a ello.

El microorganismo que produce *L*-isoleucina puede ser un microorganismo resistente a la *L*-isoleucina o sus derivados, o un microorganismo manipulado genéticamente para liberar la inhibición por retroalimentación de la *L*-isoleucina o sus derivados. Los ejemplos de los derivados de *L*-isoleucina puede incluir 4-tiaisoleucina (tiaile) e isoleucina-hidroxamato (ileHx), pero no se limita a esto.

El microorganismo productor de *L*-valina puede ser un microorganismo resistente a la *L*-valina o sus derivados, o un microorganismo en el que la enzima de la ruta de biosíntesis de la *L*-valina se haya manipulado genéticamente para liberar la inhibición por retroalimentación de la *L*-valina o sus derivados. Los ejemplos del microorganismo pueden incluir un microorganismo que incluya una variante de la acetohidroxiácido sintasa, en la que se libere la inhibición de retroalimentación a la *L*-valina, pero sin limitarse a ello. Además, el microorganismo puede ser uno en el que la expresión del operón *L*-valina para mejorar y, por ejemplo, el microorganismo puede ser uno en el que la expresión del operón *L*-valina se mejoró debido a la delección de una parte o la totalidad de la secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido líder dentro de la región de regulación del operón de *L*-valina (publicación de solicitud de patente coreana n.º 10-201.4-011.142.1). La invención reivindicada incluye un método para producir *L*-aminoácido como se define en las reivindicaciones.

La invención reivindicada incluye un método para producir *L*-aminoácido como se define en las reivindicaciones.

También se describe, pero no se reivindica, un método para producir *L*-aminoácido, que incluye: (a) cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* que produce *L*-aminoácido, que incluye la variante de piruvato deshidrogenasa, tal como se describe en el presente documento en un medio para producir un *L*-aminoácido; y (b) recuperar el *L*-aminoácido del microorganismo cultivado o del medio.

Los microorganismos del género *Corynebacterium* que producen de *L*-aminoácido, etc., son los mismos que los descritos anteriormente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cultivo" se refiere al crecimiento del microorganismo en condiciones ambientales adecuadas y controladas artificialmente. El proceso de cultivo de la presente descripción puede ejecutarse basándose en medios de cultivo apropiados y condiciones de cultivo conocidas en la técnica. Las condiciones específicas, como la temperatura de cultivo, el tiempo de cultivo, el valor de pH del medio de cultivo, etc., pueden ser determinadas por el conocimiento general por una persona con habilidad ordinaria en el arte o el método convencional conocido en el arte, y ajustadas apropiadamente en consecuencia. Específicamente, estos métodos de cultivo conocidos se describen en las referencias en detalles [Chomiel; Bioprozesstechnik 1. Einführung indie Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), y Storhas; Bioreaktoren und periphäre Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig / Wiesbaden, 1994)]. Además, los métodos de cultivo pueden incluir el cultivo por discontinuo, el cultivo continuo y el cultivo semicontinuo, y específicamente, el cultivo puede realizarse de forma continua en un proceso por lotes alimentados o por lotes alimentados repetidos, pero no están limitados a ello. El

medio usado en el cultivo debe satisfacer adecuadamente los requisitos de las cepas específicas. Los ejemplos de la fuente de carbono a usar en el medio pueden incluir azúcares y carbohidratos como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; aceites y grasas como el aceite de soja, girasol, ricino y coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético, pero sin limitación a los mismos. Estas fuentes de carbono pueden usarse solas o en combinación, pero no se limitan a las mismas. Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno que van a usarse en el medio pueden incluir peptona, extracto de levadura, salsa de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz, harina de soja; y urea o compuestos inorgánicos tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno también pueden usarse solas o en combinación, pero no se limitan a las mismas. Los ejemplos de las fuentes de fósforo que se utilizarán en el medio de cultivo pueden incluir dihidrogenofosfato, dihidrogenofosfato de potasio, sales que contienen sodio correspondientes, etc., aunque no se limitan a las mismas. Además, el medio puede contener sales metálicas, como sulfato de magnesio o sulfato de hierro, necesarias para el crecimiento. Por último, además de los materiales descritos anteriormente, también pueden contener materiales esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas. Además, pueden usarse precursores adecuados para el medio de cultivo. Estas fuentes pueden añadirse de manera apropiada durante el cultivo discontinuo o continuo a un cultivo, pero los métodos no están limitados a ello.

Además, el valor del pH de un cultivo puede ajustarse mientras se cultiva añadiendo al cultivo un compuesto como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoníaco, ácido fosfórico y ácido sulfúrico de forma adecuada. Durante el periodo de cultivo, puede añadirse un agente antiespumante, como el éster poliglicólico de ácido graso, para evitar la formación de espuma. Además, se puede inyectar oxígeno o un gas que contenga oxígeno en el cultivo para mantener un estado aerobio del cultivo, o se puede inyectar nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono sin la inyección de un gas para mantener un estado anaerobio o microaerobio del cultivo. En general, la temperatura de cultivo puede estar en el intervalo de desde 27 °C hasta 37 °C y, específicamente, desde 30 °C hasta 35 °C. El cultivo puede continuarse hasta que se obtenga la cantidad deseada de materiales útiles, y específicamente durante desde 10 horas hasta 100 horas. Los *L*-aminoácidos pueden liberarse en el medio de cultivo o estar contenidos en los microorganismos.

Además, en lo que respecta al método de producción de un *L*-aminoácido, el método de recuperación del *L*-aminoácido a partir de un microorganismo cultivado o de un cultivo es ampliamente conocido en la técnica. Los métodos de recuperación de un *L*-aminoácido pueden incluir filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, HPLC, etc., pero no se limitan a ellos.

[Modo]

A continuación en el presente documento, la presente descripción se describirá con más detalle haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y no se pretende que la descripción esté limitada por estos ejemplos.

Ejemplo 1: Construcción de una biblioteca de variantes de E1p mediante mutagénesis artificial

En este ejemplo, se construyó una biblioteca de vectores para la inserción cruzada primaria dentro del cromosoma para obtener variantes de E1p mediante el método descrito a continuación. Se llevó a cabo una PCR proclive a errores para el gen *aceE* derivado de *Corynebacterium glutamicum* ATCC130.32 (SEQ ID NO: 2), que codifica E1p (SEQ ID NO: 1), y se obtuvieron genes *aceE* modificados (285.2 pb) introducidos aleatoriamente con sustitución de bases. La PCR propensa a errores se realizó mediante el Kit de mutagénesis aleatoria Genemorph II (Stratagene) usando *Corynebacterium glutamicum* ADN genómico ATCC130.32 como plantilla junto con el cebador 1 (SEQ ID NO: 3) y el cebador 2 (SEQ ID NO: 4).

cebador 1 (SEQ ID NO: 3): 5'-TGGGA CCGGG AAACC GGG-3'

cebador 2 (SEQ ID NO: 4): 5'-GATTT ATCTG TCCCT TGA-3'

Los fragmentos génicos amplificados se introdujeron con una sustitución de 0 a 3,5 bases por 1 kb, y la PCR se realizó durante un total de 30 ciclos en las siguientes condiciones: desnaturalización a 96 °C durante 30 s, recocido a 53 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 2 min.

Los fragmentos amplificados se unieron al vector *pCR2.1-TOPO* (a continuación en el presente documento, "pCR2.1") usando el kit de clonación pCR2.1-TOPO TA (Invitrogen), se transformaron en *E. coli DH5a* y se sembraron en medio sólido LB con kanamicina (25 mg/l). Se seleccionaron 20 tipos diferentes de colonias transformadas y se obtuvieron plásmidos a partir de ellas. Tras analizar las secuencias polinucleotídicas de los plásmidos, se confirmó que se habían introducido modificaciones en posiciones mutuamente diferentes con una frecuencia de 1,4 mutaciones/kb. Se recogieron unas 200.00 colonias de *E. coli* transformadas y se extrajeron sus plásmidos, que se denominaron biblioteca "*pCR2.1-aceE (mt)*".

Además, se construyó un plásmido que tenía el gen *aceE* de tipo natural para utilizarlo como cepa de control. La PCR se realizó de la misma manera que la descrita anteriormente, utilizando el ADN genómico de *Corynebacterium*

*glutamicum* ATCC130.32 como plantilla junto con el cebador 1 (SEQ ID NO: 3) y el cebador 2 (SEQ ID NO: 4). Para la polimerasa, se utilizó la PfuUltra High-Fidelity DNA polymerase (Stratagene) y el plásmido así construido se denominó "pCR2.1-*aceE*(WT)".

5 Ejemplo 2: Construcción de una cepa de delección *aceE*

Se construyó una cepa de delección de *aceE* para la introducción de la biblioteca pCR2.1-*aceE* (*mt*) utilizando el KCCM11016P (el microorganismo mencionado se publicó por primera vez como KFCC10881 y se volvió a depositar en una autoridad internacional de depósito en virtud del Tratado de Budapest y se le asignó el número de registro KCCM11016P; Patente coreana n.º 10-015.981.2) como cepa original.

Para la construcción de un vector de delección de *aceE*, se realizó una PCR utilizando el cromosoma del *Corynebacterium glutamicum* ATCC130.32 de tipo natural como plantilla junto con 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).

15 cebador 3 (SEQ ID NO: 5): 5'-GCAGG TCGAC TCTAG ATGCG ATTCG CGTCA  
AACGT G-3'

20 cebador 4 (SEQ ID NO: 6): 5'-GTCCC TTGAG GTGAT GTGAA TCCAT CCACT-3' cebador 5 (SEQ ID NO: 7): 5'-  
AGTGG ATGGA TTCAC ATCAC CTCAA GGGAC-3'

25 cebador 6 (SEQ ID NO: 8): 5'-CCGGG GATCC TCTAG ACGAA GCGCC GTGAG  
CAATT C-3'

30 La PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de  
desnaturalización a 95 °C durante 30 s, recocido a 55 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 30 s; y  
polimerización a 72 °C durante 7 min.

Como resultado, se obtuvieron SEQ ID NO: 9 (521 pb) y SEQ ID NO: 10 (538 pb), que incluyen respectivamente el  
extremo terminal 5' y el extremo terminal 3'.

35 La PCR se realizó utilizando las secuencias amplificadas de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 como plantillas junto con  
el cebador 3 (SEQ ID NO: 5) y el cebador 6 (SEQ ID NO: 8).

40 La PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C durante 5 min; 30 ciclos de  
desnaturalización a 95 °C durante 30 s, recocido a 55 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 60 s; y  
polimerización a 72 °C durante 7 min.

Como resultado, se amplificó la SEQ ID NO: 11 con un tamaño de 1029 pb (a continuación en el presente documento,  
 $\Delta aceE$ ), en la que se conectaron el extremo terminal 5' y el extremo terminal 3' del gen *aceE*.

45 El vector pDZ (patente coreana n.º 10-092.406.5), que no puede replicarse en *Corynebacterium glutamicum*, y el  
fragmento  $\Delta aceE$  se trataron con la enzima de restricción *Xba* I y se ligaron utilizando una ADN ligasa, y se clonaron  
para obtener un plásmido. El plásmido se denominó pDZ- $\Delta aceE$ .

50 Se transformó pDZ- $\Delta aceE$  en *Corynebacterium glutamicum* KCCM11016P, que es una cepa que produce L-lisina, por  
pulso eléctrico (Apl. Microbiol. Biothecnol. (1999) 52: 541 - 545), y la cepa transformada se obtuvo de un medio  
selectivo que contenía kanamicina (25 mg/l). Se obtuvo una cepa en la que el gen *aceE* estaba inactivado por  $\Delta aceE$ ,  
el fragmento de ADN insertado en el genoma mediante cruzamiento secundario, y se denominó KCCM11016P $\Delta aceE$ .

55 Ejemplo 3: Construcción de una biblioteca de variantes artificiales de E1p y selección de cepas con mayor capacidad  
para producir L-lisina

La biblioteca pCR2.1-*aceE* (*mt*) construida, se transformó en la cepa KCCM11016P $\Delta aceE$  como cepa madre mediante  
recombinación homóloga, se sembró en un medio de placa complejo que contenía kanamicina (25 mg/l), y se  
obtuvieron unas 10.000 colonias, y cada colonia se denominó "KCCM11016P $\Delta aceE$  /pCR2.1-*aceE*(*mt*)-1" a  
60 "KCCM11016P/pCR2.1-*aceE*(*mt*)-10000," respectivamente.

Además, el vector pCR2.1-*aceE* (WT) así construido se transformó en KCCM11016P $\Delta aceE$  para obtener una cepa de  
control, y se denominó "KCCM11016P $\Delta aceE$  /pCR2.1-*aceE* (WT)."

65 <Medio para placas complejas (pH 7,0)>

## ES 2 959 213 T3

Glucosa 10 g, Peptona 10 g, Extracto de Carne de Vacuno 5 g, Extracto de Levadura 5 g, Infusión de Corazón de Cerebro 18,5 g, NaCl 2,5 g, Urea 2 g, Sorbitol 91 g, y Agar 20 g (basado en 1 l de agua destilada).

5 Las 10.000 colonias así obtenidas se inocularon respectivamente en un medio selectivo (300 µl) y se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos mantenidas a 32 °C a una velocidad de 1.000 rpm durante unas 24 horas. La cantidad de producción de *L*-lisina producida en el cultivo se analizó por el método de la ninhidrina (J. Biol. Chem. 1948. 176: 367 - 388). Una vez finalizado el cultivo, se hicieron reaccionar 10 µl del sobrenadante del cultivo y 190 µl de la solución de reacción de ninhidrina a 65 °C durante 30 minutos. La absorbancia a una longitud de onda de 570 nm se midió con un espectrofotómetro y se comparó con la de la cepa de control *KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-aceE (WT)*, y se seleccionaron 256 cepas modificadas que mostraban un aumento de la absorbancia de al menos un 10 %. Otras colonias mostraron una absorbancia similar o reducida en comparación con la de la cepa de control.

<Medio selectivo (pH 8,0)>

15 Glucosa 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5, 5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16,4 g, biotina 100 µg, tiamina HCl 1000 µg, calcio-ácido pantoténico 2000 µg y nicotinamida 2000 µg (basado en 1 l de agua destilada)

20 Las 256 cepas seleccionadas se sometieron a la reacción de ninhidrina del mismo modo que se ha descrito anteriormente, y se seleccionaron los 53 tipos de cepas con mayor capacidad para producir *L*-lisina en comparación con la cepa *KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-aceE(WT)*.

Ejemplo 4: Confirmación de las capacidades para producir *L*-lisina para cepas seleccionadas de la biblioteca de variantes artificiales E1p

25 Para comparar las capacidades de producir *L*-lisina de las 53 cepas diferentes seleccionadas en el ejemplo 3, se cultivaron las cepas por el método descrito a continuación y se analizaron los componentes de los cultivos obtenidos de las mismas.

30 Cada una de las cepas se inoculó en frascos esquineros de 250 ml que contenían 25 ml de un medio de cultivo de semillas, respectivamente, y se cultivaron en una incubadora con agitación (200 rpm) a 30 °C durante 20 horas. Cada uno de los frascos esquineros de 250 ml que contenían 24 ml de un cultivo productor de *L*-lisina se inoculó con 1 ml de un líquido de cultivo de semillas, y se cultivó en una incubadora con agitación (200 rpm) a 30 °C durante 72 horas. La concentración de *L*-lisina en cada cultivo se analizó mediante HPLC.

35 <Medio de cultivo de siembra (pH 7,0)>

40 Glucosa (20 g), Peptona (10 g), Extracto de Levadura (5 g), Urea (1,5 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (4 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (8 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g), Biotina (100 µg), Tiamina HCl (1000 µg), Ácido Calcio-Pantoténico (2000 µg), Nicotinamida (2000 µg) (basado en 1 l de agua destilada).

<Medio productor de lisina (pH 7,0)>

45 Glucosa (100 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40 g), Proteína de Soja (2,5 g), Sólidos de Maíz Steep (5 g), Urea (3 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0. 5 g), Biotina (100 µg), Tiamina HCl (1000 µg), Ácido Calcio-Pantoténico (2000 µg), Nicotinamida (3000 µg) y CaCO<sub>3</sub> (30 g) (a partir de 1 l de agua destilada).

50 Se seleccionaron las 10 cepas con mayores concentraciones de *L*-lisina de entre las 53 cepas diferentes, y se realizaron repetidamente el cultivo y el análisis descritos anteriormente. Las concentraciones de *L*-lisina analizadas se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Tabla 1]

Concentración de <i>L</i> -lisina producida por 10 cepas seleccionadas					
<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-aceE (mt)</i>					
Cepa		<i>L</i> -Lisina (g/l)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
Control	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-aceE (WT)</i>	42,1	41,9	41,7	41,9
1	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-aceE (mt)-1235</i>	45,1	46,2	45,8	45,7
2	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-aceE (mt)-1542</i>	45,6	46,1	44,9	45,5
3	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-aceE (mt)-3152</i>	46,1	45,7	46,0	45,9

4	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-a ceE (mt)-5013</i>	44,5	45,1	45,7	45,1
5	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-a ceE(mt)-5312</i>	45,9	44,9	46,1	45,6
6	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-a ceE (mt)-6001</i>	44,8	45,7	45,4	45,3
7	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-a ceE (mt)-7139</i>	46,1	46,3	45,9	46,1
8	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-a ceE (mt)-8264</i>	46,6	48,1	47,3	47,3
9	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-a ceE(mt)-9174</i>	45,6	45,1	44,8	45,2
10	<i>KCCM11016PΔaceE/pCR2.1-a ceE(mt)-9586</i>	46,1	46,6	45,9	46,2

Como resultado del análisis de la concentración de L-lisina, se confirmó que el rendimiento de L-lisina de las 10 cepas seleccionadas mostró un aumento máximo del 22 % en comparación con la cepa de control, la cepa *KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (WT)*.

Ejemplo 5: Confirmación de la modificación del gen *aceE* de cepas seleccionadas de la biblioteca de variantes artificiales E1p

Para confirmar las sustituciones introducidas en E1p de las 10 cepas seleccionadas en el ejemplo 4, se analizaron las secuencias polinucleotídicas de *aceE* modificado. Para determinar las secuencias polinucleotídicas, se realizó una PCR utilizando el cebador 1 (SEQ ID NO: 3) y el cebador 2 (SEQ ID NO: 4).

cebador 1 (SEQ ID NO: 3): 5'-TGGGA CCGGG AAACC GGG-3'

cebador 2 (SEQ ID NO: 4): 5'-GATTT ATCTG TCCCT TGA-3'

Las secuencias polinucleotídicas de cada uno de los fragmentos del gen *aceE* de tipo modificado obtenidos se confirmaron mediante análisis, y se compararon con la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 2, y así se confirmaron las secuencias de aminoácidos de las variantes de E1p. La información sobre las sustituciones de las secuencias de aminoácidos de la E1p de las cepas seleccionadas se muestra en la tabla 2.

[Tabla 2]

Sustitución de aminoácidos E1p de <i>KCCM11016P/pCR2.1-aceE (mt)</i> de 10 cepas seleccionadas	
Cepa	Sustitución de aminoácidos E1p
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-1235</i>	Q432E
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-1542</i>	E190V
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-3152</i>	L438P
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-5013</i>	Q195H
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-5312</i>	P199S
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-6001</i>	K435A
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-7139</i>	Q432A
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-8264</i>	Y418H
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-9174</i>	N428A
<i>KCCM11016PΔaceE /pCR2.1-aceE (mt)-9586</i>	Y201A

Ejemplo 6: Construcción de un vector para introducir la variante E1p en el cromosoma

Para confirmar el efecto de aplicación de la variante E1p confirmada en el ejemplo 5, se construyó un vector para introducir el mismo en el cromosoma.

El cebador 9 (SEQ ID NO: 12), que se introduce con un sitio de restricción *Xba* I en el extremo terminal 5', y el cebador 10 (SEQ ID NO: 13), que se introduce con un sitio de restricción *Xba* I en el extremo terminal 3', se sintetizaron basándose en las secuencias de polinucleótidos comunicadas. Los fragmentos del gen *aceE (mt)* de 10 cepas

diferentes de tipo modificado se amplificaron por PCR utilizando como plantillas los cromosomas de las 10 cepas diferentes seleccionadas, respectivamente.

5 La PCR se realizó en las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, recocido a 56 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 2 min; y polimerización a 72 °C durante 7 min.

cebador 9 (SEQ ID NO: 12): 5'-AATCT AGATG GGACC GGGAA ACCGG G-3'

10 cebador 10 (SEQ ID NO: 13): 5'-AATCT AGAGA TTTAT CTGTC CCTTG A-3'

15 Los fragmentos de genes amplificados por PCR de las 10 cepas diferentes se trataron con *Xba* I para obtener los respectivos fragmentos de ADN de los mismos, y los fragmentos se unieron al vector *pDZ* para introducir cromosomas que incluía un sitio de restricción *Xba* I, se transformaron en *E. coli DH5α* y se sembraron en medio LB sólido que contenía kanamicina (25 mg/l).

20 Las colonias transformadas con un vector insertado con un gen diana se seleccionaron por PCR y los plásmidos se obtuvieron mediante el método de extracción de plásmido conocido convencionalmente. Según la modificación insertada en E1p de cada plásmido, los plásmidos se denominaron como *pDZ-E1p* (Q432E), *pDZ-E1p* (E190V), *pDZ-E1p* (L438P), *pDZ-E1p* (Q195H), *pDZ-E1p* (P199S), *pDZ-E1p* (K435A), *pDZ-E1p* (Q432A), *pDZ-E1p* (Y418H), *pDZ-E1p* (N428A), and *pDZ-E1p*(Y201A), respectivamente.

25 Ejemplo 7: Construcción de una cepa derivada de *KCCM110.16P* introducida con la variante E1p y comparación de sus capacidades para producir *L*-lisina

30 *Corynebacterium glutamicum KCCM11016P*, una cepa productora de *L*-lisina, se transformó mediante una recombinación en 2 etapas de cromosomas homólogos usando los 10 vectores para introducir la variante novedosa E1p preparados en el ejemplo 6. Después, se seleccionaron las cepas introducidas con la variante E1p en los cromosomas analizando las secuencias de polinucleótidos, y los plásmidos se nombraron como *KCCM110.16P:E1p* (Q432E), *KCCM110.16P:E1p* (E190V), *KCCM110.16P:E1p* (L438P), *KCCM11016P:E1p* (Q195H), *KCCM110.16P:E1p* (P199S), *KCCM110.16P:E1p* (K435A), *KCCM110.16P:E1p* (Q432A), *KCCM110.16P:E1p* (Y418H), *KCCM110.16P:E1p* (N428A), y *KCCM110.16P:E1p* (Y201A) según con la variante E1p insertada, respectivamente.

35 Las cepas se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 4, y se analizaron las concentraciones de *L*-lisina de los cultivos. Para la medición de la tasa de crecimiento de las cepas construidas, la concentración de glucosa residual de los cultivos se midió 18 horas después del inicio del cultivo (tabla 3).

40 [Tabla 3]

Concentración (g/l) de glucosa residual y <i>L</i> -lisina producida por cepas derivadas de <i>KCCM110.16P</i> introducidas con la variante E1p									
Cepa	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Media		
	glucosa residual	<i>L</i> -lisina	glucosa residual	<i>L</i> -lisina	glucosa residual	<i>L</i> -lisina	glucosa residual	<i>L</i> -lisina	
Control	<i>KCCM110.16P</i>	35,8	42,8	34,5	41,6	35,1	43,1	35,1	42,5
50 1	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (Q432E)	41,2	46,2	40,5	45,8	42,1	45,2	41,3	45,7
2	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (E190V)	43,2	45,2	41,8	45,8	43	46,7	42,7	45,9
55 3	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (L438P)	40,5	45,1	41,1	45,9	40,6	45,8	40,7	45,6
4	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (Q195H)	38,1	44,5	37,5	45,2	38,5	44,9	38,0	44,9
60 5	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (P199S)	44,1	46,2	43,5	45,9	44,8	44,8	43,8	45,6
65 6	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (K435A)	44,1	45,2	43,5	45,1	42,9	46,5	43,5	45,6

7	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Q432A)	40,5	46,5	38,9	46,1	40,3	45,8	39,9	46,1
8	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Y418H)	38,5	47,5	37,6	46,6	39,1	46,5	38,4	46,9
9	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Y201A)	42,5	45,7	43,1	44,6	40,5	45,8	42,0	45,4
10	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (N428A)	39,8	46,5	40,1	47,9	40,3	46,2	40,1	46,9

Las nuevas 10 cepas diferentes (es decir, *KCCM110.16P*:E1p (Q432E), *KCCM110.16P*:E1p (E190V), *KCCM110.16P*:E1p (L438P), *KCCM110.16P*:E1p (Q195H), *KCCM110.16P*:E1p (P199S), *KCCM110.16P*:E1p (K435A), *KCCM110.16P*:E1p (Q432A), *KCCM110.16P*:E1p (Y418H), *KCCM110.16P*:E1p (Y201A), and *KCCM110.16P*:E1p (N428A)), mostraron una ligera disminución en la tasa de consumo de glucosa mientras muestra un aumento máximo del 10 % en la producción de lisina, en comparación con los de la cepa parental.

En este sentido, los presentes autores denominaron *KCCM110.16P*:(N428A), la cepa representativa entre las cepas con capacidad mejorada para producir *L*-lisina, como *Corynebacterium glutamicum* "CA01-228.9", y depositaron la cepa en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, reconocido como autoridad depositaria internacional en virtud del Tratado de Budapest, el 23 de octubre de 2014, con el número de acceso *KCCM115.90P*.

Tras el examen, se confirmó que las variantes E1p de las 10 cepas diferentes (es decir, E1p (Q432E) (SEQ ID NO: 14), E1p (E190V) (SEQ ID NO: 15), E1p (L438P) (SEQ ID NO: 16), E1p (Q195H) (SEQ ID NO: 17), E1p (P199S) (SEQ ID NO: 18), E1p (K435A) (SEQ ID NO: 19), E1p (Q432A) (SEQ ID NO: 20), E1p (Y418H) (SEQ ID NO: 21), E1p (Y201A) (SEQ ID NO: 22), y E1p (N428A) (SEQ ID NO: 23)) estaban fuertemente distribuidos en dos grupos (residuos de aminoácidos en las posiciones de 190 a 201, y aminoácidos en las posiciones de 418 a 438).

Diez cepas diferentes, en las que se incluyeron en combinación sustituciones pertenecientes a cada grupo, (es decir, *KCCM110.16P*:E1p (E190V, Q195H), *KCCM110.16P*:E1p (E190V, P199S), *KCCM110.16P*:E1p (Q195H, P199S), *KCCM110.16P*:E1p (E190V, Y201A), *KCCM110.16P*:E1p (Q195H, Y201A), *KCCM110.16P*:E1p (P199S, Y201A), *KCCM110.16P*:E1p (N428A, Q432E), *KCCM110.16P*:E1p (N428A, K435A), *KCCM110.16P*:E1p (Y418H, K435A), *KCCM110.16P*:E1p (Y418H, Q432A)) se sintetizaron, y sus capacidades para producir *L*-lisina se midieron de la misma manera que se describió anteriormente (tabla 4).

[Tabla 4]

Concentración (g/l) de glucosa residual y <i>L</i> -lisina producida por cepas derivadas de <i>KCCM11016P</i> introducidas con la combinación de sustituciones de E1p									
Cepa		Lote 1		Lote 2		Lote 3		Media	
		glucosa residual	<i>L</i> -lisina	glucosa residual	<i>L</i> -lisina	glucosa residual	<i>L</i> -lisina	glucosa residual	<i>L</i> -lisina
Control	<i>KCCM110.16P</i>	35,2	42,1	34,6	42,5	35,6	42,5	35,1	42,4
1	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (E190V, Q195H)	47,1	47,1	46,5	48,1	46	43,1	46,5	46,1
2	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (E190V, P199S)	45,2	45,2	46,3	46,1	46	45	45,8	45,4
3	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Q195H, P199S)	46,2	49,8	45,7	48,7	44	48,5	45,3	49,0
4	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (E190V, Y201A)	42,8	46,1	43,1	45,7	42,5	46	42,8	45,9
5	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Q195H, Y201A)	48,3	45,3	47,5	47,1	47	46,2	47,6	46,2
6	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (P199S, Y201A)	39,1	45,3	38,6	45,9	39,2	45,6	39,0	45,6
7	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (N428A, Q432E)	45,9	48,1	47,1	49,2	46,5	49,3	46,5	48,9

8	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (N428A, K435A)	46,1	47,9	45,8	48,3	46,7	47,9	46,2	48,0
9	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (Y418H, K435A)	38,2	45,9	37,6	45,7	39,1	46	38,3	45,9
10	<i>KCCM110.16P:E1p</i> (Y418H, Q432A)	41,2	46,1	40,9	45,1	39,9	47,2	40,7	46,1

Tal como se muestra en la tabla anterior, todas las 10 nuevas cepas con sustituciones combinadas mostraron una ligera disminución en la tasa de consumo de glucosa, mientras que mostraron un aumento máximo del 15,6 % en la capacidad de producir *L*-lisina. Los resultados confirman que una cepa que se introduce con una sustitución combinada puede mostrar una capacidad mejorada para producir *L*-lisina que una cepa que se introduce con una sola sustitución novedosa.

Los resultados confirman que las 10 cepas con nuevas variantes de la proteína E1p son cepas efectivas que pueden aumentar significativamente la capacidad de producir *L*-lisina mientras no reduce significativamente la tasa de consumo de glucosa, en comparación con la de la cepa parental, y también confirma que los residuos de aminoácidos en las posiciones de 190 a 205, o de 415 a 440 son regiones principales que pueden exhibir los efectos descritos anteriormente.

Ejemplo 8: Medición de la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa (PDHC) en cepas introducidas con la variante E1p

La actividad PDHC se midió con respecto a las cepas seleccionadas mediante el método descrito en la revista anterior (Schreiner y col., J. Bacteriol. 187:6005, 2005). Las cepas de control *KCCM110.16P* and *KCCM110.16P $\Delta$ aceE*, y las cepas seleccionadas (*KCCM110.16P:E1p*(Q432E), *KCCM110.16P:E1p*(E190V), *KCCM110.16P:E1p*(L438P), *KCCM110.16P:E1p*(Q195H), *KCCM110.16P:E1p*(P199S), *KCCM110.16P:E1p*(K435A), *KCCM110.16P:E1p*(Q432A), *KCCM110.16P:E1p*(Y418H), *KCCM110.16P:E1p*(A201A), and *KCCM170.76P:E1p*(N428A)), se inocularon en 25 ml del medio de cultivo de semillas especificado en el ejemplo 4, y se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía.

Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron dos veces con una solución tampón de Tris-HCl 100 mM (pH 7,2, 3 mM *L*-cisteína, MgCl<sub>2</sub> 10 mM), y finalmente se suspendieron en 2 ml de la misma solución tampón. La suspensión de las células se trituró físicamente mediante el método general de vórtex con perlas de vidrio durante 10 minutos, y el sobrenadante se recuperó realizando dos centrifugaciones (13.000 rpm, 4 °C y 30 min) y se utilizó como extracto crudo para la medición de la actividad de la enzima PDHC. Para medir la actividad de la enzima PDHC, se añadió una solución de reacción (10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3 mM de cisteína, 2 mM de NAD, 0,9 mM de difosfato de tiamina, 0,25 mM de clorpromazina, 6 mM de piruvato, 0,2 mM de CoA en tampón Tris-HCl (pH 7,2)) para medir la actividad enzimática en una cantidad de 0,95 mL con 0,05 mL del extracto crudo, y se hizo reaccionar a 30 °C. La unidad de actividad de PDHC se definió en términos de  $\mu$ moles de NADH consumidos por minuto, y los resultados de la medición de la actividad enzimática se muestran en la tabla 5 a continuación.

[Tabla 5]

Medición de la actividad enzimática de PDHC (%)	
Cepa	Actividad de PDHC (%)
<i>KCCM110.16P</i>	100
<i>KCCM110.16P<math>\Delta</math>aceE</i>	0
<i>KCCM110.16P:E1p</i> (Q432E)	39
<i>KCCM110.16P:E1p</i> (E190V)	56
<i>KCCM110.16P:E1p</i> (L438P)	53
<i>KCCM110.16P:E1p</i> (Q195H)	55
<i>KCCM110.16P:E1p</i> (P199S)	51
<i>KCCM110.16P:E1p</i> (K435A)	53
<i>KCCM110.16P:E1p</i> (Q432A)	42
<i>KCCM110.16P:E1p</i> (Y418H)	36

Medición de la actividad enzimática de PDHC (%)	
Cepa	Actividad de PDHC (%)
<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Y201A)	46
<i>KCCM110.16P</i> :E1p (N428A)	35

5 La actividad de PDHC de las cepas introducidas con nuevas variantes mostró la actividad del 35 % al 56 % en relación con la cepa original.

Ejemplo 9: Comparación de la capacidad de producir L-lisina con la cepa de delección *aceE*

15 Para la evaluación comparativa de *KCCM110.16PΔaceE*, la cepa de delección de *aceE* construida en el ejemplo 2, y las 10 cepas seleccionadas (*KCCM110.16P*:E1p (Q432E), *KCCM110.16P*:E1p (E190V), *KCCM110.16P*:E1p (L438P), *KCCM110.16P*:E1p (Q195H), *KCCM110.16P*:E1p (P199S), *KCCM110.16P*:E1p (K435A), *KCCM110.16P*:E1p (Q432A), *KCCM110.16P*:E1p (Y418H), *KCCM110.16P*:E1p (Y201A), and *KCCM110.16P*:E1p (N428A)), las cepas se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 4 usando medios que contenían acetato de amonio. La concentración de L-lisina de los cultivos resultantes se analizó mediante HPLC, y para la medición de la tasa de crecimiento de las cepas construidas, se midió la concentración de glucosa residual 18 horas después del inicio del cultivo (tabla 6).

<Medio productor de lisina que contiene acetato de amonio (pH 7,0)>

25 Glucosa (100 g), CH<sub>3</sub>COONH<sub>3</sub> (5 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40 g), Proteína de Soja (2,5 g), Sólidos de Maíz Steep (5 g), Urea (3 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g), Biotina (100 μg), Tiamina HCl (1000 μg), Ácido Calcio-Pantoténico (2000 μg), Nicotinamida (3000 μg) y CaCO<sub>3</sub> (30 g) (a partir de 1 l de agua destilada).

[Tabla 6]

Concentración (g/l) de glucosa residual y L-lisina producida por cepas derivadas de <i>KCCM110.16P</i> introducidas con variantes de E1p y cepas con delección de <i>aceE</i>									
Cepa		Lote 1		Lote 2		Lote 3		Media	
		glucosa residual	L-lisina	glucosa residual	L-lisina	glucosa residual	L-lisina	glucosa residual	L-lisina
Control	<i>KCCM110.16P</i>	45,7	40,9	45,6	42,1	46,7	41,3	46,0	41,4
Grupo experimental	<i>KCCM110.16PΔaceE</i>	67,1	45,6	66,8	45,2	68,2	45,4	67,4	45,4
1	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Q432E)	48,2	43,7	46,5	44,2	47,5	43,4	47,4	43,8
2	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (E190V)	49,7	44,6	47,8	43,8	48,1	44,4	48,5	44,3
3	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (L438P)	47,9	45,3	48,9	43,2	47,5	44,6	48,1	44,4
4	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Q195H)	46,7	42,9	46,3	43,6	45,6	43,0	46,2	43,2
5	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (P199S)	50,4	45,2	50,6	45,1	51,2	44,6	50,7	45,0
6	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (K435A)	51,3	44,9	50,9	45,2	52,7	45,0	51,6	45,0
7	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Q432A)	48,9	45,6	47,8	46,0	47,9	45,9	48,2	45,8
8	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Y418H)	44,6	45,8	45,7	46,5	47,3	46,3	45,9	46,2
9	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (Y201A)	47,6	43,8	46,7	44,5	48,7	43,7	47,7	44,0

Concentración (g/l) de glucosa residual y L-lisina producida por cepas derivadas de KCCM110.16P introducidas con variantes de E1p y cepas con delección de <i>aceE</i>									
Cepa		Lote 1		Lote 2		Lote 3		Media	
		glucosa residual	L-lisina	glucosa residual	L-lisina	glucosa residual	L-lisina	glucosa residual	L-lisina
10	<i>KCCM110.16P</i> :E1p (N428A)	49,7	46,2	47,8	45,2	48,3	45,7	48,6	45,7

La cepa *KCCM11016P* $\Delta$ *aceE* mostró un aumento del 9,6 % en la capacidad de producir L-lisina, pero una tasa de crecimiento significativamente reducida, en comparación con la cepa original. Por el contrario, las cepas introducidas con sustituciones mostraron un aumento del rendimiento de lisina y de la tasa de consumo de glucosa similar a cuando no se añadió acetato de amonio.

Los resultados indican que la cepa introducida con las variantes *aceE* puede producir lisina en alto rendimiento sin un efecto notable en la tasa de crecimiento, en comparación con la cepa de delección *aceE* que puede aumentar el rendimiento de lisina con una disminución significativa de la tasa de crecimiento.

Ejemplo 10: Construcción de cepas derivadas de *KFCC107.50* introducidas con la variante E1p y comparación de sus capacidades para producir L-lisina

Para confirmar los efectos de la introducción de las 10 nuevas variantes en otras cepas del género *Corynebacterium glutamicum*, se introdujeron cepas en las que cada una de las 10 variantes E1p diferentes se introdujo respectivamente en *Corynebacterium glutamicum* *KFCC107.50* (el microorganismo mencionado se publicó por primera vez como *KFCC107.50* y se volvió a depositar en una autoridad internacional de depósito en virtud del Tratado de Budapest y se le asignó el número de registro *KCCM113.47P*, Patente coreana n.º 10-007.361.0), una cepa productora de L-lisina, se construyeron de la misma manera que en el ejemplo 7, y las cepas se denominaron *KFCC107.50*:E1p (Q432E), *KFCC107.50*: E1p (E190V), *KFCC107.50*:E1p (L438P), *KFCC107.50*:E1p (Q195H), *KFCC107.50*:E1p (P199S), *KFCC107.50*:E1p (K435A), *KFCC107.50*:E1p (Q432A), *KFCC107.50*:E1p (Y418H), *KFCC107.50*:E1p (Y201A) y *KFCC107.50*:E1p (N428A). Las once cepas que incluyen la cepa *KFCC107.50* como cepa de control, se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 4, y se analizó la concentración de L-lisina de los cultivos de las cepas (tabla 7).

[Tabla 7]

Concentración de L-lisina producida por cepas derivadas de <i>KCCM107.50P</i> introducidas con la variante E1p					
Cepa		L-Lisina (g/l)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
Control	<i>KFCC107.50</i>	38,8	38,1	37,9	38,3
1	<i>KFCC107.50</i> :E1p (Q432E)	43,1	42,8	43,5	43,1
2	<i>KFCC107.50</i> :E1p (E190V)	41,2	42,1	41,8	41,7
3	<i>KFCC107.50</i> :E1p (L438P)	40,9	41,3	41,5	41,2
4	<i>KFCC107.50</i> :E1p (Q195H)	41,6	42,3	41,8	41,9
5	<i>KFCC107.50</i> :E1p (P199S)	42	42,4	41,9	42,1
6	<i>KFCC107.50</i> :E1p (K435A)	41,8	42,1	42,2	42,0
7	<i>KFCC107.50</i> :E1p (Q432A)	40,2	41,1	41,2	40,8
8	<i>KFCC107.50</i> :E1p (Y418H)	44,5	44,9	44,8	44,7
9	<i>KFCC107.50</i> :E1p (Y201A)	40,9	41	41,1	41,0
10	<i>KFCC107.50</i> :E1p (N428A)	44,5	44,1	45,8	44,8

Como resultado, se confirmó que las 10 cepas diferentes introducidas con variantes nuevas tenían un aumento máximo del 17 % de la capacidad de producir L-lisina en comparación con la cepa original.

Ejemplo 11: Construcción de cepas derivadas de *KCCM107.70P* introducidas con la variante E1p y comparación de sus capacidades para producir *L*-lisina

Para confirmar los efectos de la introducción de las 10 nuevas variantes en otras cepas del género *Corynebacterium glutamicum*, se construyeron cepas en las que cada variante E1p se introdujo en *Corynebacterium glutamicum KCCM107.70P* (patente coreana n.º 10-092.406.5), una cepa productora de *L*-lisina, de la misma manera que en el ejemplo 7, y las cepas se denominaron como *KCCM107.70P*:E1p (Q432E), *KCCM107.70P*:E1p (E190V), *KCCM107.70P*:E1p (L438P), *KCCM107.70P*:E1p (Q195H), *KCCM107.70P*:E1p (P199S), *KCCM107.70P*:E1p (K435A), *KCCM107.70P*:E1p (Q432A), *KCCM107.70P*:E1p (Y418H), *KCCM107.70P*:E1p (Y201A) y *KCCM107.70P*:E1p (N428A). Las cepas que incluyen la cepa *KFCC107.50* como cepa de control, se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 4, y se analizó la concentración de *L*-lisina de los cultivos de las cepas (tabla 8).

[Tabla 8]

Concentración de <i>L</i> -lisina producida por cepas derivadas de <i>KCCM107.70P</i> introducidas con la variante E1p					
Cepa		<i>L</i> -Lisina (g/l)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
Control	<i>KCCM107.70P</i>	48,1	47,5	47,8	47,8
1	<i>KCCM107.70P</i> :E1p (Q432E)	53,3	53,4	54,1	53,6
2	<i>KCCM107.70P</i> :E1p (E190V)	51,2	52,1	52,8	52,0
3	<i>KCCM107.70P</i> :E1p (L438P)	51,5	51,3	50,7	51,2
4	<i>KCCM107.70P</i> :E1p (Q195H)	51,9	52,1	52	52,0
5	<i>KCCM107.70P</i> :E1p (P199S)	51,3	52,1	52,7	52,0
6	<i>KCCM10770P</i> :E1p (K435A)	52,4	52,6	51,4	52,1
7	<i>KCCM10770P</i> :E1p (Q432A)	50,2	51,2	50	50,5
8	<i>KCCM10770P</i> :E1p (Y418H)	55,8	54,5	54,1	54,8
9	<i>KCCM10770P</i> :E1p (Y201A)	49,9	50,3	50,7	50,3
10	<i>KCCM10770P</i> :E1p(N428A)	56,1	55,7	55,9	55,9

Como resultado, se confirmó que las 10 cepas introducidas con variantes nuevas tenían un aumento máximo del 17 % de la capacidad de producir *L*-lisina en comparación con la cepa original.

Ejemplo 12: Construcción de cepas derivadas de *CJ3P* introducidas con la variante E1p y comparación de sus capacidades para producir *L*-lisina

Para confirmar los efectos de la introducción de las variantes de E1p en otras cepas del género *Corynebacterium glutamicum*, se utilizaron cepas en las que se introdujo cada variante de E1p en *Corynebacterium glutamicum CJ3P* (Binder y col., Genome Biology 2012, 13: R40), una cepa productora de *L*-lisina, se construyeron de la misma manera que en el ejemplo 7, y las cepas se denominaron como *CJ3P*:E1p (Q432E), *CJ3P*:E1p (E190V), *CJ3P*:E1p (L438P), *CJ3P*:E1p (Q195H), *CJ3P*:E1p (P199S), *CJ3P*:E1p (K435A), *CJ3P*:E1p (Q432A), *CJ3P*:E1p (Y418H), *CJ3P*:E1p (Y201A) y *CJ3P*:E1p (N428A). Las cepas se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 4, y se analizó la concentración de *L*-lisina de los cultivos de las cepas (tabla 9).

[Tabla 9]

Concentración de <i>L</i> -lisina producida por cepas derivadas de <i>CJ3P</i> introducidas con la variante E1p					
Cepa		<i>L</i> -Lisina (g/l)			
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media
Control	<i>CJ3P</i>	8,2	8,3	8	8,2

Concentración de L-lisina producida por cepas derivadas de <i>CJ3P</i> introducidas con la variante E1p					
Cepa	L-Lisina (g/l)				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Media	
1	<i>CJ3P</i> :E1p (Q432E)	9,5	9,3	9,4	9,4
2	<i>CJ3P</i> :E1p (E190V)	8,8	9	8,7	8,8
3	<i>CJ3P</i> :E1p (L438P)	9,1	8,7	8,9	8,9
4	<i>CJ3P</i> :E1p (Q195H)	9,2	8,9	9	9,0
5	<i>CJ3P</i> :E1p (P199S)	9,3	9	9,1	9,1
6	<i>CJ3P</i> :E1p (K435A)	9,1	9	8,9	9,0
7	<i>CJ3P</i> :E1p (Q432A)	8,7	8,9	8,8	8,8
8	<i>CJ3P</i> :E1p (Y418H)	9,6	9,6	9,5	9,6
9	<i>CJ3P</i> :E1p (Y201A)	8,7	8,7	8,9	8,8
10	<i>CJ3P</i> :E1p (N428A)	9,7	9,8	9,8	9,8

Como resultado, se confirmó que las 10 cepas diferentes introducidas con variantes nuevas tenían un aumento máximo del 19,5 % de la capacidad de producir L-lisina en comparación con la cepa original.

Los resultados indican que cada una de las 10 cepas diferentes recién obtenidas con la variante E1p (E1p (Q432E), E1p (E190V), E1p (L438P), E1p (Q195H), E1p (P199S), E1p (K435A), E1p (Q432A), E1p (Y418H), E1p (Y201A), y E1p (N428A)) tiene un excelente efecto de aumento de la capacidad de producir L-lisina, respectivamente.

Ejemplo 13: Construcción de cepas derivadas de *KCCM11201P* introducidas con la variante E1p y comparación de sus capacidades para producir L-valina

Para confirmar los efectos de las 10 cepas seleccionadas con variantes E1p en otras cepas productoras de aminoácidos del género *Corynebacterium glutamicum*, se construyeron cepas en las que se introdujo la variante E1p en *Corynebacterium glutamicum* *KFCC112.01P* (patente coreana n.º 10-111.702.2), una cepa productora de L-valina, de la misma manera que en el ejemplo 7, y las cepas se denominaron como *KCCM112.01P*:E1p (Q432E), *KCCM112.01P*:E1p (E190V), *KCCM112.01P*:E1p (L438P), *KCCM112.01P*:E1p (Q195H), *KCCM112.01P*:E1p (P199S), *KCCM112.01P*:E1p (K435A), *KCCM112.01P*:E1p (Q432A), *KCCM112.01P*:E1p (Y418H), *KCCM 112.01 P*:E1p (Y201A) y *KCCM112.01P*:E1p (N428A).

Para la evaluación de las cepas, cada una de ellas se inoculó en matraces esquineros de 250 ml que contenían 25 ml de L-valina especificados a continuación, respectivamente, y se cultivaron en una incubadora con agitación (200 rpm) a 30 °C durante 20 horas. La concentración de L-valina en cada cultivo se analizó mediante HPLC (tabla 10).

<Medio productor de valina (pH 7,2)>

Glucosa (50 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 g), líquido Corn Steep (20 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,5 g), biotina (200 µg) y CaCO<sub>3</sub> (30 g) (a partir de 1 l de agua destilada).

[Tabla 10]

Concentración de L-valina producida por cepas derivadas de <i>KCCM112.01P</i> introducidas con la variante E1p				
Cepa	L-valina (g/l)			
	Lote 1	Lote 2	Media	
Control	<i>KCCM112.01P</i>	2,8	2,8	2,8
1	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (Q432E)	3,1	3,0	3,1
2	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (E190V)	3,3	3,2	3,3

## ES 2 959 213 T3

Concentración de <i>L</i> -valina producida por cepas derivadas de <i>KCCM112.01P</i> introducidas con la variante E1p				
Cepa		<i>L</i> -valina (g/l)		
		Lote 1	Lote 2	Media
3	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (L438P)	3,2	3,2	3,2
4	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (Q195H)	3,0	3,1	3,1
5	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (P199S)	3,1	3,3	3,2
6	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (K435A)	3,1	3,1	3,1
7	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (Q432A)	3,2	3,2	3,2
8	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (Y418H)	3,3	3,4	3,4
9	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (Y201A)	3,0	3,0	3,0
10	<i>KCCM112.01P</i> :E1p (N428A)	3,4	3,4	3,4

Como resultado, se confirmó que las 10 cepas diferentes introducidas con variantes nuevas tenían un aumento máximo del 21 % de la capacidad de producir *L*-valina en comparación con la cepa original.

Ejemplo 14: Construcción de cepas derivadas de tipos naturales introducidas con la variante E1p y comparación de sus capacidades para producir *L*-valina

Para reconfirmar la capacidad de producir *L*-valina de las cuatro variantes diferentes, entre las 10 variantes E1p seleccionadas, que mostraban el efecto de un elevado aumento del rendimiento de *L*-valina, se construyeron cepas en las que se introdujo cada variante E1p en *Corynebacterium glutamicum* ATCC130.32 del mismo modo que en el ejemplo 7, y las cepas se denominaron ATCC130.32:E1p (E190V), ATCC130.32:E1p (L438P), ATCC130.32:E1p (Y418H) y ATCC130.32:E1p (N428A).

Para confirmar la capacidad de producir *L*-valina de las cepas anteriores, cada una de las cepas se transformó con *pECCG117-DvalS* (publicación de solicitud de patente coreana n.º 10-201.4-011.142.1), que es un vector de sobreexpresión para la biosíntesis de *L*-valina, mediante electroporación. Las cepas transformadas se obtuvieron a partir de medios selectivos que contenían kanamicina (25 mg/l) y se denominaron ATCC130.32:E1p (E190V)<sub>DvalS</sub>, ATCC130.32:E1p (L438P)<sub>DvalS</sub>, ATCC130.32:E1p (Y418H)<sub>DvalS</sub> y ATCC130.32:E1p (N428A)<sub>DvalS</sub>.

Las cepas se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 13 y se analizó la concentración de *L*-valina en cada cultivo (tabla 11).

[Tabla 11]

Concentración de <i>L</i> -valina producida por cepas derivadas de tipos naturales introducidas con la variante E1p				
Cepa		<i>L</i> -valina (g/l)		
		Lote 1	Lote 2	Media
	<i>ATCC130.32</i>	0,1	0,1	0,1
Control	<i>ATCC130.32_DvalS</i>	1,3	1,2	1,3
1	<i>ATCC130.32</i> :E1p (E190V)	0,1	0,1	0,1
2	<i>ATCC130.32</i> :E1p (E190V) <sub>DvalS</sub>	1,5	1,7	1,6
3	<i>ATCC130.32</i> :E1p (L438P)	0,1	0,1	0,1
4	<i>ATCC130.32</i> :E1p (L438P) <sub>DvalS</sub>	1,4	1,4	1,4
5	<i>ATCC130.32</i> :E1p (Y418H)	0,1	0,1	0,1
6	<i>ATCC130.32</i> :E1p (Y418H) <sub>DvalS</sub>	1,8	1,7	1,8
7	<i>ATCC130.32</i> :E1p (N428A)	0,1	0,1	0,1

## ES 2 959 213 T3

Concentración de <i>L</i> -valina producida por cepas derivadas de tipos naturales introducidas con la variante E1p				
Cepa		<i>L</i> -valina (g/l)		
		Lote 1	Lote 2	Media
8	<i>ATCC130.32</i> :E1p (N428A)_ <i>DvalS</i>	1,9	1,7	1,8

5

10

Como resultado, se confirmó que las cuatro cepas diferentes introducidas con variantes nuevas tenían un aumento máximo del 38 % de la capacidad de producir *L*-valina en comparación con la cepa de control.

REIVINDICACIONES

1. Una variante de una piruvato deshidrogenasa original en la que dicha piruvato deshidrogenasa parental comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- 5 en donde dicha variante de piruvato deshidrogenasa tiene al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en aminoácidos en las posiciones 190, 199, 201, 418, 428, 432, 435 y 438 en la secuencia de SEQ ID NO: 1, y
- 10 en donde la actividad de la variante de piruvato deshidrogenasa se debilita con respecto a la enzima de SEQ ID NO: 1.
2. La variante de piruvato deshidrogenasa según la reivindicación 1, en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución en la posición 190 de ácido glutámico a valina (E190V), una sustitución en la posición 199 de prolina a serina (P199S), y una sustitución en la posición 201 de tirosina a alanina (Y201A).
- 15
3. La variante de piruvato deshidrogenasa según la reivindicación 1, en donde la sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en una sustitución en la posición 418 de tirosina a histidina (Y418H), una sustitución en la posición 428 de asparagina a alanina (N428A), una sustitución en la posición 432 de glutamina a ácido glutámico (Q432E), una sustitución en la posición 432 de glutamina a alanina (Q432A), una sustitución en la posición 435 de lisina a alanina (K435A) y una sustitución en la posición 438 de leucina a prolina (L438P).
- 20
4. La variante de piruvato deshidrogenasa según la reivindicación 1, en donde que la secuencia de aminoácidos de la variante de piruvato deshidrogenasa se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14 a 16, y 18 a 33.
- 25
5. Un polinucleótido que codifica para la homoserina deshidrogenasa modificada seleccionada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30
6. Un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce *L*-aminoácido en donde el microorganismo comprende la variante de piruvato deshidrogenasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35
7. El microorganismo según la reivindicación 6, en donde dicho microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*.
8. Un método para producir *L* -aminoácido, que comprende:
- 40 (a)cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* según la reivindicación 6 en un medio para producir un *L*-aminoácido; y
- (b)recuperar el *L*-aminoácido del microorganismo cultivado o del medio.