(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 856 338**

(51) Int. CI.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12P 13/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2013 PCT/KR2013/005145**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14200126**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2013 E 13886664 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2020 EP 3009504**

(54) Título: **Microorganismo que produce L-isoleucina y método de preparación de L-isoleucina mediante el uso del mismo**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2021

(73) Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
330 Dongho-ro
Jung-gu, Seúl, KR

(72) Inventor/es:

KIM, HYE WON;
LEE, JI HYE;
KIM, JONG HYUN;
LEE, HAN HYOUNG y
JEON, AE JI

(74) Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

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 que produce L-isoleucina y método de preparación de L-isoleucina mediante el uso del mismo

[Título de la invención]

Microorganismo que produce L-isoleucina y método de producción de L-isoleucina mediante el uso del mismo

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a un microorganismo que tiene una capacidad mejorada de producir L-isoleucina y a un método de producción de L-isoleucina mediante el uso del mismo.

[Antecedentes de la técnica]

El L-aminoácido es la unidad básica de las proteínas y se usa ampliamente como aditivo alimentario funcional y una fuente de nutrientes para los animales y en la industria farmacéutica. Entre los 20 aminoácidos, los aminoácidos de cadena ramificada constan de tres miembros, L-valina, L-leucina y L-isoleucina, y su valor industrial aumenta gradualmente. Se informó que los aminoácidos de cadena ramificada desempeñan un papel importante en el mantenimiento y la formación del músculo esquelético humano, y que funcionan para regular la insulina y mantener y aumentar la masa muscular (Andrea tom y otros, (2006) The journal of nutrition, 136, 324s-330s). Particularmente, la L-isoleucina se metaboliza en el músculo para producir energía y participa en la producción de la hemoglobina, reduce la fatiga y promueve el crecimiento. Por lo tanto, se usa en diversas aplicaciones, que incluye los fluidos inyectables y los nutrientes, y su uso en los alimentos nutricionales deportivos también está en aumento.

Para producir industrialmente L-isoleucina, se usa *Corynebacterium glutamicum* como microorganismo representativo. Este microorganismo produce L-isoleucina a través de tres metabolitos intermediarios a partir de piruvato y 2-cetobutirato como precursores (ver la Figura 1). A partir de los dos precursores, se sintetiza el 2-aceto-2-hidroxibutirato, y a partir del mismo se sintetizan el 2,3-dihidroxi-3-metilvalerato y el 2-ceto-3-metilvalerato, y finalmente se produce L-isoleucina. Para producir cada uno de los metabolitos, se usan las enzimas acetohidroxiácido sintasa, acetohidroxiácido isomerorreductasa, dihidroxiácido deshidratasa y aminotransferasa (Jin Hwan Park y otros, Appl microbial biotechnol, (2010) 85:491-506).

En las cepas de *Corynebacterium glutamicum*, la acetohidroxiácido sintasa, que es importante en la etapa de biosíntesis de la L-isoleucina, se codifica por el gen ilvBN y sufre una inhibición por retroalimentación por el producto final L-isoleucina, de manera que se inhiben la expresión del gen y la actividad de la enzima. Además, la treonina deshidratasa que produce el 2-cetobutirato también sufre una inhibición por retroalimentación por L-isoleucina. Por lo tanto, se sabe que la regulación de la expresión de los genes y la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de la L-isoleucina son fundamentales para generar las cepas que producen L-isoleucina con un alto rendimiento (Jin hwan park y otros, Biotechnology journal, (2010) 560-577). Además, como puede verse en la Figura 1, la L-isoleucina, la L-valina y la L-leucina se producen a través de la misma vía de biosíntesis. Por lo tanto, para producir en masa la L-isoleucina, la L-treonina, que se usa como precursor del 2-cetobutirato, debe suministrarse suficientemente para que se pueda reducir la producción de otros aminoácidos de cadena ramificada y la L-isoleucina se produzca continuamente. En un intento por resolver este problema, se informó que la α-amino-β-hidroxinorvalina, un derivado de la L-treonina, podría usarse para aumentar la producción de L-treonina (Cayo Ramos y otros, Applied and environmental microbiology, (1992) 1677-1682). Además, se reportaron un método para impartir la capacidad de producción de L-isoleucina a un microorganismo que tiene la capacidad de producir L-treonina (Publicación de Patente coreana abierta al público núm. 2011-0058731), un microorganismo que produce L-treonina y L-isoleucina al mismo tiempo (Publicación de Patente coreana abierta al público núm 2002-0013777), etc. Además, se reportó que el uso de 4-tiaisoleucina, un derivado de la isoleucina, inhibió la retroalimentación de la treonina deshidratasa (John J. Wasmuth, Journal of bacteriology, (1973) 562-570). Además, se reportó que una cepa mutante resistente a isoleucina-hidroxamato tiene una capacidad mejorada para producir L-isoleucina (M. Kisumi, Journal of general microbiology, (1971) 69 291-297). Además, hubo reportes de un método de I+D para AHAS que comprende la mutación de una cepa que produce L-isoleucina para aumentar la producción de L-isoleucina en comparación con la producción de L-valina (Publicación de Patente coreana abierta al público núm. 2011-0061780), y un estudio centrado en aumentar el rendimiento de la producción de L-isoleucina al cambiar el suministro de oxígeno o las condiciones físicas como el pH durante la fermentación (Zhijian Peng y otros, Bioproc. Biosyst. Eng., (2010) 33:339-345).

Kase H. y Nakayama K., Agric. Biol. Chem., 1977, 41(1), 109-116, describen la generación de una cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* para la producción de cantidades elevadas de L-isoleucina mediante el tratamiento de la cepa parental *Corynebacterium glutamicum* KY10501 con el mutágeno NTG.

El documento US 4,656,135 se refiere a un método para la producción de L-isoleucina en los microorganismos del género Corynebacterium que muestran resistencia a la retroalimentación frente a la metilisina o el ácido alfa-cetomalónico.

Sin embargo, los microorganismos que producen L-isoleucina, que se han estudiado y desarrollado hasta la fecha, son resistentes por separado a algunas sustancias de la vía de biosíntesis de la L-isoleucina. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar un microorganismo que produce L-isoleucina resistente a diversas sustancias que intervienen en el control de la retroalimentación en la biosíntesis de L-isoleucina.

[Descripción]

[Problema Técnico]

Los presentes inventores han hecho grandes esfuerzos para desarrollar microorganismos superiores productores de L-isoleucina en comparación con las cepas anteriores, y han encontrado que una cepa mutante que es resistente a α-amino-β-hidroxinorvalina (un derivado de L-treonina), 4-tiaisoleucina e isoleucina-hidroxamato (derivados de isoleucina) produce L-isoleucina con un alto rendimiento, completando de esta manera la presente invención.

[Solución técnica]

Un objeto de la presente invención es proporcionar una cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* para la producción de L-isoleucina con un alto rendimiento.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de producción de L-isoleucina mediante el uso de la cepa mutante.

Además, se describe un método de producción de una cepa mutante para la producción de L-isoleucina con alto rendimiento a partir de *Corynebacterium glutamicum*.

[Efectos ventajosos]

La cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* de la presente invención es resistente a L-isoleucina, L-treonina y sus derivados y, por lo tanto, no sufre inhibición por retroalimentación de la L-isoleucina y se suministra suficientemente con L-treonina que es un precursor de la L-isoleucina. Por lo tanto, tiene una mayor capacidad para producir L-isoleucina. Por lo tanto, el método de producción de L-isoleucina mediante el uso del microorganismo de acuerdo con la presente invención puede producir L-isoleucina con alta eficacia y un alto rendimiento.

[Descripción de los dibujos]

La Figura 1 muestra la vía de biosíntesis de los aminoácidos de cadena ramificada que incluye la L-isoleucina, el producto final de la presente invención. Como se muestra en la Figura 1, los aminoácidos de cadena ramificada se producen a través de la vía de biosíntesis mediante el uso de la misma enzima.

[Mejor modo]

En un aspecto, la presente invención proporciona la cepa mutante KCCM11248P de *Corynebacterium glutamicum* para la producción de L-isoleucina.

Como se usa en la presente descripción, el término "L-isoleucina" se refiere a uno de los aminoácidos esenciales y a uno de los aminoácidos de cadena ramificada con L-valina y L-leucina, y tiene una fórmula estructural de $HO_2CCH(NH_2)CH(CH_3)CH_2CH_3$.

Como se muestra en la Figura 1, en los microorganismos, la L-isoleucina se biosintetiza mediante un proceso de biosíntesis de cuatro etapas a partir de piruvato y 2-cetobutirato como precursores. Sin embargo, las etapas de biosíntesis también se usan comúnmente en la biosíntesis de los otros aminoácidos de cadena ramificada (es decir, L-valina y L-leucina) y se requiere que se suministre suficientemente con L-treonina, un precursor requerido para la biosíntesis de L-isoleucina. Por esta razón, es difícil producir en masa la L-isoleucina por fermentación. La cepa mutante de la presente invención es resistente a la inhibición por retroalimentación por el producto final L-isoleucina, L-treonina y sus derivados, y por lo tanto se suministra suficientemente con un precursor de la L-isoleucina. La cepa mutante de la presente invención es un microorganismo novedoso que tiene una capacidad mejorada para producir L-isoleucina.

Específicamente, la cepa mutante de la presente invención puede ser resistente a la L-isoleucina o sus derivados y la L-treonina o sus derivados. Más específicamente, puede ser resistente a los derivados de la L-isoleucina y los derivados de la L-treonina.

Como se usa en la presente descripción, el término "derivados" se refiere a los compuestos conocidos que pueden causar inhibición por retroalimentación en la biosíntesis del producto final L-isoleucina o su precursor L-treonina que puede reducir la producción de L-isoleucina o L-treonina. Los ejemplos de derivados de L-isoleucina incluyen, pero no se limitan a, 4-tiaisoleucina (tiaile) e isoleucina-hidroxamato (ileHx), y los ejemplos de derivados de L-treonina

incluyen, pero no se limitan a, a-amino-β-hidroxinorvalina (AHV) y similares. Específicamente, la cepa mutante puede ser resistente a uno o más seleccionados del grupo que consiste de 4-tiaisoleucina, isoleucina-hidroxamato y α-amino-β-hidroxinorvalina. Más específicamente, la cepa mutante puede ser resistente a 4-tiaisoleucina, isoleucina-hidroxamato y α-amino-β-hidroxinorvalina.

En general, se sabe que la biosíntesis de L-isoleucina en las células se inhibe cuando la L-isoleucina se acumula por encima de una concentración o título específico. En consecuencia, la cepa resistente a los derivados se libera de la inhibición por retroalimentación causada por la L-isoleucina y, por lo tanto, tiene la capacidad de producir L-isoleucina incluso en condiciones que contienen una alta concentración de L-isoleucina. En un ejemplo de la presente invención, los presentes inventores usaron los derivados para seleccionar una cepa que produce una alta concentración de L-isoleucina. Dado que la L-treonina se usa como un precursor del ácido 2-cetobutírico para la producción de L-isoleucina, una cepa resistente a la L-treonina se libera de la inhibición por retroalimentación causada por la L-treonina, de manera que la L-treonina se suministre suficientemente para ello.

De acuerdo con la presente divulgación, una cepa mutante que tiene una capacidad mejorada para producir L-isoleucina se obtiene al mutar una cepa parental y seleccionar una cepa deseada. En la presente descripción, la mutagénesis del microorganismo se puede realizar por diversos medios ampliamente conocidos en la técnica y se puede realizar mediante el uso de uno de los métodos de mutagénesis física o química. Los ejemplos de agentes mutagénicos químicos en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), dietoxibutano, etilmetanosulfonato, compuestos de mostaza, hidrazina, y nitritos. Los ejemplos de agentes mutagénicos físicos incluyen, pero no se limitan a, luz UV y radiación gamma.

En la mutagénesis, una cepa parental se influencia por un agente mutagénico a una concentración adecuada que permanece con una población viable que tiene un tamaño específico. El tamaño puede variar en dependencia del tipo de agente mutagénico y en función de la cantidad de la mutación en la población viable, que se causa por el agente mutagénico a una velocidad de destrucción específica. Por ejemplo, cuando se usa el NTG, puede quedar aproximadamente del 10-50 % de la población inicial. Cuando la mutagénesis se realiza mediante el nitrito, puede quedar aproximadamente del 0,01-0,1 % de la población inicial, y cuando la mutagénesis se realiza mediante luz UV, puede quedar aproximadamente el 1,0 % de la población inicial. En un ejemplo de la presente invención, para construir una cepa mutante que tenga una capacidad mejorada para producir L-isoleucina, se usó NTG para inducir una mutación en una cepa parental.

En un ejemplo de la presente invención, para construir una cepa mutante que tenga una capacidad mejorada para producir L-isoleucina, se usó como cepa parental la *Corynebacterium glutamicum* KFCC 11040 productora de glutamato (*Corynebacterium glutamicum* KFCC 11040 (Publicación de Patente Coreana abierta al público 2000-0002407)). Después de realizar la mutagénesis aleatoria en la cepa parental, la cepa parental se extendió en un medio mínimo suplementado con los derivados de la L-isoleucina tal como 4-tiaisoleucina (tiaile) e isoleucina-hidroxamato (ileHx) y el derivado de la L-treonina tal como α-amino-β-hidroxivalina (AHV). La cepa mutante resistente a todos los derivados se seleccionó a concentraciones de 1 mM, 1 mg/ml y 25 mg/ml, respectivamente, y se denominó "KCJI-38". Además, se demostró que la producción de L-isoleucina en la cepa mutante era al menos 13 veces mayor que en la cepa parental (ver la Tabla 1). La cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* (*Corynebacterium glutamicum*, KCJI-38) se depositó en el Centro de cultivo de microorganismos de Corea (dirección: Yurim Building, 361-221, Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), una autoridad internacional de depósito, el 9 de enero de 2012 con el número de acceso KCCM11248P.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de L-isoleucina, el método que comprende el cultivo de la cepa mutante.

Específicamente, el método de producción de L-isoleucina puede comprender además recuperar la L-isoleucina del medio de cultivo de la cepa mutante.

Como se usa en la presente descripción, el término "cultivo" significa permitir que los microorganismos crezcan en condiciones ambientales adecuadas controladas artificialmente. En la presente invención, el método de cultivo de la cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* para producir L-isoleucina se puede realizar mediante el uso de cualquier método de cultivo de *Corynebacterium glutamicum* conocido en la técnica. Los ejemplos del método de cultivo incluyen, pero no se limitan a, el cultivo discontinuo, el cultivo continuo y el cultivo semicontinuo. Estos métodos de cultivo se describen, por ejemplo, en “Biochemical Engineering” (James M. Lee, Prentice-Hall International Editions, (1991) págs. 138-176).

Un método que se utilice en el cultivo debe satisfacer los requisitos para una cepa específica. Se conocen los medios de cultivo para la *Corynebacterium glutamicum* (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., EE.UU., 1981).

Las fuentes de carbono que pueden usarse en la presente invención 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 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. Estas sustancias pueden usarse solas o en una mezcla de dos o más, pero no se limitan a ello. Las fuentes de nitrógeno que pueden usarse en la presente invención pueden incluir peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz macerado, torta de soja desgrasada, y urea y compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno también pueden usarse solas o en una mezcla de dos o más, pero no se limitan a ello. Las fuentes de fósforo que pueden usarse en la presente invención pueden incluir fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico y las correspondientes sales que contienen sodio. También, el medio de cultivo puede contener además una sal metálica tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además de las sustancias descritas anteriormente, el medio puede contener factores de crecimiento esenciales tales como aminoácidos y vitaminas. Adicionalmente, el medio de cultivo puede contener precursores adecuados. Estas sustancias pueden adicionarse al medio durante el cultivo de manera continua o discontinua.

Los compuestos básicos tales como el hidróxido de sodio, el hidróxido de potasio, o el amoníaco, o los compuestos ácidos tales como el ácido fosfórico o el ácido sulfúrico pueden adicionarse al medio de cultivo de manera adecuada para ajustar el pH del medio de cultivo. Además, durante el cultivo, puede usarse un agente antiespumante tal como el éster poliglicólico del ácido graso para suprimir la formación de burbujas. Además, para mantener el medio de cultivo en un estado aeróbico, puede inyectarse oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) en el medio de cultivo. El medio de cultivo puede mantenerse típicamente a una temperatura que varía entre 20 °C y 45 °C. El proceso de cultivo del microorganismo se puede continuar hasta que se obtenga el nivel deseado de L-isoleucina. Para el propósito de la presente invención, el período de cultivo puede ser generalmente de 10-100 horas. La L-isoleucina puede liberarse en el medio de cultivo o estar contenida en las células. El método de producción de la L-isoleucina de la presente invención comprende recuperar la L-isoleucina del medio de cultivo o de las células. La recuperación de la L-isoleucina del medio de cultivo o de las células puede realizarse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, centrifugación, filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización o HPLC, pero no se limita a ello. En un ejemplo de la presente invención, el medio de cultivo se centrifugó a baja velocidad para eliminar la biomasa y el sobrenadante se separó mediante cromatografía líquida de alta resolución.

La presente divulgación describe un método para la producción de una cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* para la producción de L-isoleucina, el método que comprende seleccionar una cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* resistente a los derivados de la L-isoleucina y los derivados de la L-treonina.

La cepa parental de *Corynebacterium glutamicum* puede ser una cepa de tipo salvaje o mutante.

Específicamente, la cepa mutante puede obtenerse mediante un método de mutagénesis.

En la presente descripción, los derivados de la L-isoleucina, los derivados de la L-treonina y el método de mutagénesis son los descritos anteriormente.

El método para la producción de la cepa mutante de la presente invención puede realizarse seleccionando una cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum*, que es resistente a los derivados de la L-isoleucina y los derivados de la L-treonina y tiene la capacidad de producir L-isoleucina con un rendimiento mayor que el de las cepas convencionales.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona el uso de la cepa mutante de *Corynebacterium glutamicum* KCCM11248P para la producción de L-isoleucina.

[Modo para la invención]

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1: Selección de la cepa mutante mediante mutagénesis artificial

Para obtener una cepa mutante que tenga una capacidad mejorada para producir L-isoleucina, se indujo una mutación en un microorganismo de la siguiente manera.

Específicamente, la cepa parental de *Corynebacterium glutamicum* KFCC 11040 (Publicación de Patente coreana abierta al público núm 2000-0002407) se cultivó en un medio de activación durante 16 horas, y la cepa activada se inoculó en un medio de siembra esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. La cepa inoculada se cultivó durante 14 horas, y se recogieron 5 ml del medio de cultivo. El medio de cultivo recogido se lavó con tampón cítrico 100 mM, y luego se añadió NTG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) hasta una concentración final de 200 mg/l. A continuación, el medio de cultivo se dejó reposar durante 20 minutos y luego se lavó con tampón fosfato 100 mM. La cepa tratada con NTG se sembró en un medio mínimo y, como resultado, se determinó que la velocidad de destrucción de la misma era del 85 %. Para obtener una cepa mutante resistente a 4-tiaisoleucina (tiaile), isoleucina-hidroxamato (ileHx) y α-amino-β-hidroxivalina (AHV), la cepa tratada con NTG se sembró en un medio mínimo suplementado con

tiaile, ileHx y AHV a concentraciones finales de 1 mM, 1 mg/ml y 25 mg/ml, respectivamente. A continuación, la cepa se cultivó a 30 °C durante 5 días, obteniendo de este modo una cepa mutante resistente a tiaile, ileHx y AHV.

La cepa mutante obtenida se denominó "*Corynebacterium glutamicum*, KCJI-38" y se depositó en el Centro de cultivo de microorganismos coreano, el 9 de enero de 2012 con el número de acceso KCCM11248P.

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

Medio de activación

Extracto de carne 1 %, polipeptona 1 %, cloruro de sodio 0,5 %, extracto de levadura 1 %, agar 2 %, pH 7,2.

Medio de siembra

Glucosa 5 %, bactopeptona 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 potasio monobásico 0,1 %, urea 0,1 %, tiamina 0,001 %, biotina 200 µg/L, agar 2 %, pH 7,2.

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

Para examinar la productividad de L-isoleucina de la cepa mutante *Corynebacterium glutamicum* KCJI-38 (KCCM11248P) resistente a tiaile, ileHx y AHV, obtenida en el Ejemplo 1, la cepa se cultivó de la siguiente manera.

Cada una de la cepa parental y la cepa mutante se inoculó en un matraz con deflectores de esquinas de 250 ml que contenía 25 ml de un medio de producción, y luego se cultivó a 30 °C durante 60 horas con agitación a 200 rpm, produciendo de este modo la L-isoleucina.

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

Medio de producción

Glucosa 10 %, extracto de levadura 0,2 %, sulfato de amonio 1,6 %, fosfato de calcio monobásico 0,1 %, sulfato de magnesio heptahidratado 0,1 %, sulfato de hierro heptahidratado 10 mg/l, sulfato de manganeso monohidrato 10 mg/l, biotina 200 µg/l, pH 7,2.

Una vez finalizado el cultivo, se analizó la producción de L-isoleucina mediante cromatografía líquida de alta resolución. La concentración de L-isoleucina en el producto del cultivo de cada una de las cepas se muestra en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1: Comparación de la productividad de L-isoleucina entre la cepa parental y KCJI-38 (KCCM11248P)

	Corynebacterium glutamicum KFCC 11040 (cepa parental)	*Corynebacterium glutamicum* KCJI-38 (cepa mutante)
Concentración de L-isoleucina (g/l)	0,1	1,3

Como puede verse en la Tabla 1 anterior, la cepa parental *Corynebacterium glutamicum* KFCC 11040 (Publicación de Patente coreana abierta al público núm 2000-0002407) produjo L-isoleucina a una concentración de 0,1 g/l, mientras que la cepa mutante *Corynebacterium glutamicum* KCJI-38 (KCCM11248P) produjo L-isoleucina a una concentración de 1,3 g/l, lo que sugiere que la productividad de L-isoleucina de la cepa mutante fue aproximadamente 13 veces mayor que la de la cepa parental.

Los resultados descritos anteriormente indican que la cepa mutante resistente a los derivados de la L-isoleucina y los derivados de la L-treonina no sufre inhibición por retroalimentación por la L-isoleucina y puede suministrarse suficientemente con L-treonina como un precursor de la L-isoleucina, lo que sugiere que la cepa mutante puede producir L-isoleucina con alta eficiencia y alto rendimiento.

REIVINDICACIONES

1. La cepa mutante KCCM11248P de *Corynebacterium glutamicum* para la producción de L-isoleucina.

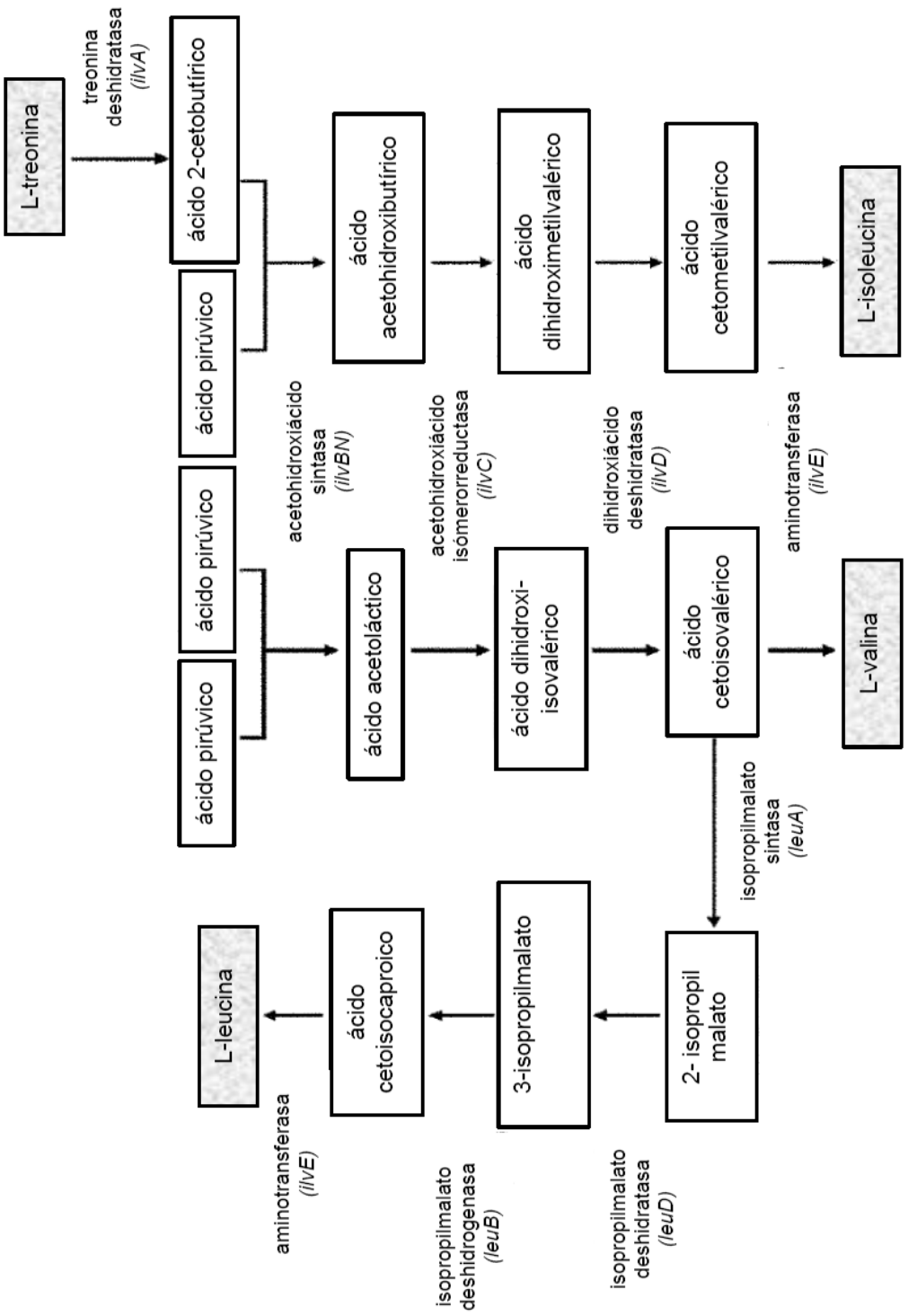
2. La cepa mutante KCCM11248P de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la cepa mutante es resistente a la retroalimentación por 4-tiaisoleucina (tiaile), isoleucina-hidroxamato (ileHx) y α-amino-β-hidroxinorvalina (AHV).

3. Un método para la producción de L-isoleucina que comprende cultivar la cepa mutante KCCM11248P de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además recuperar la L-isoleucina del medio de cultivo de la cepa mutante KCCM11248P.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el cultivo se realiza a una temperatura de 20-45 °C en condiciones aeróbicas durante 10-160 horas.

[Figura 1]


L-treonina
treonina deshidratasa (ilvA)
ácido 2-cetobutírico
ácido pirúvico
ácido pirúvico
ácido pirúvico
ácido acetoláctico
acetohidroxiácido sintasa (ilvBN)
ácido acetohidroxibutírico
acetohidroxiácido isomerorreductasa (ilvC)
ácido dihidroxi-isovalérico
ácido dihidroximetilvalérico
dihidroxiácido deshidratasa (ilvD)
ácido cetoisovalérico
ácido cetometilvalérico
aminotransferasa (ilvE)
L-isoleucina
L-valina
isopropilmalato sintasa (leuA)
2- isopropil malato
isopropilmalato deshidratasa (leuD)
3-isopropilmalato
isopropilmalato deshidrogenasa (leuB)
ácido cetoisocaproico
aminotransferasa (ilvE)
L-leucina