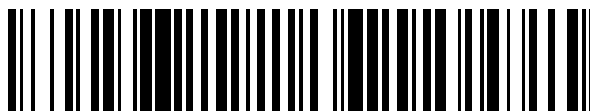


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 726**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.08.2015 PCT/KR2015/008184**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16021932**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2015 E 15829333 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3178926**

54 Título: **Variante de acetohidroxiácido sintasa resistente a retroalimentación y método para producir L-valina usando la misma**

30 Prioridad:

05.08.2014 KR 20140100669

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JEON, AE JI;
SONG, BYEONG CHEOL;
KIM, JONG HYUN;
KIM, HYE WON y
LEE, JI HYE**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 702 726 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

Variante de acetohidroxiácido sintasa resistente a retroalimentación y método para producir L-valina usando la misma

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a una variante de la acetohidroxiácido sintasa en que la inhibición por retroalimentación de L-valina está eliminada, un polinucleótido que codifica la variante de acetohidroxiácido sintasa, un vector de expresión que incluye el polinucleótido, un microorganismo que produce L-valina que incluye la variante de acetohidroxiácido sintasa y un método para producir L-valina usando el microorganismo.

[Antecedentes técnicos]

La L-valina es un aminoácido esencial y se usa de forma eficaz como material para componentes de pienso y alimentos.

Como los aminoácidos de cadena ramificada (por ejemplo, L-valina, L-isoleucina y L-leucina) se biosintetizan usando la misma enzima, se sabe que es difícil preparar un único tipo de aminoácido ramificado a una escala industrial grande mediante fermentación. Adicionalmente, la biosíntesis también tiene un problema de que se produce inhibición por retroalimentación en las enzimas principales por el producto final (es decir, L-valina) o un derivado del mismo y, por tanto, hay una limitación con respecto a la fermentación.

[Divulgación]

[Problema técnico]

En tales condiciones, los autores de la presente invención han hecho esfuerzos por desarrollar un método eficaz para producir L-valina. Como resultado, han verificado una variante de acetohidroxiácido sintasa novedosa en que la inhibición por retroalimentación por L-valina está eliminada, y confirmaron que un microorganismo que produce L-valina, que incluye la variante, tiene una capacidad excelente de producir L-valina en comparación con la cepa precursora que no contiene la variante, completando de ese modo la presente divulgación.

[Solución técnica]

Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar una variante de acetohidroxiácido sintasa en que la inhibición por retroalimentación de L-valina está eliminada.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un polinucleótido que codifica la variante de acetohidroxiácido sintasa y un vector de expresión que contiene el polinucleótido.

Un objetivo adicional de la presente divulgación es proporcionar un microorganismo que produce L-valina, que incluye la variante de acetohidroxiácido sintasa.

Un objetivo adicional más de la presente divulgación es proporcionar un método para producir L-valina usando el microorganismo que produce L-valina.

[Efectos ventajosos de la invención]

La variante de acetohidroxiácido sintasa de acuerdo con la presente divulgación está en un estado donde la inhibición por retroalimentación de L-valina está eliminada. Por lo tanto, un microorganismo para producir L-valina, que incluye la variante, puede producir L-valina en alto rendimiento en comparación con la cepa precursora.

[Mejor modo]

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una variante de acetohidroxiácido sintasa en que el 137^o aminoácido desde el extremo N de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, leucina (L), está sustituido con un aminoácido diferente de leucina y, por tanto, la inhibición por retroalimentación de L-valina está eliminada.

Como se usa en este documento, el término "L-valina" se refiere a un L-aminoácido que tiene una fórmula química de $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, que es uno de los aminoácidos esenciales y pertenece estructuralmente a los aminoácidos de cadena ramificada, junto con L-leucina y L-isoleucina.

Como se usa en este documento, la expresión "acetohidroxiácido sintasa" se refiere a la primera enzima en la biosíntesis de L-valina y también se llama acetolactato sintasa. La acetohidroxiácido sintasa cataliza la descarboxilación de piruvato y una reacción de condensación con otra molécula de piruvato para producir

acetolactato, que es un precursor de valina, o cataliza la descarboxilación de piruvato y una reacción de condensación con 2-cetobutirato para producir acetohidroxiбутirato, que es un precursor de isoleucina.

La acetohidroxiácido sintasa está codificada por dos genes, es decir, *ilvB* e *ilvN*. El gen *ilvB* codifica la subunidad grande de la acetohidroxiácido sintasa y el gen *ilvN* codifica la subunidad pequeña de la acetohidroxiácido sintasa, respectivamente. Entre ellos, la subunidad pequeña codificada por el gen *ilvN* se cree que está implicado de forma importante en la inhibición por retroalimentación.

La acetohidroxiácido sintasa codificada por el gen *ilvN* puede tener una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, pero no está particularmente limitada a ella.

Como se usa en este documento, la expresión "inhibición por retroalimentación" se refiere a la inhibición de una reacción en la fase temprana de un sistema enzimático por un producto final en un sistema enzimático. Para el propósito de la presente divulgación, la inhibición por retroalimentación se refiere a la inhibición de la actividad de la acetohidroxiácido sintasa, que media la primera etapa de la biosíntesis de L-valina, por L-valina, pero no se limita a ello. Por consiguiente, en un caso cuando se elimina la inhibición por retroalimentación de la acetohidroxiácido sintasa, puede mejorar la productividad de L-valina. En la presente divulgación, se confirmó que cuando el 137^o aminoácido desde el extremo N de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, leucina, se sustituye con un aminoácido diferente, específicamente fenilalanina, Phe, F), se elimina la inhibición por retroalimentación de L-valina.

La acetohidroxiácido sintasa, en que la inhibición por retroalimentación de L-valina está eliminada, puede tener específicamente una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Adicionalmente, la variante de acetohidroxiácido sintasa en que la inhibición por retroalimentación de L-valina está eliminada incluye, sin limitación, no solamente la variante que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, sino también las variantes que tienen una homología de un 80 % o mayor, específicamente un 90 % o mayor, más específicamente un 95 % o mayor, incluso más específicamente un 99 %, con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, en la que inhibición por retroalimentación de L-valina está realmente eliminada en comparación con la de la acetohidroxiácido sintasa de tipo silvestre. Es obvio que cualquier secuencia de aminoácidos que tenga una actividad biológica sustancialmente igual o correspondiente a la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 también debe pertenecer al alcance de la presente divulgación, aunque la secuencia de aminoácidos pueda tener eliminación, modificación, sustitución o adición en parte de la secuencia.

Como se usa en este documento, el término "homología" se refiere a un porcentaje de identidad entre dos polinucleótidos o restos polipeptídicos. La homología entre secuencias de un resto con otro resto puede determinarse por la tecnología conocida en la técnica. Por ejemplo, la homología puede determinarse organizando directamente la información de secuencia de dos moléculas polinucleotídicas o dos moléculas polipeptídicas usando un programa informático muy accesible. Los ejemplos del programa informático pueden incluir BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlign™ (DNASTAR Inc.), etc. Adicionalmente, la homología entre polinucleótidos puede determinarse hibridando polinucleótidos en condiciones de formación de una doble hélice estable entre las regiones homólogas, desensamblaje con una nucleasa específica de una sola hebra, seguido de determinación del tamaño de los fragmentos desensamblados.

Como se usa en este documento, el término "homólogo" se refiere a una correlación entre proteínas donde todas las formas gramaticales y variaciones ortográficas incluyen proteínas derivadas de la superfamilia y otras proteínas homólogas derivadas de la especie que tienen un "origen evolutivo común". Dichas proteínas (y genes codificantes de las mismas) tienen una homología de secuencia reflejada por un alto grado de similitud de secuencia. Sin embargo, en el uso general y en la presente divulgación, cuando el término "homología" está modificado por un adjetivo tal como "muy alta", se refiere a una similitud de secuencia, pero no a un origen evolutivo común.

De acuerdo con una realización específica de la presente divulgación, la variante de acetohidroxiácido sintasa en que la inhibición por retroalimentación está eliminada, puede ser una generada por una mutación de un microorganismo productor de L-valina. La mutación del microorganismo puede realizarse por diversos métodos bien conocidos en la técnica, y puede usarse una cualquiera de mutagénesis física o química. Por ejemplo, el factor mutagénico químico adecuado para la presente divulgación puede incluir N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), diepoxibutano, sulfonato de etilmetano, compuestos de mostaza, hidrazina y ácido nitroso, pero se limita a ellos. Además, los ejemplos del factor mutagénico químico pueden incluir N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), diepoxibutano, sulfonato de etilmetano, compuestos de mostaza, hidrazina y ácido nitroso, pero no se limitan a estos compuestos. Adicionalmente, los ejemplos del factor mutagénico físico pueden incluir radiación ultravioleta y gamma, pero no se limitan a ellos.

Adicionalmente, en una realización específica de la presente divulgación, se usó *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P (patente coreana n.º 10-1117022) como cepa precursora para obtener una cepa modificada de un organismo con capacidad mejorada de producción de L-valina. La cepa es una cepa modificada que tiene resistencia a ácido α -aminobutírico (ABA), α -hidroxivalina (AHV), tiazol alanina (TA) y norvalina (NV). En la presente

divulgación, la *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P se trató con NTG, y entre las cepas, se obtuvo la cepa que mostraba resistencia a ácido α -aminobutírico (ABA) y se llamó "NA100-311". La cepa "NA100-311" mostró un aumento de aproximadamente un 20,3 % en la cantidad de producción de L-valina en comparación con la producida por una cantidad igual de células de la cepa precursora. Adicionalmente, tras el análisis de la secuencia de nucleótidos, se confirmó que se producía una mutación en la secuencia de aminoácidos de la cepa modificada de la acetohidroxiácido sintasa y, específicamente, el 137.º aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, es decir, leucina, estaba sustituido con fenilalanina (ejemplo 2).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido que codifica la variante de acetohidroxiácido sintasa y un vector de expresión que incluye el polinucleótido.

La acetohidroxiácido sintasa y la variante son iguales a como se explica anteriormente.

Como se usa en este documento, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero de nucleótidos que se extienden por toda la longitud de la cadena mediante un enlace covalente de unidades nucleotídicas, y en general una hebra de ADN o ARN con una determinada longitud. En la presente divulgación, se refiere a un polinucleótido que codifica una variante de acetohidroxiácido sintasa.

Por ejemplo, el polinucleótido que codifica la variante de acetohidroxiácido sintasa puede tener una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5, que es una secuencia polinucleotídica que codifica la acetohidroxiácido sintasa de la SEQ ID NO: 3, donde le 409.º nucleótido, es decir, C, estaba sustituido con T, pero no se limita a ello.

Como se usa en este documento, el término "vector" se refiere a cualquier soporte para clonar y/o transferir nucleótidos a una célula hospedadora. Un vector puede ser un replicón para permitir la replicación de uno o más fragmentos combinados con otro u otros fragmentos de ADN. "Replicón" se refiere a cualquier unidad genética que actúa como unidad autorreplicante para la replicación del ADN *in vivo*, es decir, replicable por autorregulación (por ejemplo, plásmido, fago, cósmido, cromosoma y virus). En la presente divulgación, el vector no está particularmente limitado, sino que puede usarse cualquier vector conocido en la técnica siempre que pueda replicarse en el hospedador. El vector usado en la preparación del vector recombinante puede ser plásmidos, cósmidos, virus y bacteriófagos en un estado natural o en un estado recombinante. Por ejemplo, como vector fágico o vector cósmido, puede usarse *pWE15*, *M13*, *λ EMBL3*, *λ EMBL4*, *λ XFIXII*, *λ DASHIII*, *λ ZAPII*, *λ gt10*, *λ gt11*, *Charon4A*, *Charon21A*, etc., y como vector plasmídico, pueden usarse los basados en el vector *pDZ*, *pBR*, *pUC*, *pBluescriptII*, *pGEM*, *pTZ*, *pCL*, *pET*, etc. Los vectores que pueden usarse en la presente divulgación no están particularmente limitados, sino que puede usarse cualquier vector de expresión conocido. Específicamente, puede usarse *pDZ* (publicación de solicitud de patente coreana n.º 2008-0025355 que se incorpora en su totalidad como referencia en la presente divulgación), pero no se limita a ello.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un microorganismo que produce L-valina, que incluye la variante de acetohidroxiácido sintasa.

La L-valina, la acetohidroxiácido sintasa y la variante son iguales a como se explica anteriormente.

Como se usa en este documento, la expresión "un microorganismo que produce L-valina" se refiere a una cepa de microorganismo procariota o eucariota que puede producir L-valina dentro de un bioorganismo. Para el propósito de la presente divulgación, puede ser posible tanto una célula procariota como una célula eucariota, siempre que el microorganismo pueda producir L-valina, por ejemplo, puede incluirse una cepa de microorganismo del género *Corynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium glutamicum*).

El microorganismo que produce L-valina que incluye la variante de acetohidroxiácido sintasa puede incluir tanto un microorganismo, que incluye la secuencia de una variante de acetohidroxiácido sintasa debido a la mutación de un gen que codifica la acetohidroxiácido sintasa en el cromosoma, y/o un microorganismo, que incluye la variante de acetohidroxiácido sintasa debido a la introducción de un vector que incluye un polinucleótido que codifica la variante de acetohidroxiácido sintasa, pero no se limita a ello.

Adicionalmente, el microorganismo que produce L-valina que incluye la variante de acetohidroxiácido sintasa puede ser un microorganismo en que la actividad de la variante de acetohidroxiácido sintasa está potenciada en comparación con la de la cepa precursora.

Los ejemplos de los métodos para potenciar la actividad de la variante de acetohidroxiácido sintasa pueden incluir un método de aumento del número de copias intracelular de un gen que codifica la variante, un método de introducción de una modificación en la secuencia de control de un gen que codifica la variante en el cromosoma, un método de sustitución de la secuencia de control de un gen que codifica la variante en el cromosoma con una secuencia que tiene fuerte actividad como un método de sustitución del gen que codifica la variante en el cromosoma con un gen mutado para aumentar la actividad de la variante y un método de introducción de una modificación en el gen que codifica la proteína variante en el cromosoma para potenciar la actividad de la variante, pero no se limita a ello.

Como se usa en este documento, el término "introducción" se refiere a un método para suministrar un polinucleótido que codifica la variante de acetohidroxiácido sintasa o un vector que incluye el polinucleótido en una célula hospedadora. La introducción puede realizarse fácilmente de acuerdo con un método convencional en la técnica. En general, un método de precipitación con CaCl_2 , un método de Hanahan con eficacia mejorada usando dimetil sulfóxido (DMSO) como agente reductor en el método de precipitación con CaCl_2 , electroporación, un método de precipitación con CaPO_4 , un método de fusión de protoplastos, un método de agitación usando fibra de carburo de silicio, una transformación usando PEG, transformaciones con sulfato de dextrano, lipofectamina y mediadas por secado/supresión, etc. El método para transformar el vector puede no estar limitado a estos métodos, sino que puede usarse cualquier método para la transformación o transfección habitualmente usado en la técnica sin limitación. Adicionalmente, el polinucleótido suministrado puede insertarse en el cromosoma de una célula hospedadora y ubicarse en el mismo o fuera del cromosoma, siempre que el polinucleótido puede expresarse en la célula hospedadora. Adicionalmente, el polinucleótido puede introducirse en cualquier forma, siempre que el polinucleótido pueda introducirse en una célula hospedadora y expresarse en ella. Por ejemplo, el polinucleótido puede introducirse en una célula hospedadora en forma de un casete de expresión, que es una construcción polinucleotídica que incluye todos los elementos esenciales requeridos para la autoexpresión, pero no se limita a ello. El casete de expresión puede incluir convencionalmente un promotor conectado de forma funcional al marco abierto de lectura (a partir de ahora en este documento, "ORF") del 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 con capacidad de autorreplicación. Adicionalmente, el polinucleótido puede introducirse en una célula hospedadora tal cual y conectado de forma funcional a una secuencia necesaria para su expresión en una célula hospedadora, pero no se limita particularmente a ello.

En una realización específica de la presente divulgación, la cepa precursora de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P se transformó con un vector que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una variante de acetohidroxiácido sintasa y se analizó la capacidad de producir L-valina y, como resultado, se demostró que la cepa transformada tenía una capacidad aumentada de producir L-valina en comparación con la de la cepa precursora.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para proporcionar L-valina usando un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-valina.

La L-valina, la acetohidroxiácido sintasa, la variante y el microorganismo son iguales a como se explica anteriormente.

En la presente divulgación, el método para cultivar la cepa que produce L-valina para la producción de L-valina puede realizarse usando un método para cultivar un microorganismo del género *Corynebacterium* que es bien conocido en la técnica. Específicamente, los ejemplos de los métodos de cultivo pueden incluir cultivo discontinuo, cultivo continuo y cultivo semicontinuo, pero no se limita a ello. Estos diversos métodos se divulgan en, por ejemplo, "Biochemical Engineering" (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, pág. 138 - 176, 1991), etc.

El medio usado para el cultivo debe cumplir los requisitos para el cultivo de una cepa específica. El medio de cultivo para un microorganismo del género *Corynebacterium* está divulgado (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., EE. UU., 1981). Los ejemplos de las fuentes de carbono a usar en el medio 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 ricino y grasa de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linólico; alcoholes tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden usarse en solitario o en combinación, pero no se limita a ello. Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno a usar en el medio pueden incluir peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de macerado del maíz y harina de soja; y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno también pueden usarse en solitario o en combinación, pero no se limitan a ello. Los ejemplos de las fuentes de fósforo a usar en el medio pueden incluir dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato de dipotasio o las correspondientes sales que contienen sodio. Adicionalmente, el medio de cultivo debe incluir sales metálicas tales como sulfato de magnesio y sulfato de hierro que son necesarias para el crecimiento. Además de las sustancias anteriores, también pueden incluirse materiales esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas.

Adicionalmente, pueden usarse precursores adecuados para un medio de cultivo. Estas fuentes pueden añadirse a un cultivo de una manera apropiada durante el cultivo por cultivo discontinuo o cultivo continuo, pero los métodos no se limitan a estos.

Adicionalmente, el pH de un cultivo puede ajustarse durante el cultivo añadiendo un compuesto básico tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y amoníaco, o un compuesto ácido tal como ácido fosfórico y ácido sulfúrico al cultivo de una manera apropiada. Durante el cultivo, puede añadirse un agente desespumante, tal como éster de poliglicol de ácido graso para evitar la generación de espuma. Adicionalmente, puede inyectarse oxígeno o un gas que contiene oxígeno al cultivo para mantener un estado aeróbico del cultivo. Generalmente, la temperatura del cultivo puede estar en el intervalo de 20 °C a 45 °C, pero no se limita a ello. El cultivo puede continuarse hasta que

la cantidad de producción de L-valina alcanza el nivel máximo, y normalmente durante 10 horas a 160 horas, pero no se limita a ello. La L-valina puede liberarse al medio de cultivo o puede incluirse en las células.

El método de preparación de L-valina de la presente divulgación puede incluir además recuperar la L-valina de un microorganismo cultivado o el medio de cultivo. Los métodos para recuperar un L-aminoácido de un microorganismo cultivado o un cultivo pueden incluir los bien conocidos en la técnica tales como centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, HPLC, etc., pero no se limita a ellos.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, un sobrenadante, obtenido por centrifugación del cultivo a baja velocidad seguido de retirada de la biomasa resultante, se separó por cromatografía de intercambio iónico.

[Descripción detallada de la invención]

A partir de ahora en este documento, la presente divulgación se describirá en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son con fines ilustrativos únicamente, y no se pretende que la invención esté limitada por estos ejemplos.

Ejemplo 1: selección de cepas mutantes por mutagénesis artificial

Para obtener una cepa de microorganismo mutante que tenga una capacidad potenciada de producir L-valina, se indujo la mutación de un microorganismo usando el siguiente método.

Específicamente, se inoculó una cepa precursora, *Corynebacterium glutamicum* productora de L-valina, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P (patente coreana n.º 10-1117022), en un medio de siembra que contenía los componentes descritos a continuación, que se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, se cultivó durante 13 horas y se recuperaron 25 ml del medio de cultivo. El medio de cultivo recuperado se lavó con tampón citrato 100 mM y se añadió N-metil-N'-nitro-N-nitro- soguanidina (NTG) al mismo a una concentración final de 400 mg/ml, se trató durante 30 minutos y el medio de cultivo se lavó con tampón fosfato 100 mM. Las cepas tratadas con NTG se extendieron en un medio mínimo y se midió la tasa de muerte, y como resultado, se mostró que la tasa de muerte era de un 99,6 %.

Para obtener una cepa mutante que tuviera resistencia a ácido α -aminobutírico (ABA), las cepas tratadas con NTG se extendieron en un medio mínimo que contenía ABA a una concentración final de 0 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM y 200 mM, respectivamente. Después, las cepas se cultivaron a 30 °C durante 7 días para obtener una cepa mutante resistente a ABA. La cepa mutante así obtenida se denominó *Corynebacterium glutamicum* NA100-311.

<Medio de siembra>

Azúcar sin procesar (20 g), peptona (10 g), extracto de levadura (5 g), urea (1,5 g), KH_2PO_4 (4 g), K_2HPO_4 (8 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), biotina (100 mg), tiamina HCl (1000 mg), calcio-ácido pantoténico (2000 mg) y nicotinamida (2000 mg) (basado en 1 l de agua destilada), pH 7,0

<Medio mínimo>

Glucosa (100 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 g), proteína de soja (2,5 g), sólidos de macerado del maíz (5 g), urea (3 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), biotina (100 mg), tiamina HCl (1000 mg), calcio-ácido pantoténico (2000 mg) y nicotinamida (3000 mg) (basado en 1 l de agua destilada), pH 7,0

Ejemplo 2: confirmación de la capacidad de producción de L-valina de la cepa seleccionada y confirmación de la secuencia de nucleótidos de *ilvN*

Para confirmar la capacidad de producción de L-valina de *Corynebacterium glutamicum* NA100-311, la cepa mutante seleccionada en el ejemplo 1, la cepa se cultivó mediante el siguiente método.

La cepa precursora (es decir, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P) y la cepa mutante (es decir, *Corynebacterium glutamicum* NA100-311) se inocularon en una cantidad de un asa de platino en matraces con deflectores en ángulo de 250 ml que contenían 25 ml del medio de producción descrito a continuación y se cultivaron a 30 °C durante 72 horas con agitación a 200 rpm para producir L-valina.

<Medio de producción>

Glucosa (100 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 g), proteína de soja (2,5 g), sólidos de macerado del maíz (5 g), urea (3 g), KH_2PO_4 (1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), biotina (100 mg), tiamina HCl (1000 mg), calcio-ácido pantoténico (2000 mg) y nicotinamida (3000 mg) (basado en 1 l de agua destilada), pH 7,0

Tras completarse el cultivo, se midió la cantidad de producción de L-valina por cromatografía de líquidos de alta

velocidad. Las concentraciones de L-valina en el medio de cultivo de las cepas experimentales se muestran en la tabla 1 a continuación.

[Tabla 1] Productividad de L-valina de cepas resistentes a ABA

Cepa	Concentración de L-valina (g/l)	Densidad óptica (DO)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCCM11201P	2,8	47,5
<i>Corynebacterium glutamicum</i> NA100-311	1,9	26,8

De acuerdo con los resultados anteriores, en el caso de la cepa precursora (es decir, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P), la densidad óptica del cultivo era de 47,5 y se producía L-valina en una concentración de 2,8 g/l, mientras que en el caso de la cepa mutante (es decir, *Corynebacterium glutamicum* NA100-311), se producía L-valina en una concentración de 1,9 g/l aunque la densidad óptica del cultivo era únicamente de 26,9. Tras calcular la concentración de L-valina (g/l/DO) producida por densidad óptica 1, se mostró que la concentración de L-valina para la cepa precursora (es decir, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P) era de 0,059 mientras que la cepa mutante (es decir, *Corynebacterium glutamicum* NA100-311) mostró un valor aumentado de 0,071, lo que sugiere, por tanto, que la cantidad de L-valina producida por la misma cantidad de células en la cepa mutante estaba aumentada en un 20,3 % en comparación con la de la cepa precursora.

Para confirmar la secuencia de nucleótidos del gen *ilvN*, que codifica la subunidad pequeña de la acetohidroxiácido sintasa en la cepa mutante (es decir, *Corynebacterium glutamicum* NA100-311), se amplificó el ADN cromosómico de la cepa mutante por reacción en cadena de la polimerasa (a partir de ahora en este documento, PCR).

Específicamente, en primer lugar, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1726 pb usando el ADN cromosómico de la cepa mutante (es decir, *Corynebacterium glutamicum* NA100-311) como molde junto con los cebadores de la SEQ ID NO: 1 y 2, en las siguientes condiciones: 28 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 58 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 40 s usando la ADN polimerasa Taq. Tras el análisis de la secuencia de nucleótidos usando los cebadores, se confirmó que el 409.º nucleótido, C, estaba sustituido con T y esto sugiere que la mutación era la sustitución del 137.º aminoácido, leucina, con fenilalanina.

Ejemplo 3: preparación de un vector que incluye una secuencia de nucleótidos sustituida de *ilvN*

Para preparar un vector que incluye la secuencia de nucleótidos mutada confirmada en el ejemplo 2, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1726 pb que tiene sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I usando el ADN cromosómico de la cepa mutante como molde junto con los cebadores de la SEQ ID NO: 1 y 2, en las siguientes condiciones: 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 58 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 1 min usando la ADN polimerasa Pfu. El fragmento amplificado se trató con enzimas de restricción, *Bam*HI y *Xba*I, y se ligó en un *pDZ*, que se trató con las mismas enzimas de restricción, para preparar *pDZ-ilvN(L137F)*.

Ejemplo 4: preparación de una cepa donde una secuencia de nucleótidos de *ilvN* está sustituida

Para preparar una cepa que incluye la secuencia de nucleótidos mutada de *ilvN* descubierta en la cepa mutante anterior, se usó *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P, que produce L-valina como cepa precursora.

La *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P se transformó con el vector *pDZ-ilvN(L137F)* preparado en el ejemplo 3 por electroporación. Una cepa que produce L-valina, en que el 137.º aminoácido, leucina, estaba sustituido con fenilalanina, en una secuencia de aminoácidos codificada por el gen *ilvN* en el cromosoma de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P, se obtuvo por segundo entrecruzamiento. La presencia de la sustitución de *ilvN* se confirmó analizando un fragmento de 1726 pb con el cebador de la SEQ ID NO: 2, después de amplificar un fragmento de 1726 pb por PCR usando los cebadores de la SEQ ID NO: 1 y 2 en las siguientes condiciones: 28 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 58 °C durante 30 s y polimerización a 72 °C durante 40 s usando la ADN polimerasa Taq.

La cepa transformada con el vector *pDZ-ilvN(L137F)* se llamó *Corynebacterium glutamicum* KCJ-644 y se depositó en el centro de cultivo de microorganismos coreano (KCCM), que está reconocido como autoridad de depósito internacional según el tratado de Budapest, el 2 de noviembre de 2013, con el número de acceso KCCM11485P.

Ejemplo 5: producción de L-valina en una cepa donde una secuencia de nucleótidos de *ilvN* está sustituida

Para producir L-valina a partir de la cepa productora de L-valina *Corynebacterium glutamicum* KCJ-644 preparada en el ejemplo 4, la cepa se cultivó por el siguiente método.

La cepa precursora (es decir, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P) y *Corynebacterium glutamicum* KCJ-644 preparada anteriormente se inocularon en una cantidad de un asa de platino en matraces con deflectores en ángulo de 250 ml que contenían 25 ml del medio de producción y se cultivaron a 30 °C durante 72 horas con agitación a 200 rpm para producir L-valina.

Tras completarse el cultivo, se midió la cantidad de producción de L-valina por cromatografía de líquidos a alta

velocidad. Las concentraciones de L-valina en el medio de cultivo de las cepas experimentales se muestran en la tabla 2 a continuación.

[Tabla 2] Productividad de L-valina de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P y *Corynebacterium glutamicum* KCJ-644

Cepa	Concentración de L-valina (g/l)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCCM11201P	2,8
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCJ-644	3,0

Como se muestra en la tabla 2, la *Corynebacterium glutamicum* KCJ-644, que es una cepa productora de L-valina que tiene una mutación L137F en el gen *ilvN*, mostró un aumento de un 7,1 % en la productividad de L-valina, en comparación con la cepa precursora, es decir, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P.

Ejemplo 6: medición de la actividad acetohidroxiácido sintasa en una cepa donde una secuencia de nucleótidos de *ilvN* está sustituida

Para medir la actividad acetohidroxiácido sintasa en la *Corynebacterium glutamicum* KCJ-644, que es una cepa productora de L-valina preparada en el ejemplo 4, se realizó un experimento por el siguiente método.

La cepa precursora (es decir, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P) y la *Corynebacterium glutamicum* KCJ-644 preparada anteriormente se inocularon en una cantidad de un asa de platino en matraces con deflectores en ángulo de 250 ml que contenían 25 ml del medio de siembra y se cultivaron a 30 °C durante 16 horas con agitación a 200 rpm. Tras completarse el cultivo, el medio de cultivo se centrifugó y el sobrenadante se descartó, y el sedimento se lavó y se mezcló con un tampón de lisis y las células se pulverizaron con un homogeneizador de microesferas. Las proteínas presentes en el lisado se cuantificaron de acuerdo con el ensayo de Bradford y la actividad de acetohidroxiácido sintasa se midió midiendo la producción de acetoína cuando se usaba el lisado que contiene 100 µg/ml de proteínas. Los resultados de la medición de la actividad acetohidroxiácido sintasa en cada cepa se muestran en la tabla 3 a continuación.

[Tabla 3]

Cepa	Actividad <i>ilvN</i> (mM/mg/min)
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCCM11201P	73,6
<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCJ-644	84,1

Como se muestra en la tabla 3, la *Corynebacterium glutamicum* KCJ-644, que es una cepa que produce L-valina que tiene una mutación L137F en el gen *ilvN*, mostró un aumento de un 14,3 % en la productividad de L-valina, en comparación con la cepa precursora, es decir, *Corynebacterium glutamicum* KCCM11201P.

A partir de lo anterior, un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación será capaz de entender que la presente divulgación puede plasmarse en otras formas específicas y modificar los conceptos técnicos o características esenciales de la presente divulgación. A este respecto, las realizaciones ejemplares divulgadas en este documento son únicamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente divulgación. Por el contrario, la presente divulgación pretende cubrir no solamente las realizaciones ejemplares, sino también diversas alternativas, modificaciones, equivalentes y otras realizaciones que pueden incluirse dentro del espíritu y alcance de la presente divulgación definida por las reivindicaciones adjuntas.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE
MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

5

FORMULARIO INTERNACIONAL

Destinatario: CJ CheilJedang Corporation

CJ CHEILJEDANG CENTER,
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, SEÚL 100-400,
REPÚBLICA DE COREA

RECIBO EN CASO DE UN ORIGINAL
expedido de conformidad con la Norma 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
identificada al final de esta página.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO	
Referencia de identificación facilitada por el DEPOSITANTE: <i>Corynebacterium glutamicum</i> KCJ-644	Número de acceso facilitado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL: KCCM11485P
II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado en el punto I arriba iba acompañado de: ☐ una descripción científica ☐ una designación taxonómica propuesta (Marque con una cruz la opción correspondiente)	
III. RECIBO Y APROBACIÓN	
Esta Autoridad Depositaria Internacional aprueba el microorganismo identificado en el punto I arriba, el cual recibió el 22 de noviembre de 2013 (fecha del depósito original). ¹	
IV. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL	
Nombre: Korean Culture Center of Microorganisms Dirección: Yurim B/D 45, Hongjena-e-2ga-gil Seodaemun-gu SEÚL 120-861 República de Corea	Firma(s) de la(s) persona(s) con facultad para representar a la Autoridad Depositaria Internacional o del funcionario o funcionarios autorizado(s): [sello ilegible] Fecha: 22 de noviembre de 2013.

10

¹ Cuando se aplique la Norma 6.4(d), esta fecha es la fecha en la que se adquirió la condición de autoridad depositaria internacional; cuando un depósito realizado fuera del ámbito del Tratado de Budapest después de la adquisición de la condición de autoridad depositaria internacional se convierta en un depósito dentro del ámbito del Tratado de Budapest, dicha fecha es la fecha en la que la autoridad depositaria internacional recibió el microorganismo.

15

Formulario BP/4

Página única

<110> CJ CheilJedang Corporation

20

<120> Variante de acetohidroxiácido sintasa resistente a retroalimentación y método para producir L-valina usando la misma

LISTA DE SECUENCIAS

<130> OPA15220-PCT

<150> KR 10-2014-0100669

<151> 05-08-2014

5

<160> 5

<170> KopatentIn 2.0

10

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador

<400> 1

cgttggccag caccagatgt 20

20

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Cebador

<400> 2

gatgtcgtca gctggcttga tc 22

30

<210> 3

<211> 172

<212> PRT

35

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(172)

40

<223> Acetohidroxiácido sintasa

<400> 3

Met Ala Asn Ser Asp Val Thr Arg His Ile Leu Ser Val Leu Val Gln
1 5 10 15

Asp Val Asp Gly Ile Ile Ser Arg Val Ser Gly Met Phe Thr Arg Arg
20 25 30

Ala Phe Asn Leu Val Ser Leu Val Ser Val Lys Thr Glu Thr Leu Gly
35 40 45

Ile Asn Arg Ile Thr Val Val Val Asp Ala Asp Glu Leu Asn Ile Glu
50 55 60

45

ES 2 702 726 T3

Gln	Ile	Thr	Lys	Gln	Leu	Asn	Lys	Leu	Ile	Pro	Val	Leu	Lys	Val	Val
65					70					75					80
Arg	Leu	Asp	Glu	Glu	Thr	Thr	Ile	Ala	Arg	Ala	Ile	Met	Leu	Val	Lys
			85						90					95	
Val	Ser	Ala	Asp	Ser	Thr	Asn	Arg	Pro	Gln	Ile	Val	Asp	Ala	Ala	Asn
			100					105					110		
Ile	Phe	Arg	Ala	Arg	Val	Val	Asp	Val	Ala	Pro	Asp	Ser	Val	Val	Ile
		115					120					125			
Glu	Ser	Thr	Gly	Thr	Pro	Gly	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Asp	Val	Met
	130					135					140				
Glu	Pro	Phe	Gly	Ile	Arg	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser	Gly	Gln	Ile	Ala	Leu
145					150					155					160
Asn	Arg	Gly	Pro	Lys	Thr	Met	Ala	Pro	Ala	Lys	Ile				
				165					170						

<210> 4

<211> 172

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> variante de acetohidroxiácido sintasa

10

<400> 4

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

15

<210> 5

<211> 519

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> variante de acetohidroxiácido sintasa

<400> 5

atggctaatt ctgacgtcac ccgccacatc ctgtccgtac tcgttcagga cgtagacgga	60
atcatttccc gcgtatcagg tatgttcacc cgacgcgcac tcaacctcgt gtccctcgtg	120
tctgtaaaga ccgaaacact cggcatcaac cgcatacagg ttgttgatga cgcgcacgag	180
ctcaacattg agcagatcac caagcagctc aacaagctga tccccgtgct caaagtcgtg	240
cgacttgatg aagagaccac catcgcccg ccaatcatgc tggtaaggt ctctcggat	300
agcaccaacc gtccgcagat cgtcgacgcc gcgaacatct tccgcgccg agtcgtcgac	360
gtggctccag actctgtggt tattgaatcc acaggcacc caggcaagtt ccgcgcactg	420
cttgatgtga tggaaccatt cggaaatccg gaactgatcc aatccggaca gattgcactc	480
aaccgcggtc cgaagaccat ggctccggcc aagatctaa	519

REIVINDICACIONES

1. Una variante de acetohidroxiácido sintasa, en la que el 137.º aminoácido desde el extremo N de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, leucina (L), está sustituido con un aminoácido diferente de leucina y, por tanto, la inhibición por retroalimentación de L-valina está eliminada.
2. La variante de acetohidroxiácido sintasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la variante tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
3. Un polinucleótido que codifica la variante de acetohidroxiácido sintasa de la reivindicación 1.
4. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
5. Un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-valina, que comprende la variante de acetohidroxiácido sintasa de la reivindicación 1.
6. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la variante de acetohidroxiácido sintasa tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
7. El microorganismo de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el microorganismo del género *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum*.
8. Un método para producir L-valina, que comprende:
 - (a) cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* que produce L-valina de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en un medio y producir L-valina; y
 - (b) recuperar L-valina del microorganismo cultivado o del medio de cultivo.