

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 320**

51 Int. Cl.:

C12P 13/06 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

C12N 15/77 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2016 PCT/KR2016/009438**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17034343**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2016 E 16839631 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3342871**

54 Título: **Microorganismo con productividad de L-leucina, y el método para preparar la L-leucina usando el mismo**

30 Prioridad:

25.08.2015 KR 20150119785

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

11.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 805 320 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

Microorganismo con productividad de L-leucina, y el método para preparar la L-leucina usando el mismo

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere a un microorganismo que produce L-leucina y un método para producir L-leucina mediante el uso del microorganismo.

10 **Antecedentes de la Técnica**

Los aminoácidos de cadena ramificada se refieren a tres tipos de aminoácidos (es decir, L-valina, L-leucina y L-isoleucina) y se conoce que se metabolizan principalmente en el músculo y que se usan como fuente de energía durante la actividad física. Junto con el aumento de la conciencia con respecto a las funciones importantes de estos aminoácidos de cadena ramificada en el mantenimiento y el aumento de la masa muscular durante la actividad física, su uso también está en aumento. En particular, la L-leucina es un aminoácido esencial y se usa ampliamente en medicamentos, alimentos, aditivos alimenticios, productos químicos industriales, *etcétera*.

Mientras tanto, estos aminoácidos de cadena ramificada se producen principalmente por microorganismos del género *Escherichia* o del género *Corynebacterium*, y se conoce que se biosintetizan a partir del ácido 2-cetoisocaproico, un precursor, después de experimentar numerosas etapas a partir del ácido pirúvico (Patentes coreanas Núms. 10-0220018 y 10-0438146). Sin embargo, las enzimas involucradas en la biosíntesis de la leucina tienen el problema de sufrir una inhibición de retroalimentación causada por el producto final, es decir, la L-leucina o un derivado de esta, por lo tanto, se hace difícil realizar la producción industrial a gran escala de L-leucina.

25 **Descripción**

Problema técnico

Los inventores de la presente descripción han hecho esfuerzos para desarrollar microorganismos que produzcan L-leucina con un rendimiento más alto en comparación con las cepas convencionales. Como resultado, han descubierto que los mutantes obtenidos mediante el uso de un microorganismo productor de ácido glutámico tienen resistencia a la norleucina (NL) (es decir, un derivado de leucina), y que en estos mutantes se desencadena la inhibición de retroalimentación por L-leucina o un derivado de esta, y por lo tanto, la L-leucina se produce con alto rendimiento, completando de esta manera la presente descripción.

Solución técnica

Un objeto de la presente descripción es proporcionar un mutante de *Corynebacterium glutamicum* que tenga la capacidad novedosa de producir L-leucina.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para producir L-leucina mediante el uso del mutante *Corynebacterium glutamicum*.

45 **Efectos ventajosos de la invención**

El microorganismo del género *Corynebacterium glutamicum* es un microorganismo que tiene resistencia a L-leucina o a un derivado de esta y, por lo tanto, puede prevenir la inhibición por retroalimentación y que ha mejorado la productividad de L-leucina en comparación con su cepa original. Por consiguiente, el método para producir L-leucina mediante el uso del microorganismo de la presente descripción puede producir L-leucina con alta eficiencia y alto rendimiento.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra una ruta biosintética de L-leucina, que es el producto final de la presente descripción.

Mejor modo

60 Un aspecto de la presente descripción proporciona un mutante novedoso de *Corynebacterium glutamicum* (cepa modificada de *Corynebacterium glutamicum*) que produce L-leucina, y específicamente, la invención proporciona un mutante depositado bajo el núm. de Acceso KCCM11661P y un mutante depositado bajo el núm. de Acceso KCCM11662P para la producción de L-leucina.

65 Como se usa en la presente descripción, el término "L-leucina", el cual es un aminoácido esencial, se refiere a un L-aminoácido representado por la fórmula $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ que corresponde estructuralmente a

aminoácidos de cadena ramificada junto con L-valina y L-isoleucina. Mientras tanto, con respecto a la biosíntesis de L-leucina en microorganismos, se conoce que la biosíntesis de L-leucina se biosintetiza a partir del ácido pirúvico a través del ácido acetoláctico, el ácido dihidroxi isovalérico, el ácido cetoisovalérico, el ácido 2-isopropilmálico, el ácido 3-isopropilmálico, y el ácido cetoisocaproico a través del proceso biosintético mostrado en la Figura 1. Además, la L-leucina se biosintetiza mediante la catálisis del proceso biosintético mediante el uso de enzimas, tales como acetohidroxiácido sintasa, acetohidroxiácido isomerorreductasa, dihidroxiácido deshidratasa, ácido isopropilmálico sintasa, ácido isopropilmálico deshidratasa, ácido isopropilmálico dehidrogenasa, y la transaminasa B. Sin embargo, es difícil producir industrialmente solo un tipo de aminoácido de cadena ramificada a través de la fermentación porque las enzimas usadas en las vías son las mismas en el proceso biosintético de los aminoácidos de cadena ramificada (es decir, L-valina, L-isoleucina y L-leucina). Además, debido a la aparición de inhibición por retroalimentación por parte del producto final (es decir, L-leucina o un derivado de esta), ha habido un problema en la producción industrial a gran escala de L-leucina. A este respecto, el mutante de la presente descripción puede tener resistencia a la L-leucina o a un derivado de esta.

Como se usa en la presente descripción, el término "derivado" puede referirse a compuestos que se conoce que son capaces de inhibir la capacidad de producción de L-leucina de los microorganismos, mediante la inducción de la inhibición por retroalimentación en relación con la biosíntesis de la L-leucina, el producto final de la presente descripción. Los ejemplos de los compuestos pueden incluir isoleucina, terleucina, norleucina, cicloleucina, etcétera, pero no se limitan a estos. Específicamente, el mutante puede tener resistencia a al menos un material seleccionado del grupo que consiste en leucina, isoleucina, terleucina, norleucina, y cicloleucina, y más específicamente, a la norleucina. En general, se conoce que la biosíntesis de la L-leucina se inhibe cuando la L-leucina se acumula por encima de un determinado nivel en una célula. Por lo tanto, cualquier cepa que tenga resistencia al derivado puede desencadenar la inhibición por L-leucina y puede producir L-leucina incluso a una concentración alta de L-leucina.

Puede obtenerse un mutante deseado del microorganismo que produce L-leucina de la presente descripción mediante mutagénesis de su cepa original. En particular, la mutagénesis del microorganismo puede realizarse mediante diversos métodos bien conocidos en la técnica, y puede usarse ambas mutagénesis, física o química. Por ejemplo, los ejemplos de mutágenos químicos adecuados para la presente descripción pueden incluir *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG), diepoxibutano, metanosulfonato de etilo, compuestos de mostaza, hidrazina, y nitrito, pero los mutágenos químicos no se limitan a estos. Además, los ejemplos de mutágenos físicos pueden incluir radiaciones ultravioleta y gamma, pero los mutágenos físicos no se limitan a estos.

Cuando se induce la mutagénesis, una cepa parental se afecta por un mutágeno a una concentración que puede dejar un tamaño particular de una población sobreviviente de la cepa parental. El tamaño varía con el tipo de mutágeno y depende de la cantidad de mutación que se induce dentro de la población sobreviviente a una tasa de mortalidad constante. Por ejemplo, en el caso de NTG, la tasa de mortalidad puede dejar viable aproximadamente del 10 % al 50 % de la población inicial. La mutagénesis por ácido nitroso puede dejar aproximadamente del 0,01 % al 0,1 % de la población inicial viable, y la mutagénesis por luz ultravioleta puede dejar aproximadamente el 1,0 % de la población inicial viable, pero los mutágenos no se limitan a estos.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona un método para producir L-leucina que incluye cultivar un mutante de *Corynebacterium glutamicum* y recuperar L-leucina a partir del mutante de *Corynebacterium glutamicum* o de un cultivo de estas.

Como se usa en la presente descripción, el término "cultivar" significa que los microorganismos se cultivan en condiciones ambientales apropiadas, y controladas artificialmente. El cultivo del microorganismo de la presente descripción puede realizarse mediante el uso del método ampliamente conocido en la técnica para cultivar *Corynebacterium glutamicum*. Específicamente, los ejemplos de los métodos de cultivo pueden incluir un cultivo por lotes, un cultivo continuo, y un cultivo por lotes de alimentación, pero los métodos de cultivo no se limitan a estos. Estos diversos métodos se describen, por ejemplo, en "Biochemical Engineering" (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, págs. 138 a 176, 1991), etcétera.

Como se usa en la presente descripción, el término "cultivo" se refiere a un material que contiene un medio en el que un microorganismo se cultiva o ha crecido en condiciones ambientales apropiadas, y controladas artificialmente. El cultivo no incluye un microorganismo desarrollado en un sentido estricto, pero puede incluirlo en un sentido amplio. El "cultivo" incluye diversos materiales que se liberan en el medio por un microorganismo durante su crecimiento junto con los componentes del medio establecidos para el cultivo del microorganismo, y específicamente, la leucina, que es el material objetivo.

El medio usado para el cultivo debe cumplir los requisitos para el cultivo de una cepa específica de manera adecuada. Se describen los ejemplos de los medios de cultivo para las cepas de *Corynebacterium* (por ejemplo, Manual de Métodos para Bacteriología General). American Society for Bacteriology. Washington DC, EE.UU., 1981). Los ejemplos de las fuentes de carbono para usarse pueden incluir sacáridos 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 aceite de coco; ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico, y ácido linoleico; alcoholes, tales como glicerol y etanol; y ácidos orgánicos tales como ácido acético, pero las fuentes de carbono no

se limitan a estos. Estos materiales pueden usarse solos o en combinación. Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno para usarse pueden incluir peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor macerado de maíz, harina de soja, y urea, o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, y nitrato de amonio, pero las fuentes de nitrógeno no se limitan a estas. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse solas o en combinación. Los ejemplos de fuentes de fósforo para usarse pueden incluir dihidrógeno fosfato de potasio o fosfato de hidrógeno dipotásico o sus correspondientes sales que contienen sodio, pero las fuentes de fósforo no se limitan a estas. Además, los medios de cultivo pueden incluir sales metálicas tales como sulfato de magnesio y sulfato férrico, que son necesarias para el crecimiento. Además de las sustancias anteriores, pueden incluirse materiales de crecimiento esenciales, tales como aminoácidos y vitaminas. Los precursores apropiados pueden usarse, además, en los medios de cultivo. Los materiales mencionados anteriormente pueden adicionarse a los medios de cultivo de manera apropiada mediante cultivo por lote o el cultivo continuo durante el proceso de cultivo.

Mientras tanto, el pH del cultivo puede ajustarse mediante el uso de compuestos básicos tales como el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, y el amoníaco, o compuestos ácidos tales como el ácido fosfórico y el ácido sulfúrico, de manera apropiada. Además, puede evitarse la generación de burbujas de aire mediante el uso de un agente antiespumante tal como el éster de poliglicol de ácido graso. Para mantener las condiciones aeróbicas, se inyecta en el cultivo oxígeno o un gas que contiene oxígeno (*por ejemplo*, aire). Generalmente, la temperatura de los medios de cultivo puede estar en un intervalo de 20 °C a 45 °C. El cultivo continúa hasta que la producción de L-leucina alcanza su nivel máximo, que normalmente se logra en 10 a 160 horas. La L-leucina puede liberarse en los medios de cultivo o estar contenida dentro de las células.

El método para recuperar L-leucina de las células o los medios de cultivo puede realizarse mediante un método convencional conocido en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, HPLC, *etcétera*, pero el método no se limita a estos.

Descripción detallada de la invención

A continuación, la presente descripción se describirá en detalle a través de modalidades representativas. Sin embargo, estas modalidades representativas se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente descripción.

Ejemplo 1: Selección de mutantes mediante mutagénesis artificial

Para obtener mutantes de microorganismos que producen L-leucina, se indujo la modificación de un microorganismo mediante el siguiente método.

Específicamente, las cepas parentales (*es decir*, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 y *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 productoras de ácido glutámico), que se activaron mediante el cultivo en un medio de activación durante 16 horas, se inocularon en un medio de siembra que se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos, y se cultivaron en el mismo durante 14 horas. Después, se recolectaron 5 mL del medio de cultivo y se lavaron con tampón citrato 100 mM, y se añadió *N*-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (NTG) a estos hasta una concentración final de 200 mg/L. Después del tratamiento durante 20 minutos, 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 mortalidad. Como resultado, se confirmó que la tasa de mortalidad era del 85 %. Para seleccionar cepas modificadas que tienen resistencia a la norleucina (NL), que corresponde a un derivado de L-leucina, las cepas tratadas con NTG se extendieron en un medio mínimo que contenía NL a una concentración final de 20 mM, 30 mM, 40 mM y 50 mM, respectivamente. Después, las cepas se cultivaron a 30 °C durante 5 días, y de esta manera se obtuvieron mutantes que tienen resistencia a NL.

Los mutantes así obtenidos fueron designados como *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 y *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28, respectivamente, y se depositaron en el Centro de Cultivo de Microorganismos de Corea (KCCM), que es una autoridad depositaria internacional bajo el Tratado de Budapest, el 22 de enero de 2015, y los Números de Acceso asignados fueron KCCM11661P y KCCM11662P, respectivamente.

Las composiciones de los medios de cultivo usados en los Ejemplos 1 y 2 son las siguientes:

<Medio de activación>

Extracto de res 1 %, Polipeptona 1 %, Cloruro de sodio 0,5 %, Extracto de Levadura 1 %, Agar 2 %, pH 7,2

<Medio de siembra>

Glucosa 5 %, Peptona Bacto 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 %, Fosfato de Dihidrógeno de Potasio 0,1 %, Urea 0,1 %, Tiamina 0,001 %, Biotina 200 µg/L, Agar 2 %, pH 7,0

Ejemplo 2: Examen de la capacidad de producción de L-leucina de los mutantes

El *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 y el *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28, que se obtuvieron en el Ejemplo 1 y se confirmaron que tienen resistencia al NL a altas concentraciones, se cultivaron mediante el siguiente método, con el propósito de confirmar su capacidad para producir L-leucina.

5 El *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 y el *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869 (es decir, las cepas parentales), y los dos mutantes se inocularon cada uno en frascos deflectores de esquina de 250 mL que contenían 25 mL del medio de siembra más abajo, y se cultivaron a 30 °C durante 20 horas con agitación a 200 rpm para obtener medios de cultivo para siembra. Posteriormente, 1 mL de cada uno de los medios de cultivo para siembra se
10 inoculó en un frasco deflector de esquina de 250 mL que contenía 24 mL del siguiente medio de producción, y se cultivó a 30 °C durante 72 horas con agitación a 200 rpm para producir L-leucina.

La composición del medio de producción usado en el presente Ejemplo 2 es como sigue.

<Medio de producción>

15 Glucosa 5 %, Sulfato de Amonio 2 %, Fosfato de Dihidrógeno de Potasio 0,1 %, Sulfato de Magnesio Heptahidratado 0,05 %, Licor de Maíz (CSL) 2,0 %, Biotina 200 µg/L, pH 7,2

Al finalizar el cultivo, la cantidad de producción de L-leucina se midió mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Las concentraciones de L-leucina en los medios de cultivo para cada cepa para los experimentos
20 se resumen en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1 - Comparación de la capacidad de producción de L-leucina entre *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 y *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28

25

	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 14067 (Cepa parental)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCJ-24 (Cepa Modificada)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13869 (Cepa Parental)	<i>Corynebacterium glutamicum</i> KCJ-28 (Cepa Modificada)
30 Concentración de L-leucina (g/L)	0,1	2,7	0,3	3,1

35 Como resultado, como se muestra en la Tabla 1, las cepas parentales (es decir, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067 y *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869) produjeron 0,1 g/L y 0,3 g/L de L-leucina, respectivamente, pero los mutantes (es decir, *Corynebacterium glutamicum* KCJ-24 y *Corynebacterium glutamicum* KCJ-28) de acuerdo con la presente descripción produjeron 2,7 g/L y 3,1 g/L de L-leucina, respectivamente, lo que confirma que la capacidad de producción de L-leucina de los mutantes aumentó en al menos aproximadamente 10 veces en
40 comparación con los de las cepas parentales.

Los resultados anteriores sugieren que los mutantes que tienen resistencia a L-leucina y norleucina no se ven afectados por la inhibición por retroalimentación de la leucina o un derivado de esta y, por lo tanto, pueden producir L-leucina con alta eficiencia y alto rendimiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un mutante de *Corynebacterium glutamicum* que produce L-leucina seleccionado del grupo que consiste en un mutante depositado con el número de acceso KCCM11661P y un mutante depositado con el número de acceso KCCM11662P.
2. El mutante de *Corynebacterium glutamicum* de la reivindicación 1, en donde el mutante tiene resistencia a L-leucina y un derivado de esta seleccionado de isoleucina, terleucina, norleucina y cicloleucina.
- 10 3. El mutante de *Corynebacterium glutamicum* de la reivindicación 2, en donde el derivado de L-leucina es norleucina (NL).
- 15 4. Un método para producir leucina, que comprende:
cultivar el mutante de *Corynebacterium glutamicum* de la reivindicación 1; y
recuperar la L-leucina del mutante de *Corynebacterium glutamicum* o del cultivo.

FIGURA 1

