

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 578**

21 Número de solicitud: 201230028

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.01.2012

30 Prioridad:

16.08.2011 KR 10-2011-0081146

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.04.2013

71 Solicitantes:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
292, Ssangnim-dong, Jung-gu
100-400 SEOUL KR**

72 Inventor/es:

**KIM, Hye Won;
LEE, Ji-hye;
HWANG, Soo Youn y
KIM, Jong Hyun**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

54 Título: **MICROORGANISMO QUE PRESENTA UNA MAYOR PRODUCTIVIDAD DE L-VALINA Y PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE L-VALINA UTILIZANDO EL MISMO**

57 Resumen:

Microorganismo que presenta una mayor productividad de L-valina y proceso para la producción de L-valina utilizando el mismo. La presente invención se refiere a un microorganismo que presenta una mayor producción de L-valina y un proceso para la producción de L-valina utilizando el mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a una cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* que presenta resistencia a L-valina y derivados de la misma para tener una mayor producción de L-valina, y un proceso para producir L-valina utilizando el mismo.

ES 2 399 578 A1

DESCRIPCIÓN

Microorganismo que presenta una mayor productividad de L-valina y proceso para la producción de L-valina utilizando el mismo

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo que presenta una mayor producción de L-valina y a un proceso para la producción de L-valina utilizando el mismo.

2. Descripción de la técnica anterior

Se utilizan L-aminoácidos en medicina humana, en particular en la industria farmacéutica, industria de alimentos y nutrición animal o similares. En particular, los aminoácidos de cadena ramificada se refieren a tres aminoácidos entre nueve aminoácidos esenciales: L-valina, L-leucina, y L-isoleucina. A diferencia de otros aminoácidos, que se metabolizan mayoritariamente en el hígado, los aminoácidos de cadena ramificada se metabolizan principalmente en el tejido muscular y sirven como fuente de energía durante el ejercicio. Como se sabe que los aminoácidos de cadena ramificada juegan un papel importante en el mantenimiento y crecimiento muscular durante el ejercicio, su utilización está en expansión. Específicamente, se ha utilizado la L-valina como componente de alimentos, ya que se ha descrito que la L-valina presenta un alto poder reductor y sirve para mejorar el rendimiento de la lactancia en las cerdas. La L-valina también se ha utilizado en soluciones de infusión y complejos de aminoácidos con fines médicos, y en complementos para la salud y aditivos en bebidas.

Un microorganismo utilizado para la producción de L-aminoácidos está representado por las bacterias corineformes, en particular *Corynebacterium glutamicum*. Debido a la alta importancia de las bacterias corineformes en la producción industrial, los procesos para la producción de L-aminoácidos que utilizan los microorganismos están continuamente experimentando mejoras. Por ejemplo, las mejoras se realizan para mejorar el proceso en relación a la agitación y la introducción de oxígeno, o composiciones del medio de cultivo, tales como concentración de azúcar durante la fermentación. Para mejorar la producción de L-aminoácidos de estos organismos, se utilizan ampliamente procesos de selección y procesos de selección de mutantes. Por ejemplo, existe un proceso de selección y utilización de microorganismos que son resistentes a antimetabolitos, tales como un derivado de isoleucina,

hidroxamato de isoleucina (Kisumi M et al., (1972) *Journal of Bacteriology* 110: 761-763), un derivado de L-valina, 2-tiazol alanina (Tsuchida T et al., (1975) *Agricultural and Biological Chemistry, Japan* 39: 1319-1322) o un derivado de leucina, α -aminobutirato (Ambe-Ono Y et al., (1996) *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 60: 1386-1387), o auxotróficos para metabolitos que tienen una relevancia reguladora y producen L-aminoácidos (Eva Radmacher et al., (2002) *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68 p.2246-2250).

Mientras tanto, uno de los aminoácidos de cadena ramificada, L-valina, se biosintetiza en un microorganismo partiendo de ácido pirúvico a través de ácido acetoláctico, ácido dihidroxi isovalérico y ácido cetoisovalérico. Estos metabolitos intermedios se producen mediante actividades catalíticas de la acetohidroxiácido sintasa, acetohidroxiácido isomeroeductasa, dihidroxiácido deshidratasa, y transaminasa B. Sin embargo, estas enzimas también están implicadas en la biosíntesis de L-isoleucina partiendo de ácido cetobutírico y ácido pirúvico, y la L-leucina también se biosintetiza a partir del metabolito intermedio, ácido cetoisovalérico a través del ácido 2-isopropilmálico, ácido 3-isopropilmálico, y cetoisocaproico. Por lo tanto, dado que las enzimas utilizadas en los mecanismos biosintéticos de los aminoácidos de cadena ramificada, concretamente, L-valina, L-isoleucina, y L-leucine, son idénticas, es difícil producir sólo uno de los aminoácidos de cadena ramificada mediante fermentación industrial. Adicionalmente, tiene lugar la inhibición por retroalimentación por el producto final L-valina o derivados de la misma, lo cual dificulta la producción industrial en masa de L-valina.

Para resolver estos problemas, se han realizado muchos estudios para desarrollar microorganismos productores de L-valina con resistencia a L-valina o derivados de la misma para la producción de L-valina y se ejemplifican por un proceso que utiliza un microorganismo con resistencia a ácido D,L-aminobutírico (Patente Japonesa abierta a inspección No. S63-160592), un proceso de utilización de un microorganismo que es resistente a tiazol alanina y auxotrófico para leucina, isoleucina, o treonina (Patente Japonesa abierta a inspección No. S52-116), un proceso de utilización de un microorganismo con resistencia a aminoetilcisteína (Patente Japonesa abierta a inspección No. S58-2678), un proceso de utilización de un microorganismo con resistencia a L-valina en un medio complementado con ácido acético y con sensibilidad a ácido pirúvico en un medio complementado de glucosa (Patente de Estados Unidos No. 5,521,074, Patente Coreana No. 1995-0005133), un proceso de utilización de un microorganismo con resistencia a policétido (Patente Coreana No. 1996-0016871) o similares.

Sin embargo, los microorganismos productores de L-valina desarrollados actualmente son resistentes a únicamente un material individual o un material limitado de L-valina o derivados de la misma y, de este modo, aún existe la necesidad de desarrollar microorganismos productores de L-valina con una resistencia a varios materiales implicados en el control por retroalimentación de la biosíntesis de L-valina.

5 Por estas razones, los presentes inventores han empleado muchos esfuerzos por desarrollar microorganismos capaces de producir L-valina en un rendimiento superior que el resto de cepas convencionales. Como resultado, hallaron que una cepa mutante, obtenida de un microorganismo productor de ácido glutámico, produce L-valina con un rendimiento elevado y con resistencia a numerosos derivados de L-isoleucina y derivados de L-valina, específicamente, ácido α -aminobutírico (ABA), α -hidroxivalina (AHV), tiazol alanina (TA), y norvalina
10 (NV), completando así la presente invención.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una cepa mutante KCCM11201P de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-valina.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso para producir L-valina utilizando la cepa
15 mutante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un mecanismo biosintético de L-valina como producto final de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIÓN PREFERIDAS

En una realización, la presente invención proporciona una cepa mutante KCCM11201P de
20 *Corynebacterium glutamicum* productora de L-valina.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "L-valina" significa un L-aminoácido con una fórmula química $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, que es uno de los aminoácidos esenciales y pertenece estructuralmente a los aminoácidos de cadena ramificada, junto con L-leucina y L-isoleucina.

Mientras tanto, la biosíntesis de L-valina en un microorganismo es tal como se muestra en la figura 1, en la
25 que la L-valina se biosintetiza partiendo de ácido pirúvico a través de ácido acetoláctico, ácido dihidroxi isovalérico y ácido cetoisovalérico. Además, el mecanismo biosintético es catalizado por enzimas, tales como acetohidroxi ácido

sintasa, acetohidroxi ácido isomeroreductasa, dihidroxi ácido deshidratasa y transaminasa B. Sin embargo, estas enzimas se utilizan de manera idéntica en los mecanismos biosintéticos de los aminoácidos de cadena ramificada, en particular, L-valina, L-isoleucina y L-leucina, y, de este modo, es difícil producir sólo uno de los aminoácidos de cadena ramificada mediante fermentación industrial. En particular, tiene lugar la inhibición por retroalimentación mediante el producto final L-valina o derivados de la misma, lo cual dificulta la realización de la producción industrial en masa de L-valina. Para la resolución de este problema, la cepa mutante de la presente invención es un microorganismo nuevo que presenta resistencia a L-valina o derivados de la misma para eliminar la inhibición por retroalimentación, mostrando así una mayor producción de L-valina.

Preferiblemente, la cepa mutante de la presente invención puede presentar resistencia a valina o derivados de la misma, isoleucina o derivados de la misma.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "derivado" significa los compuestos conocidos que inducen la inhibición por retroalimentación con respecto a la biosíntesis del producto final L-valina para reducir la producción de L-valina en el microorganismo, y un ejemplo de derivados de L-isoleucina puede ser ácido α -aminobutírico y derivados de L-valina, alfa-hidroxisovalina, tiazol alanina, y norvalina o similares, pero no se limitan a éstos. Preferiblemente, la cepa mutante puede presentar resistencia a una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en valina, ácido α -aminobutírico, alfa-hidroxisovalina, tiazol alanina, y norvalina. Lo más preferible, puede presentar resistencia a todos de valina, ácido α -aminobutírico, alfa-hidroxisovalina, tiazol alanina, y norvalina.

En general, se sabe que la biosíntesis de L-valina está inhibida cuando la L-valina se acumula en un cierto nivel en la célula. Por lo tanto, la cepa que presenta resistencia a los derivados libera la inhibición de L-valina y, de este modo, puede producir incluso a una concentración elevada. Según una realización de la presente invención, los presentes inventores utilizaron un proceso de selección de microorganismos capaz de producir una nivel elevado de L-valina mediante la utilización de los derivados. Además, dado que la L-isoleucina es un aminoácido que se produce mediante un mecanismo biosintético idéntico al mecanismo biosintético de la L-valina, las cepas capaces de producir un nivel elevado de L-valina también se pueden seleccionar analizando si las cepas adquieren resistencia a los derivados de isoleucina. De este modo, los derivados de isoleucina también se utilizan para seleccionar las cepas capaces de producir un nivel elevado de L-valina.

Según la presente invención, una cepa mutante que presenta una mayor producción de L-valina se selecciona de las cepas parentales mediante mutación. En este aspecto, las mutaciones en el microorganismo se pueden inducir mediante una serie de técnicas ampliamente conocidas en el sector y se puede utilizar cualquiera de los factores mutagénicos físicos y químicos. Entre los ejemplos del factor mutagénico químico adecuado para la presente invención se incluyen N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), diepoxibutano, metanosulfonato de etilo, compuestos de mostaza, hidrazina, y ácido nitroso, pero no se limitan a éstos. Además, entre los ejemplos de factor mutagénico físico se puede incluir radiación ultravioleta y radiación gamma, pero no se limitan a éstos.

Tras la inducción de las mutaciones, la cepa parental es afectada por un factor mutagénico en una intensidad suficiente para dejar un tamaño particular de poblaciones supervivientes. El tamaño varía dependiendo del tipo de factores mutagénicos, y depende de la cantidad de mutaciones inducidas en las poblaciones supervivientes a una tasa de mortalidad determinada. Por ejemplo, la tasa de mortalidad deseada para NTG debería dejar aproximadamente un 10%-50% de la población de partida. La mutagénesis con ácido nitroso debería dejar aproximadamente el 0,01% a 0,1% de la población de partida y la mutagénesis por ultravioleta debería dejar aproximadamente el 1,0%. Según una realización de la presente invención, se utiliza NTG para inducir mutaciones en la cepa parental a efectos de preparar una cepa mutante que presenta una mayor producción de L-valina.

En un ejemplo de la presente invención, se utilizó como cepa parental KFCC 10661 de *Corynebacterium glutamicum* (Publicación de patente de Corea No. 1990-0007948) que produce ácido L-glutámico a efectos de preparar la cepa mutante que presenta una mayor producción de L-valina, lo cual se atribuye a la propiedad de requerir 1 molécula de ácido glutámico durante la biosíntesis de L-valina. Por lo tanto, la mutagénesis aleatoria se realizó en KFCC 10661 de *Corynebacterium glutamicum* productora de ácido glutámico, como cepa parental, y el microorganismo se extendió en un medio mínimo complementado con el derivado de isoleucina, ácido α -aminobutírico (ABA) y los derivados de valina, alfa-hidroxisvalina (AHV), tiazol alanina (TA) y norvalina (NV). Posteriormente, se seleccionó una cepa mutante que tenía una resistencia común a dichos derivados a una concentración de 20 mM, 20 mM, 40 mM y 50 mM, respectivamente, y se designó como CA08-0072 de *Corynebacterium glutamicum*. Además, se confirmó que la producción de L-valina de la cepa mutante que tenía una resistencia común aumentó a 4 veces o superior que la de la cepa parental (véase la tabla 1). La cepa mutante

CA08-0072 de *Corynebacterium glutamicum* se depositó en la autoridad internacional de depósitos Korean Culture Center of Microorganisms, que se encuentra en 361-221, Hongje-1-dong, Seodaemon-gu, Seúl, Corea, el 13 de julio del 2011, y se le asignó el número de acceso KCCM11201P.

En otra realización, la presente invención proporciona un proceso para producir L-valina, incluyendo la
5 etapa de cultivar la cepa mutante en un medio de cultivo.

Preferiblemente, el proceso para producir L-valina puede incluir además la etapa de recuperar L-valina del medio de cultivo de la cepa mutante.

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “cultivar” significa crecer un microorganismo bajo condiciones controladas artificialmente. En la presente invención, el proceso para cultivar la cepa mutante CA08-0072
10 de *Corynebacterium glutamicum* (KCCM11201P) para la producción de L-valina se puede realizar utilizando un proceso de cultivo de *Corynebacterium glutamicum* ampliamente conocido en el sector. Específicamente, entre los ejemplos del proceso de cultivo se incluyen cultivo en lotes, cultivo continuo, y cultivo por alimentación en lotes, pero no se limitan a éstos. Estos diversos procesos se describen en, por ejemplo, “Biochemical Engineering” (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pág.138-176, 1991) o similares.

El medio utilizado para el cultivo debe cumplir los requisitos para el cultivo de una cepa específica. Los
15 medios de cultivo para la cepa de *Corynebacterium* están descritos (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). Las posibles fuentes de carbono pueden incluir azúcares y carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, aceites y grasas, tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos
20 grasos, tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linólico, alcoholes, tales como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como ácido acético. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como mezclas. Entre las posibles fuentes de nitrógeno se pueden incluir peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maceración del maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar
25 individualmente o como mezclas. Las posibles fuentes de fósforo pueden incluir dihidrógeno fosfato de potasio o hidrógeno fosfato de dipotasio o las correspondientes sales con sodio. Además, el medio de cultivo debe incluir sales

metálicas, tales como sulfato de magnesio y sulfato férrico que son necesarios para el crecimiento. Además de las sustancias anteriores, se pueden incluir sustancias esenciales de crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas. También se pueden añadir al medio de cultivo precursores apropiados. Las sustancias mencionadas anteriormente se pueden añadir de manera adecuada al medio de cultivo en cultivos por lotes o en cultivo continuo durante el

5 cultivo.

El pH del cultivo se puede ajustar mediante la adición de manera adecuada de compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, y amoníaco o compuestos ácidos, tales como ácidos fosfórico y ácido sulfúrico. La generación de burbujas de aire se puede inhibir utilizando un agente antiespumante, tal como el éster de ácido graso de poliglicol. Para mantener las condiciones aeróbicas, se pueden inyectar en el cultivo oxígeno o un

10 gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire). En general, la temperatura del medio de cultivo es de 20 a 45°C. El cultivo debe continuar hasta que la producción de L-valina alcance un nivel deseado. Este objetivo se consigue normalmente en 10 a 160 horas. La L-valina se puede liberar en el medio de cultivo o puede estar incluida en las células.

El proceso para producir L-valina de la presente invención incluye la etapa de recuperar L-valina de las

15 células o el medio de cultivo. El proceso para recuperar L-valina de las células o el medio de cultivo se puede realizar mediante un proceso convencional conocido en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, y HPLC, pero no se limita a éstos. Según una realización de la presente invención, mediante cromatografía de intercambio iónico, se separa un sobrenadante obtenido mediante centrifugación del medio de cultivo a velocidad baja y extrayendo la biomasa.

A continuación, se describirá la presente invención en detalle en referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos se muestran únicamente con fines ilustrativos y la invención no pretende limitarse a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Selección de la cepa mutante mediante mutagénesis artificial

Para obtener cepas mutantes que presentan una mayor producción de L-valina, se indujo la mutación de

25 un microorganismo utilizando el siguiente proceso.

ES 2 399 578 A1

Específicamente, se cultivó durante 14 horas en un medio de cultivo para siembra que se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, una cepa parental, KFCC 10661 de *Corynebacterium glutamicum* productora de ácido glutámico (Publicación de Patente Coreana No. 1990-0007948), que se había activado previamente mediante el cultivo en un medio de activación durante 16 horas. A continuación, se recogieron 5 ml del medio de cultivo y se lavaron con tampón citrato 100 mM. Se añadieron a los mismos NTG (N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) a una concentración final de 200 mg/L. Después de 20 minutos, el medio se lavó con tampón fosfato 100 mM. Las cepas tratadas con NTG se extendieron en un medio mínimo y se midió la tasa de mortalidad. Como resultado, la tasa de mortalidad fue del 85%.

A efectos de obtener cepas mutantes que presentan una resistencia común a ácido α -aminobutírico (ABA), alfa-hidroxisvalina (AHV), tiazol alanina (TA) y norvalina (NV), las cepas tratadas con NTG se extendieron en un medio mínimo que contenía ABA, AHV, TA y NV a una concentración final de 20 mM, 20 mM, 40 mM y 50 mM, respectivamente. A continuación, las cepas se cultivaron a 30°C durante 5 días para obtener una cepa mutante que presenta una resistencia común a ABA, AHV, TA y NV.

La cepa mutante obtenida se designó como CA08-0072 de *Corynebacterium glutamicum*, y se depositó en el Centro de Cultivos Coreano de Microorganismos el 13 de julio del 2011 y se le asignó el número de acceso KCCM11201P.

Los medios utilizados en los ejemplos 1 y 2 presentan las siguientes composiciones.

<Medio de activación>

Extracto de ternera 1%, Polipeptona 1%, Cloruro de sodio 0,5%, Extracto de levadura 1%, Agar 2%, pH

20 7,2

<Medio de cultivo para siembra>

Glucosa 5%, Bacto Peptona 1%, Cloruro de sodio 0,25%, Extracto de Levadura 1%, Urea 0,4%, pH 7,2

<Medio mínimo>

Glucosa 1,0%, Sulfato de amonio 0,4%, Sulfato de magnesio 0,04%, dihidrogenofosfato de potasio 0,1%,

25 Urea 0,1%, Tiamina 0,001%, Biotina 200 μ g/L, Agar 2%, pH 7,0

Ejemplo 2: Examen de la productividad de L-valina de la cepa mutante productora de L-valina

La CA08-0072 de *Corynebacterium glutamicum* (KCCM11201P) que presenta una resistencia común a concentraciones elevadas de ABA, AHV, TA, y NV, que se obtuvo en el ejemplo 1, se cultivó mediante el siguiente proceso a efectos de examinar su productividad de L-valina.

5 La cepa parental KFCC 10661 de *Corynebacterium glutamicum* y la cepa mutante se inocularon en matraces con deflectores en las esquinas de 250 ml que contenían 25 ml del medio de cultivo y se cultivaron a 30°C durante 20 horas con agitación a 200 rpm para obtener un medio de cultivo para siembra. A continuación, se inoculó 1 ml de cada uno de los medios de cultivo para siembra en un matraz con deflectores en las esquinas de 250 ml que contenían 24 ml del siguiente medio de producción, y se cultivó a 30°C durante 72 horas con agitación a 200
10 rpm para producir L-valina.

El medio de producción utilizado en el presente ejemplo 2 presenta la siguiente composición.

<Medio de producción>

Glucosa 5%, Sulfato de amonio 2%, Dihidrógeno fosfato de potasio 0,1%, Sulfato de magnesio heptahidratado 0,05%, CSL (licor de maceración del maíz) 2,0%, Biotina 200 µg/L, pH 7,2

15 Después de completar el cultivo, se realizó una cromatografía líquida de alta velocidad para determinar las cantidades de L-valina producida. Las concentraciones de L-valina en el medio de cultivo de las cepas experimentales se resumen en la Tabla 1 siguiente.

Tal como se muestra en la Tabla 1, la cepa parental, KFCC 10661 de *Corynebacterium glutamicum* produjo 0,5 g/L de L-valina, pero la cepa mutante CA08-0072 de *Corynebacterium glutamicum* según la presente
20 invención produjo 2,1 g/L de L-valina, indicando que su productividad de L-valina es aproximadamente 4 veces o más que la de la cepa parental.

[Tabla 1] Comparación de la productividad de L-valina de CA08-0072 de *Corynebacterium glutamicum* (KCCM11201P)

	<i>Corynebacterium glutamicum</i> KFCC 10661 (Cepa parental)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> CA08-0072 (Cepa mutante)
Concentración de L-valina (g/L)	0,5	2,1

Tal como se muestra en la Tabla 1, la cepa parental, KFCC 10661 de *Corynebacterium glutamicum* produjo 0,5 g/L de L-valina, pero la cepa mutante CA08-0072 de *Corynebacterium glutamicum* según la presente invención produjo 2,1 g/L de L-valina, indicando que su productividad de L-valina es aproximadamente 4 veces o más que la de la cepa parental.

5 El resultado anterior sugirió que la cepa mutante que presenta una resistencia a L-valina, L-isoleucina y derivados de las mismas no se ve afectada por la inhibición por retroalimentación, produciendo de este modo L-valina con una eficacia y un rendimiento elevados.

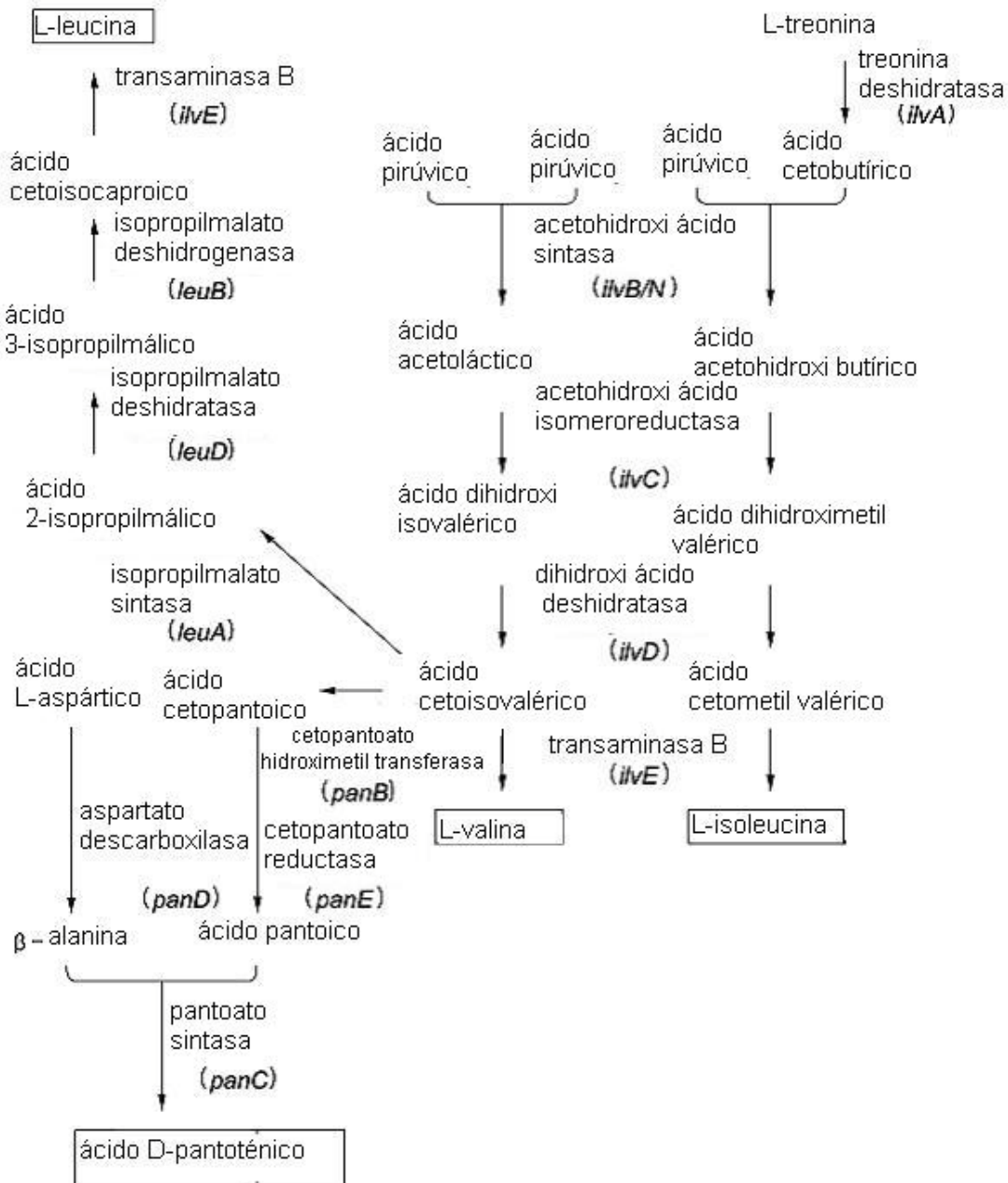
Efecto de la invención

10 El microorganismo corineforme de la presente invención presenta resistencia a L-valina, L-isoleucina y derivados de las mismas, y de este modo, no se ve afectado por la inhibición por retroalimentación de L-valina para presentar una mayor producción de L-valina. Por lo tanto, el proceso para producir L-valina utilizando el microorganismo de la presente invención se utiliza para producir L-valina con una eficacia y un rendimiento elevados.

REIVINDICACIONES

1. Cepa mutante KCCM11201P de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-valina.
2. Cepa mutante KCCM11201P según la reivindicación 1, en la que la cepa mutante presenta resistencia a L-valina, L-iso-leucina, α -aminobutírico (ABA), α -hidroxivalina (AHV), tiazol alanina (TA) y norvalina (NV).
- 5 3. Proceso para producir L-valina, que comprende cultivar KCCM11201P según la reivindicación 1 en un medio de cultivo.
4. Proceso, según la reivindicación 3, que comprende además recuperar la L-valina del medio de cultivo de KCCM11201P.
5. Proceso, según la reivindicación 3, en el que el cultivo se realiza a una temperatura de 20 a 45°C bajo
- 10 condiciones aeróbicas durante 10 a 160 horas.

Figura 1





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201230028

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.01.2012

③② Fecha de prioridad: **16-08-2011**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 3893888 A (TSUCHIDA TAKAYASU ET AL.) 08/07/1975, columna 1, líneas 34 - 41; columna 1, líneas 61-68; ejemplo 1.	1-5
A	KR 20060039992 A (DAESANG CORP) 10/05/2006. Resumen de la base de datos WPI [recuperado el 29.10.2012] Recuperado de EPOQUE. DW200674, N° de acceso 2006-714552 [74]	1-5
A	JP 48044877 B (AJINOMOTO KK) 27/12/1973. Resumen de la base de datos WPI [recuperado el 29.10.2012] Recuperado de EPOQUE. DW197401, N° de acceso 1974-01941V [01]	1-5
A	US 5188948 A (KATSURADA NAOKI ET AL.) 23/02/1993, todo el documento.	1-5
A	US 3117915 A (ISAMU SHIIO ET AL.) 14/01/1964, columna 1, líneas 9 - 26; tabla 1; tabla 2.	1, 2
A	GB 839597 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 29/06/1960, todo el documento.	1, 2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
29.10.2012

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)

C12N15/01 (2006.01)

C12P13/08 (2006.01)

C12R1/15 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPOAC, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-5	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-5	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 3893888 A	08.07.1975
D02	KR 20060039992 A	10.05.2006
D03	JP 48044877 B	27.12.1973
D04	US 5188948 A	23.02.1993
D05	US 3117915 A	14.01.1964
D06	GB 839597 A	29.06.1960

En D01 se anticipa un procedimiento de obtención de una serie de cepas de *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) productoras de L-val, mediante la mutagénesis de bacterias productoras de ácido glutámico con nitrosoguanidina, y posterior selección de las cepas resistentes a la tiazol alanina.

D02 divulga una cepa de *C. glutamicum* auxótrofa para leu y productora de L-val, que presenta resistencia frente a la norvalina, así como un método de producción de L-val que comprende el cultivo de la cepa a 25-35°C en aerobiosis.

En D03 se describe una cepa de *Brevibacterium lactofermentum* (también denominada *C. glutamicum*) productora de L-val, obtenida mediante mutación y posterior selección de las bacterias resistentes a la tiazol alanina. El procedimiento de obtención de la L-val, comprende el cultivo de la cepa a 24-37°C en condiciones aerobias de 2 a 7 días.

D04 muestra un procedimiento de aislamiento de cepas productoras de L-val a partir de bacterias de *C. glutamicum* productoras de ácido glutámico, mediante mutagénesis con nitrosoguanidina y selección de las resistentes a poliquétidos. Además, se afirma que se podrían obtener cepas mejoradas, mediante una selección adicional de bacterias que fueran también resistentes a la norvalina, la tiazol alanina o el ácido aminobutírico. El método de producción del aminoácido es mediante el cultivo de la cepa en aerobiosis a 31°C.

En D05 y D06 se caracterizan las cepas parentales de *C. glutamicum* a partir de las cuales se han conseguido las cepas de productoras de L-valina de D01.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud, intenta resolver el problema de la producción de L-valina. Para ello, se obtiene la cepa de *Corynebacterium glutamicum* productora de L-valina (KCCM11201P), mediante la mutagénesis de la cepa parental productora de ácido glutámico KFCC 10661, y la selección de una cepa con resistencia al ácido α -aminobutírico, la α -hidroxivalina, la tiazol alanina y la norvalina. El ácido α -aminobutírico es un derivado de la isoleucina, y la α -hidroxivalina, la tiazol alanina y la norvalina son derivados de la valina. Así, son objeto de la invención la cepa de *C. glutamicum* de número de acceso KCCM11201P (reivindicaciones 1 y 2) y el proceso para producir L-valina que comprende el cultivo de la cepa de la invención (reivindicaciones de 3 a la 5).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP)

Las reivindicaciones de la 1 a la 5 cumplen el requisito de novedad (art. 6.1 LP).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP)**2.1. REIVINDICACIONES 1 Y 2**

Las reivindicaciones 1 y 2 tienen por objeto, una cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* de número de acceso KCCM11201P, productora de L-val y resisistente a la L-valina, L-isoleucina, ácido α -aminobutírico, α -hidroxivalina, tiazol alanina y norvalina. Esta cepa se ha obtenido a partir de la mutagénesis con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, de una cepa parenteral de *C. glutamicum* productora de ácido glutámico, y la posterior selección de una cepa resistente al ácido α -aminobutírico, α -hidroxivalina, tiazol alanina y norvalina.

En D01 se obtienen una serie de cepas bacterianas de *C. glutamicum* productoras de L-val, mediante la mutagénesis con nitrosoguanidina y posterior selección de las cepas resistentes a tiazol alanina. Entre las cepas aisladas, se encuentran dos cepas resistentes a la tiazol alanina, la FERMP-1768 de *C. glutamicum* y la FERMP1945 de *Brevibacterium lactofermentum* (sinónimo de *C. glutamicum*), procedentes de sendas cepas parentales productoras de ácido glutámico (ver columna 1, líneas 34-41 y 61-68).

Por lo tanto, la diferencia entre D01 y la presente solicitud, es que la cepa de la solicitud es resistente al ácido α -aminobutírico (derivado de ile), y la α -hidroxivalina, tiazol alanina y norvalina (derivados de val), mientras que en D01 solo se comprueba que las cepas sean resistentes a la tiazol alanina. Sin embargo, no se ha encontrado ningún efecto técnico sorprendente entre la cepa de la invención y las divulgadas en D01. Es más, mientras que con la cepa de la solicitud se obtienen 2,1 g/l de L-val tras su cultivo durante 72 horas a 30°C, en el caso de D01, tras el cultivo a 31,5°C durante 72 h se consiguieron 12 g/l (FERMP-1768) y 15 g/l (FERMP1945) (ver ejemplo 1). Por lo tanto, se considera que la cepa de *C. glutamicum* productora de L-valina KCCM11201P no presenta ninguna característica técnica sorprendente, sino que supone una alternativa a las cepas conocidas en el estado de la técnica.

En consecuencia, las reivindicaciones 1 y 2 no presentan actividad inventiva (art. 8.1 L.P.).

2. REIVINDICACIONES DE LA 3 A LA 5

Las reivindicaciones de la 3 a la 5, tienen por objeto un método de producción de L-valina que comprende el cultivo de la cepa de la invención en aerobiosis de 10 a 160 horas, a una temperatura de entre 20 y 45°C.

En D01, se obtiene L-valina mediante el cultivo de las cepas de *C. glutamicum* FERMP-1768 y FERMP1945, en aireación durante 72 horas a 31,5°C.

Por lo tanto, dado que la cepa de *C. glutamicum* de número de acceso KCCM11201P no es inventiva, tampoco lo es el método de producción de L-valina.

Así, se considera que las reivindicaciones de la 3 a la 5 no cumplen el requisito de actividad inventiva (art. 8.1 L.P.).