

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 018**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 13/10 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07768723 .4**

96 Fecha de presentación: **12.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2041265**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Método para producir L-arginina usando Corynebacterium glutamicum**

30 Prioridad:
13.07.2006 KR 20060065950

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.04.2012

73 Titular/es:
**CJ CheilJedang Corporation
292, Ssangnim-dong Jung-gu
Seoul, 100-400, KR**

72 Inventor/es:
**PARK, Young Hoon;
KIM, Hye Won;
LEE, Ji-Hye y
HWANG, Soo-Youn**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 379 018 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

Método para producir L-arginina usando *Corynebacterium glutamicum*.

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere a un microorganismo que produce L-arginina y a un método de producción de L-arginina usando el microorganismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a una cepa mutante del género *Corynebacterium*, CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-arginina, que tiene resistencia al ácido alfa-aminobutírico y cuyo crecimiento se estimula por triptófano, y a un método de producción de L-arginina usando la cepa mutante.

Técnica anterior

- 10 L-arginina, un aminoácido semi-esencial que se produce naturalmente en el organismo, se ha usado ampliamente en medicamentos, alimentos, piensos para animales, y otros productos. L-arginina es útil como un fármaco para mejorar la función hepática y la función cerebral y tratar la esterilidad masculina, y como un componente de suplementos de aminoácidos múltiples. Además, L-arginina se ha usado como aditivo alimenticio en pasteles de pescado y bebidas dietéticas, y recientemente ha ganado interés como un sustituto de la sal para pacientes con hipertensión.
- 15

- Los métodos convencionales para la producción de L-arginina mediante fermentación biológica se basan en la producción de L-arginina directamente a partir de fuentes de carbono y nitrógeno. Por ejemplo, la L-arginina puede producirse usando una cepa mutante derivada de un microorganismo productor de ácido glutámico que pertenece al género *Brevibacterium* o *Corynebacterium* (publicaciones de patente japonesa abiertas a consulta por el público n.^{os} Sho57-163487, Sho60-83593 y Sho62-265988), o usando un microorganismo productor de aminoácido cuyas propiedades de crecimiento mejoran mediante fusión celular (publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público n.^o Sho59-158185). Además, la L-arginina puede producirse usando una cepa transformada con un gen recombinante (publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público n.^o Sho63-79597 y patente estadounidense n.^o 4.775.623).
- 20

- 25 Descripción de la invención

Problema técnico

- Los presentes inventores llevaron a cabo una investigación intensiva y completa para obtener una cepa que produce L-arginina a rendimientos superiores a los de cepas convencionales usando una cepa productora de ácido glutámico, esperando que el fortalecimiento de la ruta biosintética de la glutamina mejore la productividad de arginina. Esta expectativa se basa en la característica de la ruta por la cual la biosíntesis de arginina requiere una molécula de ácido glutámico y una molécula de glutamina, y una cepa que tiene resistencia al ácido alfa-aminobutírico, un análogo del aminoácido isoleucina, aumenta la productividad de glutamina (publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n.^o 2002-0038204). Por tanto, los presentes inventores indujeron una cepa mutante resistente al ácido alfa-aminobutírico, canavanina e hidroxamato de arginina a partir de una cepa madre, KFCC-10680 de *Corynebacterium glutamicum*, que produce ácido glutámico y que es resistente a sulfaguanidina y O-diazolacetil-L-serina (publicación de patente coreana n.^o 91-7818). Se encontró que la cepa mutante produce L-arginina con rendimientos superiores a los de la cepa madre, que no es resistente al ácido alfa-aminobutírico, conduciendo por tanto a la presente invención.
- 30
- 35

Solución técnica

- 40 Por tanto un objeto de la presente invención es proporcionar una cepa mutante CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum*, que produce L-arginina y es resistente al ácido alfa-aminobutírico, canavanina e hidroxamato de arginina.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de L-arginina que comprende activar la cepa mutante en un medio de fermentación y entonces cultivar la cepa mutante con agitación.

- 45 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una cepa mutante CJR0500, que tiene un tiempo de fermentación de arginina más corto en presencia de triptófano.

Mejor modo de realizar la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa mutante CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum*, que

produce L-arginina y es resistente al ácido alfa-aminobutírico, canavanina e hidroxamato de arginina, cuyo crecimiento se estimular adicionalmente mediante adición de L-triptófano.

5 La cepa mutante se indujo de la siguiente manera. La cepa madre, KFCC-10680 de *Corynebacterium glutamicum*, que es resistente a sulfaguanidina y O-diazolacetil-L-serina, se trató con N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), como un método general para mutagénesis, y se extendió sobre un medio mínimo (véase, nota 1) suplementado con ácido alfa-aminobutírico, canavanina e hidroxamato de arginina. Entonces se seleccionó una cepa mutante que tenía resistencia a los tres compuestos a 500 mg/L, 500 mg/L y 10 g/L, respectivamente.

10 La inducción de la cepa mutante se describirá con mayor detalle de la siguiente manera. Se activó la cepa madre mediante cultivo en un medio de activación (nota 2) durante 16 horas. Se cultivó durante 14 horas la cepa activada en un medio de siembra (nota 3), que se esterilizó a 121°C durante 5 minutos. Se lavaron 5 ml del cultivo de siembra con tampón cítrico 100 mM, se trató con 200 mg/L de NTG durante 20 minutos, y se lavaron con tampón fosfato 100 mM. Entonces se extendió la cepa tratada con NTG sobre el medio mínimo (nota 1), y se evaluó la viabilidad de la misma. Se observó que la cepa tenía una tasa de mortalidad del 85%. Para obtener una cepa mutante resistente a todos de ácido alfa-aminobutírico, canavanina e hidroxamato de arginina, se extendió la cepa tratada con NTG sobre un medio mínimo suplementado con canavanina, hidroxamato de arginina y ácido alfa-aminobutírico a 15 500 mg/L, 500 mg/L y 10 g/L, respectivamente, y se cultivó a 30°C durante 5 días. Se cultivaron las colonias que emergieron en un matraz Erlenmeyer que contenía un medio productor de arginina (nota 4) durante 72 horas. Se seleccionó una cepa mutante, que producía arginina y era resistente a canavanina, hidroxamato de arginina y ácido alfa-aminobutírico, y se denominó CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum*.

20 El presente solicitante depositó la cepa mutante, CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum*, en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (KCCM) el 15 de Marzo del 2006 para que esté disponible para los expertos en la técnica, y al depósito se le asignó el número de registro KCCM-10741P.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de producción de L-arginina que comprende activar la cepa mutante mediante cultivo en un medio de fermentación a 30°C durante 16 horas y después cultivar la cepa activada con agitación durante 72 horas. Con este método, se aumentó adicionalmente la productividad de L-arginina (ejemplo 1).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una cepa mutante CJR0500 que tiene un tiempo de fermentación de arginina más corto en presencia de L-triptófano.

30 La adición de L-triptófano al medio de fermentación disminuye adicionalmente el tiempo de fermentación de arginina, produciendo por lo tanto niveles mucho más elevados de L-arginina durante el mismo tiempo de fermentación que aquellos cuando no se añade L-triptófano al medio (ejemplo 3).

El microorganismo de la presente invención tiene las siguientes propiedades.

Nota 1. Medio mínimo: glucosa al 1,0%, sulfato de amonio al 0,4%, sulfato de magnesio al 0,04%, fosfato de potasio monobásico al 0,1%, urea al 0,1%, tiamina al 0,0001%, biotina 200 µg/L, agar al 2%, pH 7,0.

35 Nota 2. Medio de activación: extracto de carne al 1%, polipeptona al 1%, cloruro de sodio al 0,5%, extracto de levadura al 0,5%, agar al 2%, pH 7,2.

Nota 3. Medio de siembra: glucosa al 5%, bactopectona al 1%, cloruro de sodio al 0,25%, extracto de levadura al 1%, biotina 3 µg/L, urea al 0,4%, pH 7,0.

40 Nota 4. Medio de producción de L-arginina: glucosa al 4,0%, sulfato de amonio al 3%, urea al 0,3%, fosfato de potasio monobásico al 0,1%, fosfato de potasio dibásico al 0,1%, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,025%, CSL al 2,0% (licor de maceración de maíz), biotina 200 µg/L, pH 7,2.

45 La cepa mutante, CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum*, que tiene una productividad de arginina mejorada y es resistente a canavanina, hidroxamato de arginina y ácido alfa-aminobutírico mediante mutagénesis usando NTG, tiene las siguientes propiedades de resistencia a canavanina, hidroxamato de arginina y ácido alfa-aminobutírico (tabla 1).

Tabla 1

Comparación de resistencia a canavanina, hidroxamato de arginina y ácido alfa-aminobutírico													
Cepa	Canavanina (mg/L)				Hidroxamato de arginina (mg/L)				Ácido alfa-aminobutírico (g/L)				
	0	300	500	800	0	300	500	800	0	1	5	10	20
KFCC-10 659	+++	-	-	-	+++	-	-	-	+++	++	+	-	-
CJR0500	+++	+++	++	-	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	++	-

5 Las tasas de crecimiento de la cepa mutante según las concentraciones de L-triptófano en el medio mínimo se proporcionan en la tabla 2, a continuación. Tal como se muestra en la tabla 2, se encontró que la cepa mutante CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum* requiere L-triptófano.

Tabla 2

Tasas de crecimiento según concentraciones variables de triptófano					
Cepa	Triptófano (mg/L)				
	0	25	50	75	100
KFCC-10 659	+++	+++	+++	+++	+++
CJR0500	+	++	+++	+++	+++

Modo de la invención

10 Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención mediante los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como limitativos de la presente invención.

EJEMPLO 1

Cepa usada: KFCC-10680 y CJR0500

15 Medio de fermentación (la misma composición que el medio de la nota 4): glucosa al 4,0%, sulfato de amonio al 3%, urea al 0,3%, fosfato de potasio monobásico al 0,1%, fosfato de potasio dibásico al 0,1%, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,025%, CSL al 2,0% (licor de maceración de maíz), biotina 200 µg/L, pH 7,2.

20 Fermentación y resultados: se tomaron alícuotas de 24 ml del medio de fermentación en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con agitación y se esterizaron a 121°C durante 15 minutos. Se cultivó cada cepa en el medio de siembra (nota 3) a 30°C durante 16 horas. Entonces se inoculó la cepa activada (1 mL) en el medio de fermentación esterilizado y se cultivó a 30°C durante 72 horas con agitación. Se evaluó el fluido de fermentación para determinar la productividad de arginina, y se facilitan los resultados en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3

	KFCC-10680	CJR0500
Productividad de arginina	0,9 g/L	2,8 g/L

EJEMPLO 2

Cepas usadas: KFCC-10680 y CJR0500

Medio de fermentación: glucosa al 10,0%, sulfato de amonio al 4%, urea al 0,3%, fosfato de potasio monobásico al 0,1%, fosfato de potasio dibásico al 0,1%, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,025%, CSL al 2,0% (licor de maceración de maíz), biotina 200 µg/L, pH 7,2.

Fermentación y resultados: se tomaron alícuotas de 24 ml del medio de fermentación en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con agitación y se esterizaron a 121°C durante 15 minutos. Se cultivó cada cepa en el medio de siembra (nota 3) a 30°C durante 16 horas. Entonces se inoculó la cepa activada (1 mL) en el medio de fermentación esterilizado y se cultivó a 30°C durante 72 horas con agitación. Se evaluó el fluido de fermentación para determinar la productividad de arginina, y se facilitan los resultados en la tabla 4, a continuación. Se encontró que la cepa mutante, que tiene resistencia al ácido alfa-aminobutírico, producía L-arginina con un rendimiento más elevado que la cepa madre, que no es resistente al compuesto.

Tabla 4

	KFCC-10680	CJR0500
Productividad de arginina	1,0 g/L	3,5 g/L

EJEMPLO 3

Cepas usadas: KFCC-10680 y CJR0500

Medio de fermentación: glucosa al 10,0%, sulfato de amonio al 4%, urea al 0,3%, fosfato de potasio monobásico al 0,1%, fosfato de potasio dibásico al 0,1%, sulfato de magnesio heptahidratado al 0,025%, CSL al 2,0% (licor de maceración de maíz), biotina 200 µg/L, triptófano 50 mg/L pH 7,2.

Fermentación y resultados: se tomaron alícuotas de 24 ml del medio de fermentación en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con agitación y se esterizaron a 121°C durante 15 minutos. Se cultivó cada cepa en el medio de siembra (nota 3) a 30°C durante 16 horas. Entonces se inoculó la cepa activada (1 mL) en el medio de fermentación esterilizado y se cultivó a 30°C durante 64 horas con agitación. Se evaluó el fluido de fermentación para determinar la productividad de arginina, y se facilitan los resultados en la tabla 5, a continuación. Se encontró que la adición de triptófano estimulaba el crecimiento de la cepa mutante CJR0500 y por lo tanto producía L-arginina con un rendimiento más elevado en un tiempo más corto.

Tabla 5

	KFCC-10680	CJR0500
Productividad de arginina	0,8 g/L	3,45 g/L

Tal como se describió anteriormente en el presente documento, la cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum*, CJR0500, que tiene resistencia al ácido alfa-aminobutírico, tiene una productividad de L-arginina aumentada. Además, ya que la adición de triptófano reduce el tiempo de fermentación de arginina y por lo tanto permite la producción de L-arginina en rendimientos más elevados durante el mismo tiempo de fermentación, la cepa mutante es muy útil.

Aplicabilidad industrial

Tal como se describió anteriormente en el presente documento, la cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum*, CJR0500, que tiene resistencia al ácido alfa-aminobutírico, tiene una productividad de L-arginina aumentada. Además, ya que la adición de triptófano reduce el tiempo de fermentación de arginina y por lo tanto permite la producción de L-arginina en rendimientos más elevados durante el mismo tiempo de fermentación, la cepa mutante es muy útil.

REIVINDICACIONES

1. Cepa mutante CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum* (número de registro KCCM-1 0741 P), que produce L-arginina y que es resistente al ácido alfa-aminobutírico, canavanina e hidroxamato de arginina, cuyo crecimiento se estimula adicionalmente mediante adición de L-triptófano.
 2. Método de producción de L-arginina, que comprende activar la cepa mutante CJR0500 de *Corynebacterium glutamicum* (número de registro KCCM-1 0741 P) según la reivindicación 1 en un medio de fermentación a 30°C durante 16 horas y después cultivar la cepa mutante durante 72 horas con agitación.
- 5