



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0603790-9 B1



(22) Data do Depósito: 13/09/2006

(45) Data de Concessão: 22/12/2020

(54) Título: MICROORGANISMO E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE L-LISINA

(51) Int.Cl.: C12N 1/21; C12P 13/08.

(30) Prioridade Unionista: 30/11/2005 KR 10-2005-0115904.

(73) Titular(es): CJ CHEILJEDANG CORPORATION.

(72) Inventor(es): YOUNG HOON PARK; HYUN MIN KOO; SANG JO LIM; JUN OK MOON; YOUNG LYEOL YANG.

(57) Resumo: Microorganismo e método de produção de L-lisina. A presente invenção proporciona um microorganismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* e tem um gene da desidrogenase NCg12053 inerente inativado e um método de produção de L-lisina que usa o mesmo. Usando o microorganismo, o rendimento de L-lisina é aumentado, visto que um gene da desidrogenase NCg12053 inerente está inativado. De acordo com o método, a L-lisina pode ser produzida com elevado rendimento.

“Microorganismo e método de produção de L-lisina”**Referência Remissiva****a Pedido de Patente Relacionado**

5 Este Pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Coreano 10-2005-0115904, depositado em 30 de novembro de 2005, no Escritório de Propriedade Intelectual Coreano, cuja revelação é aqui incorporada na sua totalidade por referência.

Antecedentes da Invenção**1 - Campo da Invenção**

10 A presente invenção relaciona-se a um microorganismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* e tem produtividade intensificada de L-lisina e um método de produção de L-lisina que usa o mesmo.

2 - Descrição da Técnica Relacionada

15 Uma cepa do gênero *Corynebacterium*, particularmente *Corynebacterium glutamicum*, é um microorganismo que é extensivamente usado para produzir L-aminoácido. O L-aminoácido, particularmente a L-lisina, é usado para produzir alimentos para animais e medicamentos para humanos e também é usado na indústria farmacêutica. O L-aminoácido é produzido pela fermentação da cepa de *Corynebacterium*,
20 mas, visto que o método pelo qual o L-aminoácido é produzido usando o gênero *Corynebacterium* é importante, tem havido extensivas tentativas para melhorar o método.

25 Uma dessas tentativas para melhorar a produção de L-aminoácido usando uma cepa do gênero *Corynebacterium* envolve destruir ou atenuar a expressão de um gene específico usando tecnologia de DNA recombinante. Por exemplo, na Patente US 6.872.553, é provido um processo para a preparação fermentativa de L-aminoácidos, incluindo o processo a) uma fase de crescimento do *Corynebacterium* em que a codificação do DNA da carboxiquinase (pck) do piruvato de fosfoenol (PEP) é
30 atenuada por um método de mutagênese selecionado do grupo que consiste em mutagênese de inserção, por inserção de pelo menos um par de bases, mutagênese de apagamento, com apagamento de pelo menos um

par de bases, e mutagênese de transição ou de transversão com a incorporação de uma mutação de não sentido da atividade do referido polipeptídeo é reduzida em comparação com uma *Corynebacterium* não atenuada; b) uma fase de concentração do produto de L-aminoácido pretendido no meio ou células da citada bactéria; e c) uma fase de isolamento de separação de dito produto de L-aminoácido.

Também tem havido extensiva pesquisa sobre os efeitos de amplificar os genes que se relacionam com a biossíntese do L-aminoácido individual na produção de L-aminoácido e sobre a melhoria da cepa de *Corynebacterium* de produção de L-aminoácido (Eggeling, *Aminoacids* **6**, 261-272 (1994).) Além disso, tem havido tentativas de introduzir um gene estranho de origem bacteriana diferente. Por exemplo, no Pedido Japonês Publicado Hei 7-121228, é provido um processo de cultura de um microorganismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* ou ao gênero *Brevibacterium* e que possui um fragmento de DNA tendo informações de gene relacionadas à síntese da sintase do ácido cítrico de um microorganismo e DNA recombinante de DNA de vetor e um método de produção de ácidos L-glutâmicos e L-prolina no meio.

Todavia, de acordo com os referidos métodos, é almejado o uso de uma cepa tendo produtividade intensificada de L-lisina.

Sumário da Invenção

A presente invenção proporciona um microorganismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* e tem produtividade intensificada de L-lisina.

A presente invenção também provê um método de produção de L-lisina que usa o microorganismo do gênero *Corynebacterium*.

Breve Descrição dos Desenhos

As características e vantagens acima e outras da presente invenção tornar-se-ão mais evidentes pela descrição detalhada de modalidades exemplificativas com referência aos desenhos anexos em que:

a **Figura 1** é um diagrama que ilustra um vetor pCR-2053 clonado com um fragmento de gene NCgl2053 de cerca de 500 bp.

309

Descrição Detalhada da Invenção

De acordo com um aspecto da presente invenção, é provido um microorganismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* que tem um gene da desidrogenase NCgl2053 inerente que é inativado e produz lisina.

O gene da desidrogenase NCgl2053 inerente tem atividade de desidrogenase e existe inerentemente num microorganismo do gênero *Corynebacterium* (Nakagawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**(2-3), 99-109 (2003).). A atividade do gene da desidrogenase é estimada a partir de uma análise da seqüência completa do genoma de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. O gene da desidrogenase pode ter a seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1.

Um microorganismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* e tem um gene da desidrogenase NCgl2053 inerente inativado de acordo com uma modalidade da presente invenção pode ser *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium glutamicum* KFCC 10881 ou *Corynebacterium glutamicum* KFCC 11001, mas, não fica limitado a estes exemplos.

A inativação pode ser introduzida usando qualquer método conhecido na técnica. No microorganismo da presente invenção, o termo "inativação" pretende significar que o gene da desidrogenase NCgl2053 é expresso mais baixo do que a expressão de uma cepa selvagem ou não é absolutamente expresso ou mesmo, se o gene da desidrogenase NCgl2053 estiver expresso na desidrogenase NCgl2053, a desidrogenase NCgl2053 não tem nenhuma atividade ou tem atividade atenuada.

Numa modalidade da presente invenção, a inativação pode ser introduzida usando um método de mutagênese selecionado do grupo que consiste em mutagênese de inserção por inserção de pelo menos um par de bases no gene da desidrogenase NCgl2053, mutagênese de apagamento por apagamento de pelo menos um par de bases no gene da desidrogenase NCgl2053, e mutagênese de transição ou de transversão pela incorporação de um códon de não sentido.

B1
20

5 Numa modalidade da presente invenção, a inativação pode ser introduzida transformando uma bactéria que pertence ao gênero *Corynebacterium* com um vetor tendo um marcador antibiótico e uma região parcial do gene da desidrogenase NCgl2053 e cultivando a bactéria transformada sob os antibióticos. Por exemplo, o vetor pode ser pCR-2053, que inclui parte de um gene NCgl2053 de SEQ ID NO:2. A transformação de um vetor tendo uma parte do gene no microorganismo e a cultura sob o marcador selecionado conduz à recombinação homóloga de parte de uma seqüência do gene e um gene inerente do microorganismo.

10 O gene inerente do microorganismo é recombinado através da recombinação homóloga e do microorganismo tendo o gene recombinante, apenas o microorganismo recombinante tendo o marcador acima descrito é selecionado. Como resultado, pode ser obtido o microorganismo que pertence ao gênero *Corynebacterium* e tem o gene da desidrogenase NC-

15 gl2053 inerente inativado. Contudo, um método de obtenção do microorganismo da presente invenção não fica limitado a esta recombinação homóloga e pode ser usado qualquer método conhecido na técnica.

O microorganismo pode ser *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881- CJP5102 (Acesso No. KCCM-10709P).

20 De acordo com outro aspecto da presente invenção, é provido um método de produção de L-lisina, que inclui: a cultura do microorganismo da presente invenção para produzir L-lisina num meio ou células e coletar a L-lisina a partir da cultura.

25 No método da presente invenção, pode ser cultivado o microorganismo do gênero *Corynebacterium* usando quaisquer condições de cultura e método conhecido na técnica. Um exemplo de um meio de cultura para cultivar a cepa de *Corynebacterium* é o meio de cultura descrito no *Manual of Methods for General Bacteriology* pela American Society for Bacteriology (Washington D.C., EUA, 1981).

30 Podem ser usadas no meio fontes de carboidrato que incluem o seguinte: açúcares e carboidratos tais como glicose, sacarose, lactose, frutose, maltose, amido e celulose; óleos e gorduras, tais como óleo de

soja, óleo de girassol, óleo de ricino e óleo de coco: ácidos graxos tais como ácido palmítico, ácido esteárico e ácido linolênico; álcoois, tais como etanol; e ácidos orgânicos, tais como ácido acético. Os exemplos das fontes de açúcar mencionadas acima podem ser usados sozinhos ou em
5 combinação. Os exemplos de fontes de nitrogênio incluem o seguinte: peptona, extratos de levedura, extratos de carne, extratos de malte, licor de milho embebido, alimento de soja e uréia ou compostos inorgânicos tais como sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, carbonato de amônio, amônia e nitrato. As fontes de nitrogênio acima podem ser usadas sozinhas ou em combinação. Os exemplos de fontes de
10 fósforo incluem o seguinte: dihidrogênio fosfato de potássio, hidrogênio fosfato de dipotássio ou os correspondentes sais de sódio dos mesmos. Também o meio de cultura pode incluir sais metálicos, tais como sulfato de magnésio ou sulfato de ferro, que é necessário para o crescimento. Além disso, podem ser usados materiais essenciais para o crescimento, tais como aminoácidos e vitaminas além dos ingredientes acima. Além disso, podem ser usados precursores adequados no meio de cultura. Os
15 ingredientes acima podem ser adicionados ao meio de cultura durante o cultivo num modo de batelada ou de uma maneira contínua.

20 O pH do meio pode ser controlado usando um composto básico tal como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou amônia, ou um composto ácido, tal como ácido fosfórico ou ácido sulfúrico. Também o uso de um agente anti-espumante tal como éster poliglicólico de graxo ácido pode suprimir a geração de espuma. Pode ser injetado oxigênio ou
25 um gás contendo oxigênio tal como ar no meio, a fim de manter a condição aeróbica. A temperatura do meio é de 20 a 45°C, de preferência de 25 a 40°C. A cultura pode ser realizada até que seja produzida uma quantidade pretendida de L-lisina, mas, a cultura é desejavelmente realizada durante de 10 a 160 horas.

30 A cultura pode ser realizada de várias maneiras incluindo em batelada, batelada de alimentação, batelada de alimentação repetida e de maneira contínua. Este método é bem conhecido na técnica e a presente

invenção não fica limitada a ele.

O L-aminoácido pode ser separado e analisado através de cromatografia de permuta aniônica e geração derivada de ninidrina.

5 Para desenvolver o microorganismo e o método da presente invenção, os inventores da presente invenção primeiro cultivaram *Coryne-*
nebacterium glutamicum ATCC 13032 na presença de L-lisina, analisa-
ram os níveis de proteínas expressas a partir do *Corynebacterium gluta-*
micum ATCC 13032 usando eletroforese bidimensional e compararam os
10 níveis de proteínas expressas com aqueles de experiências comparativas em que a cultura foi realizada sem L-lisina. Como resultado, identifica-
mos proteínas que são sobreexpressas na presença de L-lisina, isto é, prote-
teínas a serem presumivelmente induzidas pela presença de lisina. Ba-
seadas em informações das proteínas identificadas, foram determinadas
informações de gene das proteínas acima usando os US National Institu-
15 tes of Health GenBank (NIH GenBank) e as proteínas foram confirmadas serem NCgl1835 e NCgl2053.

Além disso, foi confirmado se os genes acima são realmente induzidos na presença de lisina. Primeiro, uma região do ácido nucleico considerada ser um promotor dos genes acima foi amplificada por PCR e,
20 depois, o ácido nucleico promotor amplificado foi fundido com o gene LacZ cujo promotor foi removido, para obter um gene de fusão do promo-
tor dos genes acima identificados-sequência de codificação LacZ. O gene de fusão obtido foi inserido num vetor e o vetor foi introduzido num mi-
croorganismo. O microorganismo obtido foi cultivado na presença de
25 lisina e foi confirmado se a proteína lacZ é expressa, medindo a atividade de β -galactosidase. Como resultado, foi confirmado que a expressão dos genes acima é induzida pela lisina.

Todavia, não é conhecido como os genes acima estão associ-
ados com a biossíntese da lisina no microorganismo de produção de lisi-
30 na. Os inventores da presente invenção mediram a quantidade de lisina produzida por inativação do gene NCgl2053 inerente de um microorga-
nismo de *Corynebacterium* e confirmaram que a quantidade de lisina

produzida estava realmente aumentada, além da identificação dos genes sobreexpressos na presença de lisina.

Exemplos

A presente invenção será, agora, descrita em maior detalhe com referência aos exemplos seguintes. Estes exemplos são apenas para propósitos ilustrativos e não se pretende que limitem o âmbito da presente invenção.

Nos exemplos seguintes, foi preparado um microorganismo recombinante por inativação do gene NCgl2053 inerente de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881, o microorganismo recombinante cultivado para produzir lisina na cultura e foi medida a quantidade de lisina produzida.

Exemplo 1

Produção de Vetor Para Inativar o Gene NCgl2053 Inerente do Microorganismo do Gênero *Corynebacterium*

Neste Exemplo, a fim de produzir um vetor tendo um marcador de antibiótico e parte da seqüência de DNA de NCgl2053, foi amplificado um fragmento de gene NCgl2053 de cerca de 500bp (SEQ. ID. NO.2; 170 a 650 nucleotídeos de SEQ. ID. NO:1) usando uma PCR usando os oligonucleotídeos de SEQ ID. NOS. 3 e 4 como iniciadores e o DNA do cromossomo de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 como modelo (*template*). A PCR foi repetida 30 vezes por desnaturação a uma temperatura de 96°C durante 30 segundos, anelamento a uma temperatura de 52°C durante 30 segundos e polimerização a uma temperatura de 72°C durante 30 segundos. O fragmento de gene NCgl2053 amplificado foi inserido no plasmídeo *E. coli* pCF2.1 usando um kit TOPO Cloning (Invitrogen, EUA) para produzir um plasmídeo pCR-2053. A Figura 1 mostra um vetor pCR-2053 em que foi clonado um fragmento de gene NCgl2053 de cerca de 500 bp.

Exemplo 2

Produção da Cepa de Produção de L-Lisina Tendo o Gene NCgl2053 Inerente Inativado de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881

Usando o método de transformação ilustrado em *Appl Microbiol. Biotechnol.* (1999) **52**:541-545, foi transformada *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881, que é uma cepa produtora de L-lisina, com o plasmídio pCR-2053 produzido no Exemplo 1 por um método de pulso elétrico e, depois, o microorganismo transformado foi cultivado no meio de seleção contendo 25mg/L de canamicina. Foi realizada uma PCR usando o DNA cromossômico das cepas transformadas como modelo (*template*) no segundo dia de cultura, a fim de confirmar se os genes NCgl2053 foram destruídos. A PCR foi realizada usando os oligonucleotídeos da SEQ ID. NO. 5 e 6 como iniciadores e o DNA cromossômico das cepas transformadas como modelo (*template*) para amplificar um fragmento de gene NCgl2053 com um comprimento de cerca de 5.150 bp (de 118 a 775 nucleotídeos da SEQ ID. NO.1) contendo o plasmídio pCR-2053. Como resultado, foi obtida uma cepa *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 em que os genes acima foram destruídos e a cepa, então, chamada *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CJP5102. Considera-se que os genes acima estão destruídos incorporando o plasmídio pCR-2053 no meio de genes NCgl2053 inerentes de um DNA cromossômico através da recombinação homóloga.

A cepa *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CJP5102 foi depositada em 16 de novembro de 2005 no Korean Culture Center of Microorganisms, que é uma Autoridade de Depósito Internacional (IDA) sob o Tratado de Budapest (Acesso No. KCCM-10709P).

Exemplo 3

Produção de L-Lisina Usando

***Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CJP5102**

A L-lisina foi produzida cultivando a cepa *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CJP5102 produzida no Exemplo 2.

Primeiro, um frasco de 250 ml de cantos arredondados tendo 25 ml do meio de semeadura descrito abaixo foi inoculado com a cepa pai de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881 e KFCC10881-CJP5102 e o resultante foi cultivado com agitação a 200 rpm a 30°C durante 20

360

	Biotina	100 µg
	Cloreto de tiamina	1000 µg
	Cálcio-ácido pantotênico	2000 µg
	Nicotinamida	3000 µg
5	CaCO ₃	30 g

Exemplo 4

Coleta de L-Lisina a Partir de Meio de Cultura de Cepa de *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CJP5102

10 Adicionando cloreto a 1 L de um caldo de fermentação de lisina obtido cultivando *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CJP5102 num meio contendo melaço e açúcar bruto, o pH do caldo de fermentação foi ajustado para pH 2,0 e os íons de Ca foram transformados em CaSO₄ e CaCl₂. Depois, os materiais de cultura fluíram para

15 uma resina de permuta catiônica (Diaion SK-L10) reproduzidos na forma de íons de amônio na direção para cima e aderindo a lisina à resina. Depois que as bactérias residuais dentro da resina de permuta catiônica foram removidas por lavagem com água desmineralizada, a lisina de alta concentração foi coletada por eluição da resina com hidróxido de amônio

20 2N. A solução coletada foi concentrada e cristalizada por arrefecimento a 20°C, ao mesmo tempo que se ajustava o pH a 5,0. Foi obtido um primeiro produto úmido por separação centrífuga de uma pasta de cristalização completada e foi obtido um segundo produto úmido por concentração em batelada e cristalizando a solução-mãe. Foram obtidas 46,5 g

25 de um produto de lisina seco com 98,5% de conteúdo de lisina combinando o primeiro e o segundo produtos úmidos e secando o produto combinado.

Embora a presente invenção tenha sido mostrada e descrita particularmente com referência a modalidades exemplificativas da mesma, ficará entendido por aqueles de capacidade ordinária na técnica que

30 podem ser nela feitas várias mudanças de forma e detalhes, sem sair do espírito e âmbito da presente invenção, conforme definida pelas reivindi-

cações seguintes.

ao
ms

REIVINDICAÇÕES

1. Microorganismo Transgênico, caracterizado por que pertence ao gênero *Corynebacterium*, tem um gene inerente inativado da desidrogenase NCgl2053, tem uma sequência nucleotídea de SEQ ID NO:1 e produz L-lisina, em que o micro-organismo é *Corynebacterium glutamicum* KFCC10881-CJP5102 (Depósito No. KCCM-10709p) e em que o gene da desidrogenase NCgl2053 inerente intacto é inativado por processo não natural.

2. Método de Produção de L-Lisina, que realiza o cultivo de micro-organismo, para produzir L-lisina num meio ou células, coletando a L-lisina a partir da cultura, **caracterizado** por que o micro-organismo é conforme definido na Reivindicação 1.

h30

Figura 1

