

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 099**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12P 19/32** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2006 E 06702908 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 1844135**

54 Título: **Cepa de Escherichia capaz de convertir el XMP en GMP y de mantener el estado inactivado del gen o de los genes asociados a la degradación del GMP y procedimientos para utilizarla**

30 Prioridad:

**21.01.2005 KR 20050005863**

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

**17.02.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PARK, YOUNG-HOON ;  
KIM, HYOUNG-SUK ;  
LEE, JIN-NAM ;  
OH, KI-HOON ;  
KIM, JEONG-HWAN ;  
OH, YOON-SUK ;  
SIM, JAE-ICK y  
CHOI, KYUNG-OH**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 443 099 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

Cepa de *Escherichia* capaz de convertir el XMP en GMP y de mantener el estado inactivado del gen o de los genes asociados a la degradación del GMP y procedimientos para utilizarla

## Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una cepa de *Escherichia* capaz de convertir el ácido 5'-xantílico (XMP) en el ácido 5'-guanílico (GMP) y de mantener el estado inactivado de un gen o genes asociados a la degradación del GMP, y procedimientos para utilizarla.

## Antecedentes de la técnica

- 10 El ácido 5'-guanílico (GMP) se puede producir mediante la degradación enzimática microbiana o química del ARN de levadura, la fermentación directa para producir directamente nucleótidos mediante cepas mutantes cultivadas en medios que contienen un azúcar, una fuente de nitrógeno y una fuente de fosfato, o un procedimiento de combinación que incluye la síntesis fermentativa de intermedios de los nucleótidos y la conversión química o enzimática de los intermedios de los nucleótidos en nucleótidos. Debido a sus ventajas económicas, en los últimos años se utiliza mucho en la industria un procedimiento de combinación que combina la síntesis fermentativa o  
15 química y la conversión enzimática.

- La producción de GMP mediante el procedimiento de combinación consiste en la síntesis fermentativa del ácido 5'-xantílico (XMP) y la conversión enzimática del XMP en GMP. En la actualidad se utilizan dos tipos de cepas microbianas. Es decir, se utiliza una cepa que produce XMP para la síntesis fermentativa y, para la conversión enzimática, se utiliza una cepa microbiana capaz de inducir una sobreexpresión continua de un gen que codifica la actividad XMP aminasa. En este caso, la tasa de supervivencia de la cepa microbiana utilizada para la conversión enzimática se reduce considerablemente durante un periodo de cultivo posterior respecto a durante un periodo de cultivo inicial, con lo que disminuye la producción de GMP. Además, se sabe que el gen *guaA* que codifica la XMP aminasa es mortal para las células hospedadoras y, así pues, la sobreexpresión continua de la XMP aminasa dificulta el crecimiento de la cepa microbiana utilizada en la conversión enzimática durante el periodo de cultivo  
20 posterior. Además, se sabe que se expresa un gen interno responsable de la degradación del GMP en la cepa microbiana utilizada para la conversión enzimática, lo que facilita la degradación del GMP.

- En vista de los problemas anteriores, los presentes inventores desarrollaron la cepa de *Escherichia sp.* GPD1114 (n.º de acceso KCCM-10543) que incluye un gen que codifica la XMP aminasa capaz de expresar la XMP aminasa de acuerdo con el estado de crecimiento celular y la inactivación de un gen *glnL* interno. Además, los presentes  
30 inventores desarrollaron la cepa de *Escherichia sp.* GPU1114 (n.º de acceso KCCM-10536) a partir de *Escherichia sp.* GPD1114, en la que el gen *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa está inactivado para eliminar la degradación del GMP.

- No obstante, ya que *Escherichia sp.* GPU1114 todavía contiene genes internos relacionados con la degradación del GMP, excepto el gen *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa, el GMP se puede degradar en guanosina o guanina. Por  
35 lo tanto, en la técnica se necesita una cepa microbiana con inactivación simultánea de todos los genes asociados a la degradación del GMP.

- La patente europea EP 1170370 describe un procedimiento para producir un nucleótido por fermentación. El éster 5'-fosfato de nucleósido se produce con el cultivo de una bacteria que pertenece al género *Escherichia*, que tiene la capacidad de producir el éster 5'-fosfato de nucleósido, en un medio para producir y acumular el éster 5'-fosfato de nucleósido en el medio y recoger el éster 5'-fosfato de nucleósido del medio. El gen *ushA* y los genes *aphA* de la  
40 bacteria no suelen estar funcionales.

- La patente europea EP 1004663 describe un proceso para producir nucleósidos de purina por fermentación. El proceso comprende cruzar y cultivar microorganismos que tienen un gen que codifica una enzima, en donde la inhibición por retroalimentación se ha mitigado sustancialmente mediante una serie de modificaciones en el  
45 microorganismo. Estas modificaciones incluyen la sustitución de uno o dos restos aminoácidos en la fosforribosilpirofosfato (PRPP) amidotransferasa codificada por el gen *purF* de *Escherichia coli*. El microorganismo también comprende la inactivación de un gen que codifica una proteína que es el represor del sistema de biosíntesis de los nucleótidos de purina codificado por *purR*, la inactivación de un gen que codifica una enzima que es la fosforilasa de nucleósidos de purina codificada por *deoD*, la inactivación de un gen que codifica una enzima que es la succinil-AMP sintasa codificada por *purA*, la inactivación de un gen que codifica una enzima que es la 6-  
50 fosfogluconato deshidratasa codificada por *edd* y la inactivación de un gen que codifica una enzima que es la fosfoglucona isomerasa codificada por *pgi*, o similares.

**Descripción de la invención**

## Problema técnico

La presente invención da a conocer una cepa microbiana capaz de convertir el ácido 5'-xantílico (XMP) en ácido 5'-guanílico (GMP) y de mantener el estado inactivado de un gen o genes internos relacionados con la degradación del GMP.

La presente invención también da a conocer un procedimiento para acumular la GMP sintetasa a una concentración elevada en un medio de cultivo gracias al uso de la cepa microbiana.

La presente invención también da a conocer un procedimiento para producir GMP, 5'-difosfato de guanosina (GDP), o 5'-trifosfato de guanosina (GTP) gracias al uso de la cepa microbiana.

## 10 Solución técnica

La presente invención da a conocer una cepa del género *Escherichia* que procede de *Escherichia sp.* GPU1114 (n.º de acceso KCCM-10536) e incluye un gen *deoD* inactivado, un gen *aphA* inactivado y un gen *appA* inactivado.

La cepa madre, *Escherichia sp.* GPU1114 (n.º de acceso KCCM-10536) es una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) en la que está inactivado el gen *glnL*, está insertado por transformación el gen *guaA* que codifica la aminasa del ácido 5'-xantílico (XMP), y está inactivado un gen *ushA* interno que codifica la 5'-nucleotidasa. En la *Escherichia sp.* GPU1114 (n.º de acceso KCCM-10536) hay una elevada tasa de conversión de XMP en ácido 5'-guanílico (GMP) gracias a la expresión del gen *guaA*, y como la actividad de degradación del GMP es baja debido a que no se expresa el gen *ushA*, se incrementa la productividad del GMP.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, el gen *deoD* no está limitado siempre y cuando sea un gen que codifica la actividad de la fosforilasa de nucleósidos de purina. Por ejemplo, el gen *deoD* puede ser el de n.º de acceso del NCBI NP\_418801, pero la presente invención no se limita a éste. Así pues, el gen *deoD* significa que se abarca un gen de tipo silvestre y un gen mutante natural o artificial de *deoD*.

También se describe en la presente memoria una cepa de *Escherichia* que es *E. coli* DKO-ud (n.º de acceso KCCM-10633).

25 También se describe en la presente memoria una cepa del género *Escherichia* que procede de *Escherichia sp.* GPU1114 (n.º de acceso KCCM-10536) y que incluye los genes *deoD* y *aphA* inactivados.

El gen *aphA* no está limitado siempre y cuando sea un gen que codifique la actividad de fosfatasa ácida. Por ejemplo, el gen *aphA* puede ser el de n.º de acceso del NCBI NP\_418479, pero la presente invención no se limita a éste. Así pues, el gen *aphA* significa que se abarca un gen de tipo silvestre y un gen mutante artificial o natural de *aphA*.

También se describe en la presente memoria una cepa de *Escherichia* que es *E. coli* TKO-udh (n.º de acceso KCCM-10631).

La presente invención también da a conocer una cepa del género *Escherichia* que procede de *Escherichia sp.* GPU1114 (n.º de acceso KCCM-10536) y que incluye los genes *deoD*, *aphA* y *appA* inactivados.

35 El gen *appA* no está limitado siempre y cuando sea un gen que codifique la actividad de (poli)fosfatasa ácida. Por ejemplo, el gen *appA* puede ser el de n.º de acceso del NCBI NP\_415500, pero la presente invención no se limita a éste. Así pues, el gen *appA* significa que se abarca un gen del tipo silvestre y un gen mutante artificial o natural de *appA*.

La cepa de *Escherichia* de la presente invención puede ser *E. coli* QKO-udhp (n.º de acceso KCCM-10632).

40 La presente invención también da a conocer una cepa del género *Escherichia* que procede de *Escherichia sp.* GPU1114 (n.º de acceso KCCM-10536) y que incluye los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt* inactivados.

El gen *hprt* no está limitado siempre y cuando sea un gen que codifique la hipoxantina fosforirribosiltransferasa. Por ejemplo, el gen *hprt* puede ser el de n.º de acceso del NCBI NP\_414667, pero la presente invención no se limita a éste. Así pues, el gen *hprt* significa que se abarca un gen de tipo silvestre y un gen mutante artificial o natural de *hprt*.

La siguientes secuencias se describen en la técnica anterior.

N.º de acceso del NCBI NP\_418801

Met Ala Thr Pro His Ile Asn Ala Glu Met Gly Asp Phe Ala Asp Val Val Leu Met Pro  
 Gly Asp Pro Leu Arg Ala Lys Tyr Ile Ala Glu Thr Phe Leu Glu Asp Ala Arg Glu Val  
 Asn Asn Val Arg Gly Met Leu Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Arg Lys Ile Ser Val  
 Met Gly His Gly Met Gly Ile Pro Ser Cys Ser Ile Tyr Thr Lys Glu Leu Ile Thr Asp Phe  
 Gly Val Lys Lys Ile Ile Arg Val Gly Ser Cys Gly Ala Val Leu Pro His Val Lys Leu Arg  
 Asp Val Val Ile Gly Met Gly Ala Cys Thr Asp Ser Lys Val Asn Arg Ile Arg Phe Lys  
 Asp His Asp Phe Ala Ala Ile Ala Asp Phe Asp Met Val Arg Asn Ala Val Asp Ala Ala  
 Lys Ala Leu Gly Ile Asp Ala Arg Val Gly Asn Leu Phe Ser Ala Asp Leu Phe Tyr Ser  
 Pro Asp Gly Glu Met Phe Asp Val Met Glu Lys Tyr Gly Ile Leu Gly Val Glu Met Glu  
 Ala Ala Gly Ile Tyr Gly Val Ala Ala Glu Phe Gly Ala Lys Ala Leu Thr Ile Cys Thr Val  
 Ser Asp His Ile Arg Thr His Glu Gln Thr Thr Ala Ala Glu Arg Gln Thr Thr Phe Asn Asp  
 Met Ile Lys Ile Ala Leu Glu Ser Val Leu Leu Gly Asp Lys Glu

N.º de acceso del NCBI NP\_418479,

Met Arg Lys Ile Thr Gln Ala Ile Ser Ala Val Cys Leu Leu Phe Ala Leu Asn Ser Ser Ala  
 Val Ala Leu Ala Ser Ser Pro Ser Pro Leu Asn Pro Gly Thr Asn Val Ala Arg Leu Ala  
 Glu Gln Ala Pro Ile His Trp Val Ser Val Ala Gln Ile Glu Asn Ser Leu Ala Gly Arg Pro  
 Pro Met Ala Val Gly Phe Asp Ile Asp Asp Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro Gly Phe Trp  
 Arg Gly Lys Lys Thr Phe Ser Pro Glu Ser Glu Asp Tyr Leu Lys Asn Pro Val Phe Trp  
 Glu Lys Met Asn Asn Gly Trp Asp Glu Phe Ser Ile Pro Lys Glu Val Ala Arg Gln Leu  
 Ile Asp Met His Val Arg Arg Gly Asp Ala Ile Phe Phe Val Thr Gly Arg Ser Pro Thr Lys  
 Thr Glu Thr Val Ser Lys Thr Leu Ala Asp Asn Phe His Ile Pro Ala Thr Asn Met Asn  
 Pro Val Ile Phe Ala Gly Asp Lys Pro Gly Gln Asn Thr Lys Ser Gln Trp Leu Gln Asp  
 Lys Asn Ile Arg Ile Phe Tyr Gly Asp Ser Asp Asn Asp Ile Thr Ala Ala Arg Asp Val Gly  
 Ala Arg Gly Ile Arg Ile Leu Arg Ala Ser Asn Ser Thr Tyr Lys Pro Leu Pro Gln Ala Gly  
 Ala Phe Gly Glu Glu Val Ile Val Asn Ser Glu Tyr

N.º de acceso del NCBI NP\_415500,

Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr Pro Gln Ser Ala Phe  
 Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg  
 Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp  
 Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr  
 Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly  
 Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala  
 Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro  
 Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala  
 Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg  
 Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln  
 Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Asn  
 Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln  
 Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr  
 Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg  
 Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln  
 Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn  
 Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn  
 Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln  
 Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu  
 Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn  
 Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala  
 Cys Ser Leu

5

N.º de acceso del NCBI NP\_414667,

**Met Lys His Thr Val Glu Val Met Ile Pro Glu Ala Glu Ile Lys Ala Arg Ile Ala Glu Leu  
Gly Arg Gln Ile Thr Glu Arg Tyr Lys Asp Ser Gly Ser Asp Met Val Leu Val Gly Leu  
Leu Arg Gly Ser Phe Met Phe Met Ala Asp Leu Cys Arg Glu Val Gln Val Ser His Glu  
Val Asp Phe Met Thr Ala Ser Ser Tyr Gly Ser Gly Met Ser Thr Thr Arg Asp Val Lys  
Ile Leu Lys Asp Leu Asp Glu Asp Ile Arg Gly Lys Asp Val Leu Ile Val Glu Asp Ile Ile  
Asp Ser Gly Asn Thr Leu Ser Lys Val Arg Glu Ile Leu Ser Leu Arg Glu Pro Lys Ser  
Leu Ala Ile Cys Thr Leu Leu Asp Lys Pro Ser Arg Arg Glu Val Asn Val Pro Val Glu  
Phe Ile Gly Phe Ser Ile Pro Asp Glu Phe Val Val Gly Tyr Gly Ile Asp Tyr Ala Gln Arg  
Tyr Arg His Leu Pro Tyr Ile Gly Lys Val Ile Leu Leu Asp Glu**

La cepa de *Escherichia* de la presente invención puede ser *E. coli* QIKO (n.º de acceso KCCM-10630).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «inactivación» indica que no se expresa un determinado gen, o incluso si se llega a expresar, el gen no produce un producto génico funcional. La «inactivación»  
5 abarca el significado de que un determinado gen está completamente inactivado o no se expresa sustancialmente debido a que su nivel de expresión es significativamente bajo.

En las cepas de *Escherichia* de la presente invención, los genes inactivados se pueden obtener mediante alguno de los procedimientos conocidos en la técnica, p. ej., mutagénesis específica del sitio o recombinación homóloga, pero la presente invención no se limita a estos. Se prefiere la recombinación homóloga. La inactivación de un gen se  
10 puede inducir mediante delección, sustitución, inversión o una combinación de las mismas, pero la presente invención no se limita a éstas.

La inactivación génica mediante recombinación homóloga incluye la construcción de casetes génicos inactivados que llevan insertado un ADN foráneo dentro del fragmento del ADN genómico deseado, la inserción de los casetes  
15 en cepas microbianas para inducir la recombinación homóloga entre el gen interno de la célula microbiana y el casete introducido, y la selección de las cepas recombinantes que contienen genes inactivados. Por comodidad, los ADN foráneos clonados dentro de los ADN deseados pueden contener un marcador de selección, p. ej., un gen de resistencia a antibióticos. En una placa de agar que contiene antibiótico se puede seleccionar con facilidad cada inactivación del gen deseado por inserción de la casete que contiene un gen de resistencia a antibióticos. El que  
20 haya ocurrido la recombinación se puede confirmar mediante transferencia Southern, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), etc.

En el caso de utilizar casetes inactivados que contienen genes de resistencia a antibióticos durante la preparación de las cepas de *Escherichia* de la presente invención, es preferible retirar los genes de resistencia a antibióticos una vez que se termina la selección. Por ejemplo, la retirada de los genes de resistencia a antibióticos de las cepas  
25 seleccionadas incluye la transformación de cada cepa seleccionada con un plásmido que expresa el gen capaz de reconocer secuencias nucleotídicas específicas de los casetes inactivados y de retirar el gen de resistencia a antibióticos; y la retirada del gen de resistencia a antibióticos de todos los transformantes. Los transformantes resultantes sin el gen de resistencia a antibióticos se pueden seleccionar en una placa de agar que contiene ampicilina. La retirada del gen de resistencia a antibióticos que hay en el ADN deseado se puede confirmar mediante transferencia de colonias, con el uso de mondadientes, a una placa de agar que contiene un antibiótico adecuado y  
30 el crecimiento de las colonias sobre la placa de agar.

Las cepas de *Escherichia* de la presente invención se pueden preparar con los procedimientos ilustrativos que se describen a continuación.

El ADN genómico se extrae de *Escherichia sp.* GPU1114 (KCCM-10536), y los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt* se amplifican por PCR con el ADN genómico como plantilla. Los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt* se clonan en  
35 plásmidos u otros vectores para construir vectores recombinantes (p. ej., los plásmidos recombinantes pDEO, pAPH, pAPP, pHPRT). Las células hospedadoras tales como las células de *E. coli* se transforman con los vectores recombinantes. Después de cultivar los transformantes, los vectores recombinantes que contienen los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt* se extraen de las células transformadas. En los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt* de los vectores recombinantes se inserta un fragmento del gen de resistencia a antibióticos que contiene loxp para construir los  
40 vectores recombinantes que contienen los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt* inactivados (p. ej., pTdeoD:loxpKAT, pTaphA:loxpKAT, pTappA:loxpKAT, pThprt:loxpCAT). Los vectores recombinantes se introducen en células hospedadoras y se cultivan. Después del cultivo, los vectores recombinantes se extraen de los transformantes y se digieren con las enzimas de restricción adecuadas para obtener los fragmentos de los casetes que llevan inactivados los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt* (p. ej., ΔdeoD:loxpKAT, Δaph:loxpKAT, Δapp:loxpKAT,  
45 Δhprt:loxpCAT). Primero, ΔdeoD:loxpKAT se introduce por electroporación, etc., en la cepa GPU1114 que produce GMP, y la cepa GPU1114 que produce GMP transformada se mantiene en presión selectiva con antibiótico para permitir que se produzca la recombinación entre un fragmento del gen *deoD* que contiene el marcador antibiótico y un gen *deoD* de tipo silvestre cromosómico, con lo que se obtienen cepas recombinantes que mantienen el estado inactivado del gen *deoD* incluso cuando se sigan dividiendo. Para inactivar también el gen *aphA* en las cepas

recombinantes seleccionadas, hay que eliminar el marcador antibiótico. Para esto, en las cepas recombinantes seleccionadas se introduce por electroporación, etc., el vector recombinante que expresa el gen que reconoce los sitios loxp en los genes de resistencia a antibióticos y que retira los genes de resistencia a antibióticos. La selección de los transformantes resultantes se realiza en una placa de agar que contiene ampicilina gracias a la resistencia a antibióticos adquirida. La retirada del gen de resistencia a antibióticos desde el ADN diana se puede confirmar mediante la transferencia de colonias con mondadientes a una placa de agar que contiene un antibiótico adecuado y el crecimiento de las colonias en la placa de agar. Los transformantes resultantes se mantienen con presión selectiva de antibiótico para permitir que se produzca la recombinación entre un fragmento del gen *deoD* que contiene una parte del marcador antibiótico y un gen *deoD* de tipo silvestre cromosómico, con lo que se obtienen las cepas transformadas (p. ej., *E. coli* DKO-ud) que mantienen en el estado inactivado los genes *ushA* y *deoD* incluso cuando se siguen dividiendo. Cuando el procedimiento descrito más arriba se aplica secuencialmente a los genes *aphA*, *appA* y *hprt*, se pueden obtener las cepas transformadas con inactivación acumulativa de los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt*.

La presente invención también da a conocer un procedimiento para acumular la GMP sintetasa en las células, que incluye el cultivo de una cepa de *Escherichia* de la presente invención.

La presente invención también da a conocer un procedimiento para producir GMP, 5'-difosfato de guanosina (GDP) o 5'-trifosfato de guanosina (GTP), que incluye el cultivo de una cepa de *Escherichia* de la presente invención.

En los procedimientos de la presente invención, el cultivo de la cepa de *Escherichia* de la presente invención se puede realizar en las condiciones de cultivo conocidas por todos, p. ej., en un medio de cultivo que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, un aminoácido, un compuesto inorgánico, etc., mientras que se ajusta la temperatura y el pH del medio de cultivo.

La fuente de carbono puede ser un glúcido tal como glucosa, fructosa o melazas esterilizadas (a saber, melazas convertidas en azúcar reductor) y la fuente de nitrógeno puede ser una fuente de nitrógeno inorgánico tal como amoníaco, cloruro de amonio y sulfato de amonio, y una fuente de nitrógeno tal como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, licor de maíz fermentado, hidrolizado de caseína, carne de pescado o su extracto, soja desgrasada o su extracto. El compuesto inorgánico puede ser hidrogenofosfato de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sulfato de manganeso, carbonato de calcio, etc. Cuando se necesita, el medio de cultivo se puede complementar con vitaminas, bases, etc. El cultivo se puede realizar en condiciones aerobias, p. ej., mediante sacudidas o agitación aerobia, preferiblemente a una temperatura de 30 a 40 °C. El pH del medio de cultivo se puede mantener casi neutro. El cultivo se puede realizar durante 1 a 2 días para que se acumulen en el medio de cultivo los productos que tienen actividad XMP aminasa.

En la presente invención se puede producir GMP por conversión del XMP en GMP con la GMP sintetasa producida por el cultivo de una cepa de *Escherichia* de acuerdo con la presente invención. La conversión del XMP en GMP se puede conseguir mediante la adición, a un medio de cultivo, de un material (p. ej., xileno) que incrementa la permeabilidad de la membrana celular para el XMP para que el XMP se introduzca en una cepa productora de GMP. Se conoce bien en la técnica el material que incrementa la permeabilidad de la membrana celular al XMP, p. ej., un material hidrófobo (p. ej., xileno, tolueno, benceno, acetato de etilo), un tensioactivo (p. ej., polioxietileneestearilamina [p. ej., Nymeen S-215, Nihon Yushi Co.], un tensioactivo catiónico tal como el bromuro de cetiltrimetilamonio, Cation FB o Cation F2-40E, o un tensioactivo aniónico tal como sulfato de oleilamida y sodio, Newrex TAB y Rapizole 80), un ion metálico (p. ej., ion de calcio, ion de magnesio), pero la presente invención no se limita a los ejemplos arriba ilustrados. La cantidad de material que incrementa la permeabilidad de la membrana celular al XMP varía de acuerdo con el tipo de material, y los expertos en la técnica lo pueden ajustar adecuadamente. Por ejemplo, se puede utilizar el xileno en una cantidad de 0,5 al 1% en peso en función del peso total de un medio de cultivo. Además, se pueden producir GDP o GTP mediante la fosforilación química o enzimática del GMP conocida por todos.

### Descripción de los dibujos

Las características y ventajas anteriores y otras más de la presente invención serán más evidentes gracias a la descripción detallada de realizaciones de ejemplo de las mismas con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La figura 1A es un esquema de la construcción de un plásmido recombinante pDEO del ejemplo 1 de la presente invención;

La figura 1B es un esquema de la construcción de un plásmido recombinante pTdeoD:loxpKAT del ejemplo 1 de la presente invención;

La figura 2A es un esquema de la construcción de un plásmido recombinante pAPH del ejemplo 2 de la presente invención;

La figura 2B es un esquema de la construcción de un plásmido recombinante pTaphA:loxpKAT del ejemplo 2 de la presente invención;

La figura 3A es un esquema de la construcción de un plásmido recombinante pAPP del ejemplo 3 de la presente invención;

- 5 La figura 3B es un esquema de la construcción de un plásmido recombinante pTappA:loxpKAT del ejemplo 3 de la presente invención;

La figura 4A es un esquema de la construcción de un plásmido recombinante pHPRT del ejemplo 4 de la presente invención; y

- 10 La figura 4B es un esquema de la construcción de un plásmido recombinante pThprt:loxpCAT del ejemplo 4 de la presente invención.

### Mejor modo

De aquí en adelante, la presente invención se describirá más específicamente con respecto a los ejemplos que vienen a continuación. Los ejemplos siguientes tienen un propósito ilustrativo y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

### 15 Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de plásmido recombinante e inactivación del gen *deoD* mediante el plásmido recombinante

- Se amplificó por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 720 pb que contiene el marco abierto de lectura (ORF) del gen *deoD* utilizando el ADN genómico de *E. coli* GPU1114 (acceso n.º KCCM-10536) como plantilla y los oligonucleótidos que se presentan en las SEQ ID n.º 1 y 2 como cebadores. La PCR se realizó a 94 °C durante 30 s para la desnaturalización, 50 °C durante 30 s para la hibridación, y 68 °C durante 1 min y 30 s para la extensión durante 35 ciclos.

- Después de fraccionar por tamaño los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,1%, se purificó la banda que contiene el fragmento de ADN de 720 pb. El fragmento de ADN se ligó en el sitio *HindIII* del vector de clonación pUC18 (Promega Co.) a 16 °C durante una noche (véase la figura 1A). El plásmido recombinante resultante pDEO se introdujo por transformación en *E. coli* DH5  $\alpha$ , los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con ampicilina (50 mg/l) y se cultivaron a 37 °C durante una noche.

- Las colonias que crecieron en el medio sólido se inocularon mediante asas de siembra con aguja para transferencia en 3 ml del medio líquido con ampicilina y se cultivaron durante una noche. A continuación, se aísla el ADN plasmídico con un kit de miniprep de QIAGEN (QIAGEN) y se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* para identificar la presencia del fragmento del gen *deoD* clonado. El plásmido pDEO identificado se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, y la banda de aproximadamente 720 pb se resolvió en un gel de agarosa al 0,8%. Mientras tanto, el plásmido pUG6 (U. Guldenre et al., «A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast». *Nucleic Acid Research* 24 (13), 1996, págs. 2519-2524) se digirió con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HinCI* para obtener el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina que contiene el sitio de loxp (de aproximadamente 1,7 kb). El fragmento de ADN contenido en la banda se ligó con el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina que contiene el sitio de loxp mediante ligación de extremos romos para obtener el plásmido recombinante pTdeoD::loxpKAT (de aproximadamente 4,5 kb) (véase la figura 1B).

- Después de introducir por transformación el plásmido recombinante pTdeoD::loxpKAT en *E. coli* DH5  $\alpha$ , los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con ampicilina y kanamicina (50 mg/l de cada uno) y se cultivaron a 37 °C durante una noche. Las colonias que crecieron en el medio sólido se inocularon mediante asas de siembra con aguja para transferencia en 3 ml del medio líquido con ampicilina y kanamicina, y se cultivaron durante una noche. A continuación, el ADN plasmídico se extrajo con un kit de miniprep QIAGEN (QIAGEN). Se amplificó por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 2,3 kb que contiene el ORF del gen *deoD* y los sitios de loxpKAT utilizando el ADN plasmídico de plantilla y los oligonucleótidos que se presentan en las SEQ ID n.º 1 y 2 como cebadores. La PCR se realizó a 94 °C durante 1 min para la desnaturalización, 55 °C durante 1 min para la hibridación, y 68 °C durante 1 min para la extensión durante 35 ciclos.

El fragmento de ADN obtenido  $\Delta$ deoD::loxpKAT se electroporó en *E. coli* GPU1114 que contenía un gen *guaA* foráneo, y los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con kanamicina para seleccionar las colonias.

- 50 Para retirar el marcador antibiótico de las cepas recombinantes de las colonias seleccionadas, se introdujo por transformación el plásmido pCP20 en las cepas recombinantes de las colonias seleccionadas, y los transformantes resultantes se extendieron en medio sólido con ampicilina (50 mg/l) y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Las

colonias que crecieron en el medio sólido se picaron con un mondadientes a medio sólido con ampicilina, medio sólido con kanamicina, y medio sólido sin antibiótico, y se cultivaron a 43 ° C durante una noche. Se recogieron las colonias que crecieron sólo en el medio sólido sin antibiótico. Las colonias se denominaron *E. coli* DKO-ud y se depositaron en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (KCCM, por su nombre en inglés) el 30 de noviembre de 2004 (n.º de acceso KCCM-10633).

Ejemplo 2: Construcción de plásmido recombinante e inactivación del gen *aphA* mediante el plásmido recombinante

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 714 pb que contiene el ORF del gen *aphA* utilizando el ADN genómico de *E. coli* DKO-ud obtenido en el ejemplo 1 como plantilla y los oligonucleótidos que se presentan en las SEQ ID n.º 3 y 4 como cebadores. La PCR se realizó a 94 ° C durante 30 s para la desnaturalización, 55 ° C durante 30 s para la hibridación, y 68 ° C durante 1 min y 30 s para la extensión durante 35 ciclos.

Después de fraccionar por tamaño los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,1%, se purificó la banda que contiene el fragmento de ADN de 714 pb. Los fragmentos de ADN se ligaron en vector de clonación pGEM-T-easy (Promega Co.) a 16 ° C durante una noche (véase la figura 2A). El plásmido recombinante resultante pAPH se introdujo por transformación en *E. coli* DH5  $\alpha$ , los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con ampicilina (50 mg/l) y se cultivaron a 37 ° C durante una noche.

Las colonias que crecieron en el medio sólido se inocularon mediante asas de siembra con aguja para transferencia en 3 ml del medio líquido con ampicilina y se cultivaron durante una noche. A continuación se aisló el ADN plasmídico con un kit de miniprep de QIAGEN (QIAGEN) y se digirió con la enzima de restricción *ClaI* para identificar la presencia del fragmento del gen *aphA* clonado. El plásmido pAPH identificado se digirió con la enzima de restricción *ClaI* y la banda de aproximadamente 3,7 kb se resolvió en un gel de agarosa al 0,8%. Al fragmento de ADN contenido en las bandas se le hicieron romos los extremos con la polimerasa de T4. Mientras tanto, el plásmido pUG6 se digirió con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII* para obtener el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina que contiene el sitio de *loxP* (de aproximadamente 1,7 kb). El fragmento de ADN con extremos romos se ligó con el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina que contiene el sitio de *loxP* mediante ligación de extremos romos para obtener el plásmido recombinante pTaphA::loxpKAT (de aproximadamente 5,4 kb) (véase la figura 2B).

Después de introducir por transformación el plásmido recombinante pTaphA::loxpKAT en *E. coli* DH5  $\alpha$ , los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con ampicilina y kanamicina (50 mg/l de cada una) y se cultivaron a 37 ° C durante una noche. Las colonias que crecieron en el medio sólido se inocularon mediante asas de siembra con aguja para transferencia en 3 ml del medio líquido con ampicilina y kanamicina, y se cultivaron durante una noche. A continuación, el ADN plasmídico se extrajo con un kit de miniprep QIAGEN (QIAGEN). Se amplificó por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 2,4 kb que contienen el ORF del gen *aphA* y los sitios de *loxpKAT* utilizando el ADN plasmídico de plantilla y los oligonucleótidos que se presentan en las SEQ ID n.º 3 y 4 como cebadores. La PCR se realizó a 94 ° C durante 1 min para la desnaturalización, 55 ° C durante 1 min para la hibridación, y 68 ° C durante 1 min para la extensión durante 35 ciclos.

El fragmento de ADN obtenido  $\Delta$ aphA::loxpKAT se electroporó en la *E. coli* DKO-ud obtenida en el ejemplo 1, y los transformantes resultantes se extendieron en medio sólido con kanamicina para seleccionar las colonias.

Para retirar el marcador antibiótico de las cepas recombinantes de las colonias seleccionadas, se introdujo por transformación el plásmido pCP20 en las cepas recombinantes de las colonias seleccionadas, y los transformantes resultantes se extendieron en medio sólido con ampicilina (50 mg/l) y se cultivaron a 30 ° C durante una noche. Las colonias que crecieron en el medio sólido se picaron con un mondadientes a medio sólido con ampicilina, medio sólido con kanamicina, y medio sólido sin antibiótico, y se cultivaron a 43 ° C durante una noche. Se recogieron las colonias que crecieron sólo en el medio sólido sin antibiótico. Las colonias se denominaron *E. coli* TKO-udh y se depositaron en el KCCM el 30 de noviembre de 2004 (n.º de acceso KCCM-10631).

Ejemplo 3: Construcción de plásmido recombinante e inactivación del gen *appA* mediante el plásmido recombinante

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 1,3 kb que contiene el ORF del gen *appA* utilizando el ADN genómico de *E. coli* DKO-ud obtenida en el ejemplo 1 como plantilla y los oligonucleótidos que se presentan en las SEQ ID n.º 5 y 6 como cebadores. La PCR se realizó a 94 ° C durante 30 s para la desnaturalización, 55 ° C durante 30 s para la hibridación, y 68 ° C durante 1 min y 30 s para la extensión durante 35 ciclos.

Después de fraccionar por tamaño los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,1%, se purificó la banda que contenía el fragmento de ADN de 1,3 kb. El fragmento de ADN se ligó con el vector de clonación pGEM-T-easy a 16 ° C durante una noche (véase la figura 3A). El plásmido recombinante resultante pAPP se introdujo por transformación en *E. coli* DH5  $\alpha$ , los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con

ampicilina (50 mg/l) y se cultivaron a 37 °C durante una noche.

Las colonias que crecieron en el medio sólido se inocularon mediante asas de siembra con aguja para transferencia en 3 ml del medio líquido con ampicilina y se cultivaron durante una noche. A continuación, se aisló el ADN plasmídico con un kit de miniprep de QIAGEN (QIAGEN) y se digirió con la enzima de restricción *ClaI* para identificar la presencia del fragmento del gen *appA* clonado. El plásmido pAPP identificado se digirió con la enzima de restricción *BclI* y la banda de aproximadamente 4,3 kb se resolvió en un gel de agarosa al 0,8%. Al fragmento de ADN contenido en la banda se le hicieron romos los extremos con la polimerasa de T4. Mientras tanto, el plásmido pUG6 se digirió con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HincII* para obtener el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina que contiene el sitio de *loxP* (de aproximadamente 1,7 kb). El fragmento de ADN con extremos romos se ligó con el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina que contiene el sitio de *loxP* mediante ligación de extremos romos para obtener el plásmido recombinante pTappA::loxpKAT (de aproximadamente 6,3 kb) (véase la figura 3B).

Después de introducir por transformación el plásmido recombinante pTappA::loxpKAT en *E. coli* DH5  $\alpha$ , los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con ampicilina y kanamicina (50 mg/l de cada una) y se cultivaron a 37 °C durante una noche. Las colonias que crecieron en el medio sólido se inocularon mediante asas de siembra con aguja para transferencia en 3 ml del medio líquido con ampicilina y kanamicina, y se cultivaron durante una noche. A continuación, el ADN plasmídico se extrajo con un kit de miniprep QIAGEN (QIAGEN). Se amplificó por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 3,1 kb que contiene el ORF del gen *appA* y los sitios de *loxpKAT* utilizando el ADN plasmídico de plantilla y los oligonucleótidos que se presentan en las SEQ ID n.º 5 y 6 como cebadores. La PCR se realizó a 94 °C durante 1 min para la desnaturalización, 55 °C durante 1 min para la hibridación, y 68 °C durante 1 min para la extensión durante 35 ciclos.

El fragmento de ADN obtenido  $\Delta$ appA::loxpKAT se electroporó en la *E. coli* TKO-udh obtenida en el ejemplo 2, y los transformantes resultantes se extendieron en medio sólido con kanamicina para seleccionar las colonias.

Para retirar el marcador antibiótico de las cepas recombinantes de las colonias seleccionadas, se introdujo por transformación el plásmido pCP20 en las cepas recombinantes de las colonias seleccionadas, y los transformantes resultantes se extendieron en medio sólido con ampicilina (50 mg/l) y se cultivaron a 30 °C durante una noche. Las colonias que crecieron en el medio sólido se picaron con un mondadientes a medio sólido con ampicilina, medio sólido con kanamicina, y medio sólido sin antibiótico, y se cultivaron a 43 °C durante una noche. Se recogieron las colonias que crecieron sólo en el medio sólido sin antibiótico. Las colonias se denominaron QKO-udhp y se depositaron en el KCCM el 30 de noviembre de 2004 (n.º de acceso KCCM-10632).

Ejemplo 4: Construcción de plásmido recombinante e inactivación del gen *hprt* mediante el plásmido recombinante

Se amplificó por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb que contiene el ORF del gen *hprt* utilizando el ADN genómico de la *E. coli* QKO-udhp obtenida en el ejemplo 3 como plantilla y los oligonucleótidos que se presentan en las SEQ ID n.º 7 y 8 como cebadores. La PCR se realizó a 94 °C durante 30 s para la desnaturalización, 69 °C durante 30 s para la hibridación, y 72 °C durante 1 min y 30 s para la extensión durante 30 ciclos.

Después de fraccionar por tamaño los productos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,1%, se purificó la banda que contenía el fragmento de ADN de 500 pb. El fragmento de ADN se ligó con el vector de clonación pETBlue-I (Novagen Co.) a 16 °C durante una noche (véase la figura 4A). El plásmido recombinante resultante pHPRT se introdujo por transformación en *E. coli* DH5  $\alpha$ , los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con ampicilina (50 mg/l) y se cultivaron a 37 °C durante una noche.

Las colonias que crecieron en el medio sólido se inocularon mediante asas de siembra con aguja para transferencia en 3 ml de medio líquido con ampicilina y se cultivaron durante una noche. A continuación se aisló el ADN plasmídico con un kit de miniprep de QIAGEN (QIAGEN) y se digirió con la enzima de restricción *HindIII* para identificar la presencia del fragmento del gen *hprt* clonado. El plásmido pHPRT identificado se digirió con la enzima de restricción *HindIII* y las bandas de aproximadamente 4,0 kb se resolvieron en un gel de agarosa al 0,7%. Mientras tanto, el plásmido pUG6 se digirió con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HincII* para obtener el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina que contiene el sitio de *loxP* (de aproximadamente 1,7 kb). El fragmento de ADN contenido en la banda se ligó con el fragmento del gen de resistencia a la kanamicina que contiene el sitio de *loxP* mediante ligación de extremos romos para obtener el plásmido recombinante pThprt::loxpCAT (de aproximadamente 5,3 kb) (véase la figura 4B).

Después de introducir por transformación el plásmido recombinante pThprt::loxpCAT en *E. coli* DH5  $\alpha$ , los transformantes obtenidos se extendieron en medio sólido con ampicilina y kanamicina (50 mg/l de cada una) y se cultivaron a 37 °C durante una noche. Las colonias que crecieron en el medio sólido se inocularon mediante asas de siembra con aguja para transferencia en 3 ml del medio líquido con ampicilina y kanamicina, y se cultivaron durante una noche. A continuación, el ADN plasmídico se extrajo con un kit de miniprep QIAGEN (QIAGEN). Se amplificó

por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 2,1 kb que contiene el ORF del gen *hprt* y los sitios de loxpKAT utilizando el ADN plasmídico de plantilla y los oligonucleótidos que se presentan en las SEQ ID n.º 7 y 8 como cebadores. La PCR se realizó a 94 °C durante 1 min para la desnaturalización, 60 °C durante 1 min para la hibridación, y 72 °C durante 1 min para la extensión durante 30 ciclos. El fragmento de ADN obtenido  $\Delta hprt::loxpCAT$  se electroporó en la *E. coli* QKO-udhp obtenida en el ejemplo 3, y los transformantes resultantes se extendieron en medio sólido con cloranfenicol para seleccionar las colonias. Las colonias se denominaron QIKO y se depositaron en el KCCM el 30 de noviembre de 2004 (n.º de acceso KCCM-10630).

Ejemplo 5: productividad del GMP en la *E. coli* QIKO del ejemplo 4

Entre las colonias de *E. coli* QIKO seleccionadas después de la extensión en el medio sólido con cloranfenicol del ejemplo 4, se cultivaron 30 colonias en matraces Erlenmeyer que contenían el medio de producción de GMP con la composición del medio de la tabla 1 que viene a continuación, y se evaluó la producción de GMP. Primero, se cultivaron las 30 colonias individuales durante una noche a 32 °C en un incubador que contiene el medio sólido de producción de GMP. A continuación 50 ml del medio de producción de GMP se inocularon con la cantidad de células recogida en un asa de platino de cada una de las colonias aisladas y se cultivaron durante 7 horas a 37 °C con agitación a 250 rpm. Los cultivos celulares se complementaron entonces con xileno al 2% para facilitar la permeabilidad de la membrana celular a las enzimas, sustratos y productos en los cultivos celulares. Los cultivos resultantes se añadieron a las soluciones de reacción enzimática y se incubaron a 42 °C durante 15 minutos con agitación a 250 rpm. La concentración de GMP se determinó mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y los resultados se presentan en la tabla 2 que viene a continuación.

Tabla 1: composición del medio para la producción de GMP

Composición	Concentración (g/l)
Bacto-peptona	16
NaCl	5
Extracto de levadura	10
pH 7,0	

Tabla 2: resultados del análisis de los matraces con las cepas recombinantes

Cepa	GPU1114	DKO-ud	TKO-udh	QKO-udhp	QIKO
GMP (U/ml)	46	46	46	47	49

Tal y como se muestra en la tabla 2, la cepa madre GPU1114 produjo 46 U/ml de GMP, mientras la cepa recombinante QIKO, en la que estaban inactivados los genes de degradación de los nucleótidos, produjo 49 U/ml de GMP. Tal y como se observa a partir de los resultados anteriores, la cepa recombinante QIKO de la presente invención mostró una producción de GMP un 6% más alta que la cepa madre.

Ejemplo 6: comparación de la producción de subproductos del GMP (guanina y guanosina) para las cepas recombinantes en matraces Erlenmeyer

Las colonias de *E. coli* QIKO seleccionadas después de la extensión en el medio sólido que contiene cloranfenicol del ejemplo 4 se cultivaron en matraces Erlenmeyer que contenían el medio de producción de GMP con la composición del medio de la tabla 1 anterior. Los cultivos se añadieron a las soluciones de reacción para la producción de subproductos del GMP con la composición de la tabla 3 que viene a continuación y se evaluó la producción de subproductos.

Primero se cultivaron las colonias individuales de *E. coli* QIKO durante una noche a 32 °C en un incubador que contiene el medio sólido de producción de GMP. A continuación, 50 ml del medio de producción de GMP se inocularon con la cantidad de células recogidas en un asa de platino de cada una de las colonias aisladas y se cultivaron durante 7 horas a 37 °C con agitación a 250 rpm. Los cultivos celulares se complementaron entonces con

xileno al 2% para facilitar la permeabilidad de la membrana celular a las enzimas, sustratos y productos en los cultivos celulares, y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos con agitación a 250 rpm. Los cultivos resultantes se mezclaron con las soluciones de reacción para la producción de subproductos del GMP con la composición de la tabla 3 y se incubaron a 42 °C durante 8 horas con agitación a 250 rpm. Se determinó por HPLC la concentración de los dos tipos de subproductos, guanina y guanosina, en función del tiempo, y los resultados se presentan en la tabla 4 que viene a continuación.

Tabla 3: composición de la solución de reacción para la producción de subproductos del GMP

Composición	Concentración (g/l)
Tris-maleato a 800 mM	24,20
MgSO <sub>4</sub>	4,92
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,60
XMP	15,65
GMP	11,54
pH 7,0	

Tabla 4: resultados del análisis de producción de subproductos para las cepas recombinantes

Cepa	GPU1114	DKO-ud	TKO-udh	QKO-udhp	QIKO
Degradación de GMP (mmol)	2,54	2,11	2,00	1,70	1,37
Degradación de GMP (%)	100	83	77	67	53

10

Tal y como se muestra en la tabla 4, la concentración de GMP degradado en la cepa madre GPU1114 fue de 2,54 mmol, mientras que la concentración de GMP degradado en la cepa recombinante QIKO, en la que los genes de degradación de los nucleótidos estaban inactivados, fue 1,37 mmol. Es decir, la degradación del GMP en la cepa recombinante QIKO se redujo aproximadamente un 47% respecto a la de la cepa madre.

15 Tal y como se describe más arriba, las cepas que producen GMP de la presente invención muestran una alta eficacia de conversión del XMP en GMP y una baja actividad de degradación del GMP.

De acuerdo con un procedimiento para acumular la GMP sintetasa en células de la presente invención, la GMP sintetasa se puede acumular en una alta concentración en las células.

20 De acuerdo con un procedimiento para producir GMP, GDP o GTP de la presente invención, el GMP, GDP o GTP se puede producir con gran eficacia.

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> CJ Corporation
- <120> Cepa de *Escherichia* capaz de convertir el XMP en GMP y de mantener el estado inactivado del gen o de los genes asociados a la degradación del GMP y procedimientos para utilizarla
- 5 <130> 69.60.95760
  - <140> EP 06702908.2
  - <141> 2006-01-20
  - <150> PCT/KR2006/000221
  - <151> 2006-01-20
- 10 <150> KR 10-2005-0005863
  - <151> 2005-01-21
  - <160> 8
  - <170> Kopatentin 1.71
  - <210> 1
- 15 <211> 21
  - <212> ADN
  - <213> Secuencia Artificial
  - <220>
  - <223> Cebador
- 20 <400> 1
  - atggctaccc cacacattaa t 21
  - <210> 2
  - <211> 21
  - <212> ADN
- 25 <213> Secuencia Artificial
  - <220>
  - <223> Cebador
  - <400> 2
    - ctttatcgcc cagcagaacg g 21
- 30 <210> 3
  - <211> 21
  - <212> ADN
  - <213> Secuencia Artificial
  - <220>
- 35 <223> Cebador

<400> 3  
 tcaacatact gactatttag g 21  
 <210> 4  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 4  
 10 ctctgtcagt attctgaatt g 21  
 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 5  
 cggcgcatta gcatcgca 18  
 <210> 6  
 20 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25 <400> 6  
 ttcaggaac tgaatgctct t 21  
 <210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 7  
 atggtagag atatgaaa 18  
 35 <210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 8

ttactcgtcc agcagaatca c

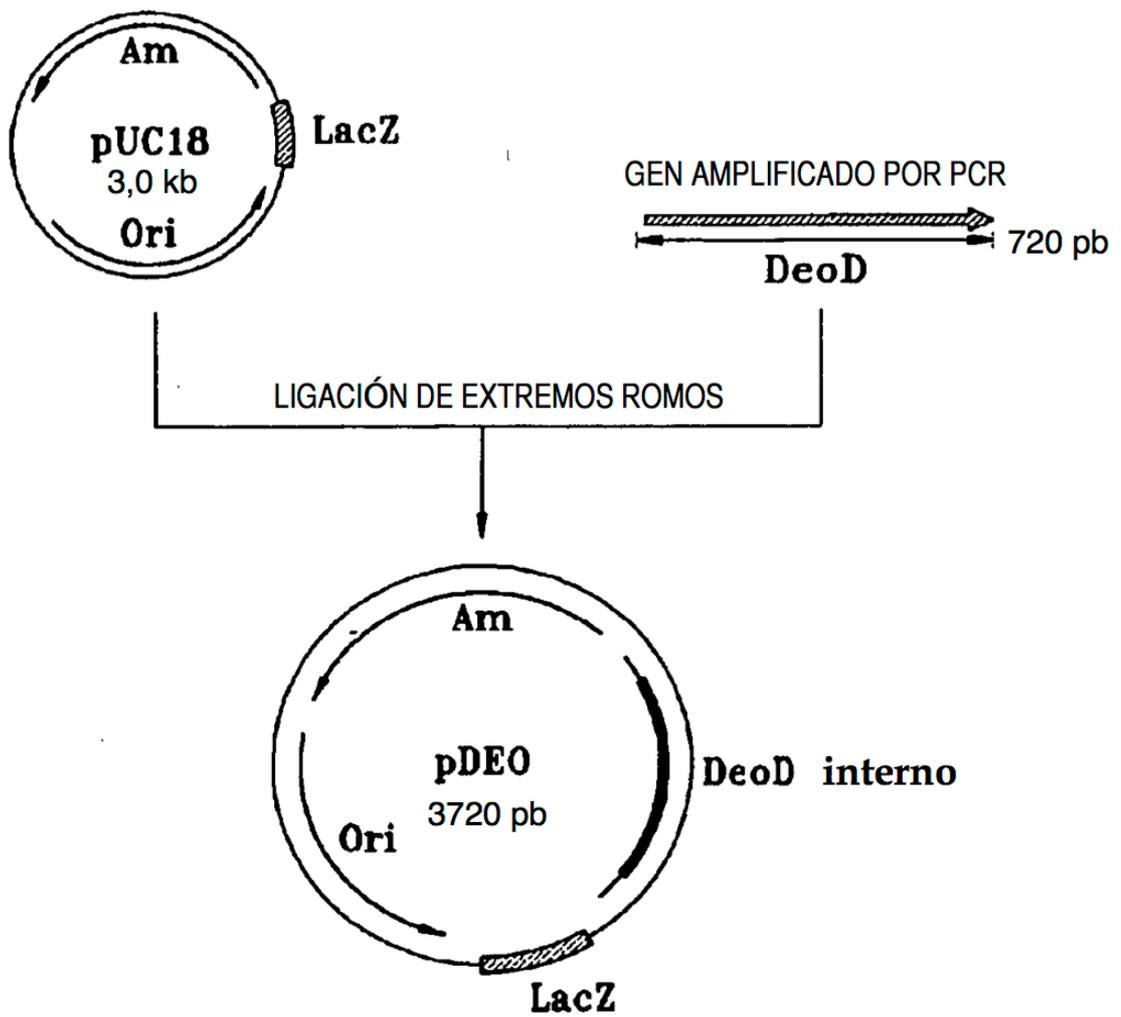
21

**REIVINDICACIONES**

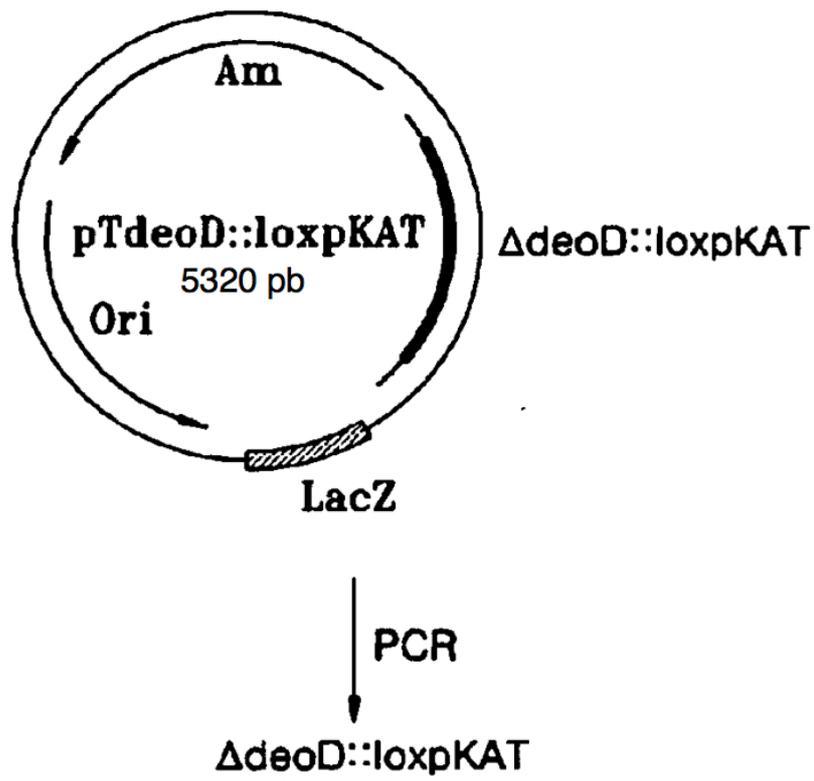
1. Cepa del género *Escherichia* que procede de *Escherichia sp.* GPU1114 de n.º de acceso KCCM-10536 y que comprende un gen *deoD* inactivado, un gen *aphA* inactivado y un gen *appA* inactivado.
- 5 2. Cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el producto del gen *deoD* tiene la secuencia presentada en NP\_418801 descrita en la página 3 de la descripción.
3. Cepa de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el producto del gen *aphA* tiene la secuencia presentada en NP\_418479 descrita en la página 3a de la descripción (página 4 de la traducción).
4. Cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el producto del gen *appA* tiene la secuencia presentada en NP\_415500 descrita en la página 3a de la descripción (página 4 de la traducción).
- 10 5. Cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es *Escherichia sp.* QKO-udhp de n.º de acceso KCCM-10632.
6. Cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el gen *hprt* también está inactivado.
- 15 7. Cepa de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el producto del gen *hprt* tiene la secuencia presentada en NP\_414667 descrita en la página 3a de la descripción (página 4 de la traducción).
8. Cepa de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que es *Escherichia sp.* QIKO de n.º de acceso KCCM-10630.
9. Cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde los genes *deoD*, *aphA*, *appA* y *hprt* están inactivados cada uno mediante sustitución por recombinación homóloga.
- 20 10. Procedimiento para acumular la 5'-guanilato (GMP) sintetasa en las células, en donde el procedimiento comprende el cultivo de la cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Procedimiento para producir GMP, 5'-difosfato de guanosina (GDP) o 5'-trifosfato de guanosina (GTP), en donde el procedimiento comprende el cultivo de la cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

25

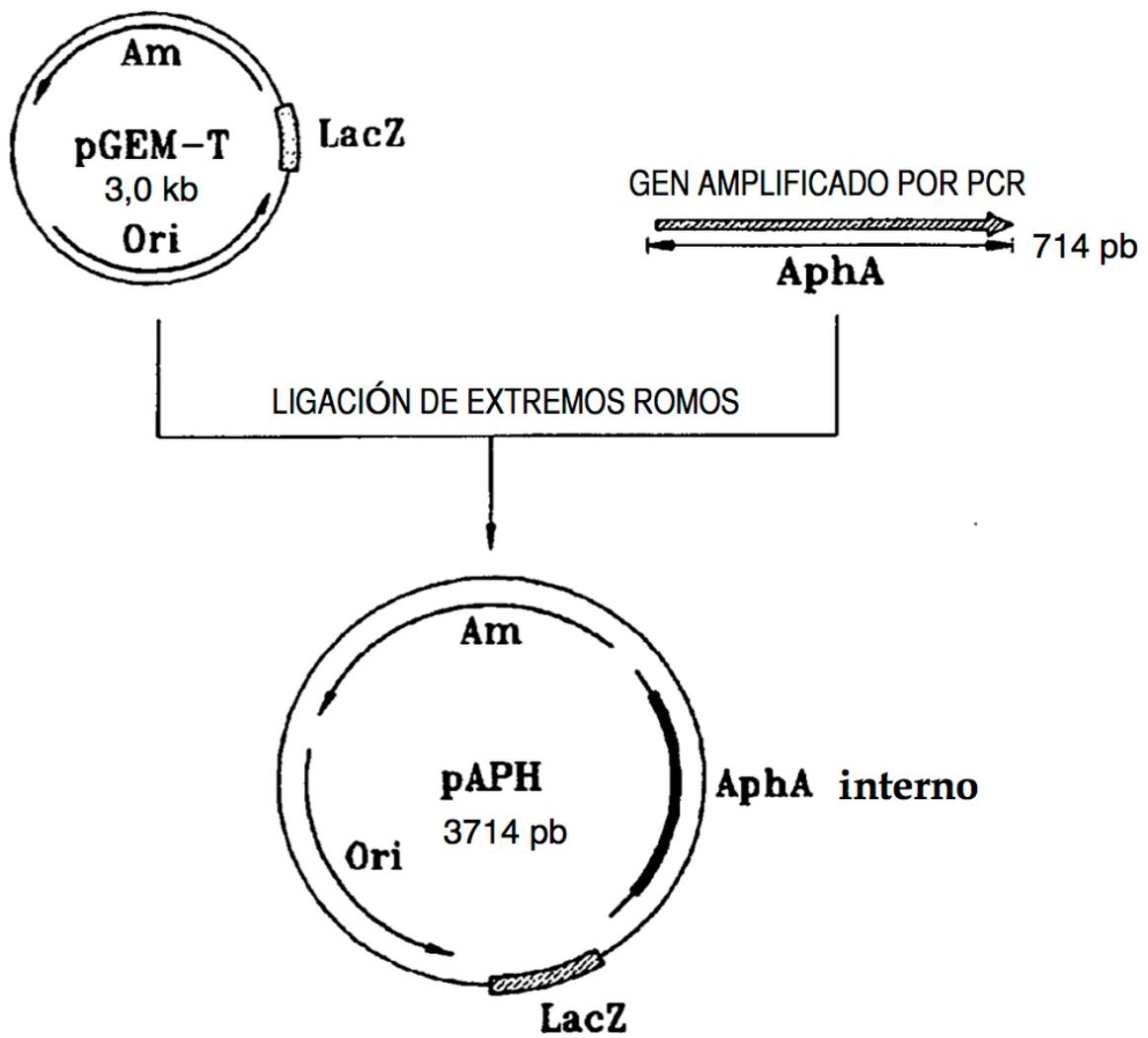
**FIG. 1A**



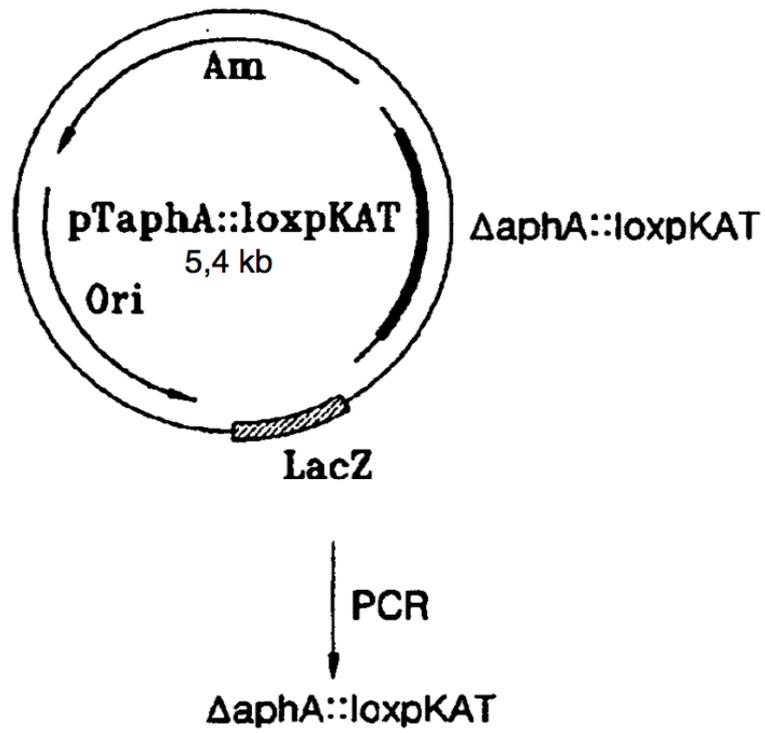
**FIG. 1B**



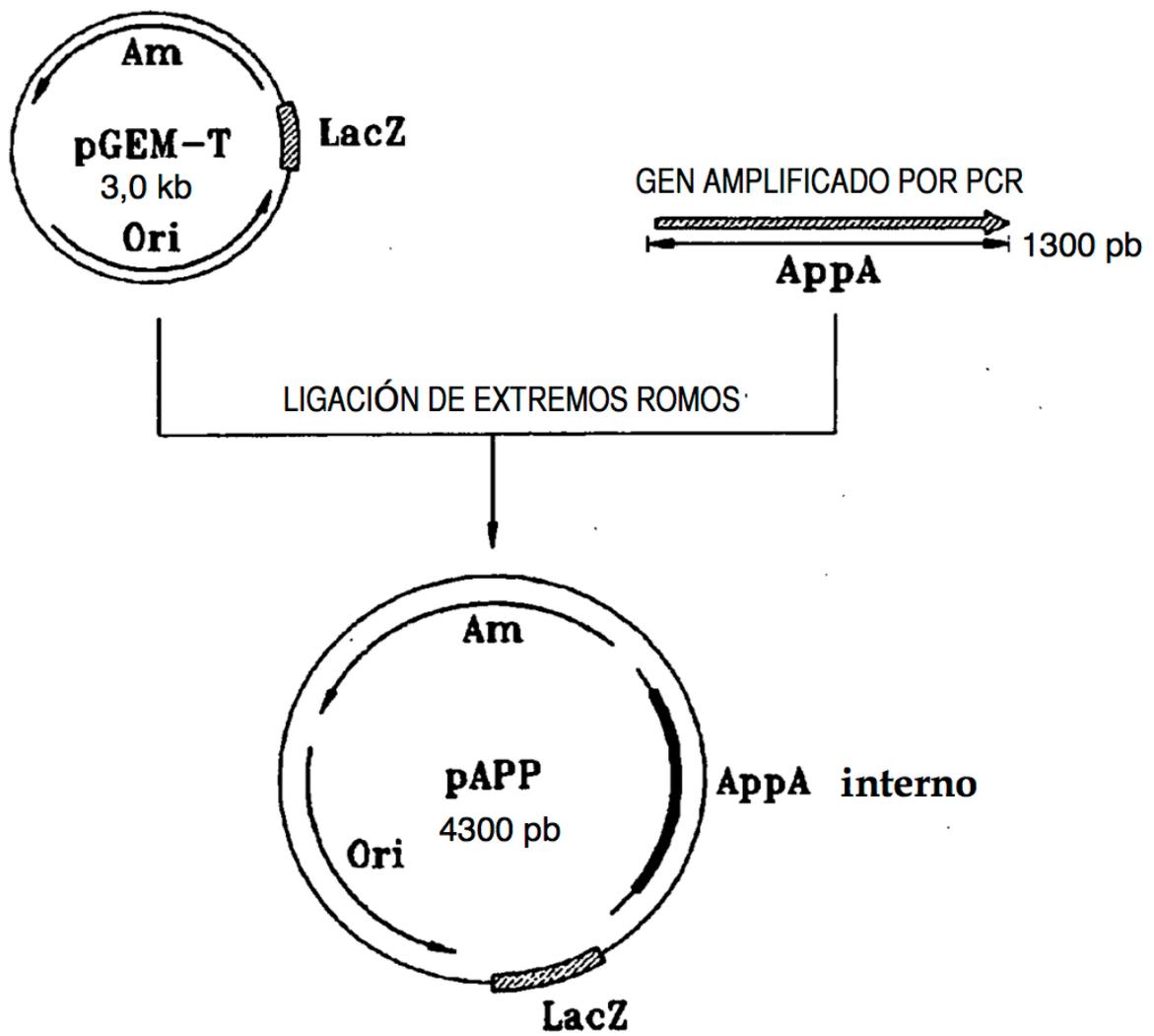
**FIG. 2A**



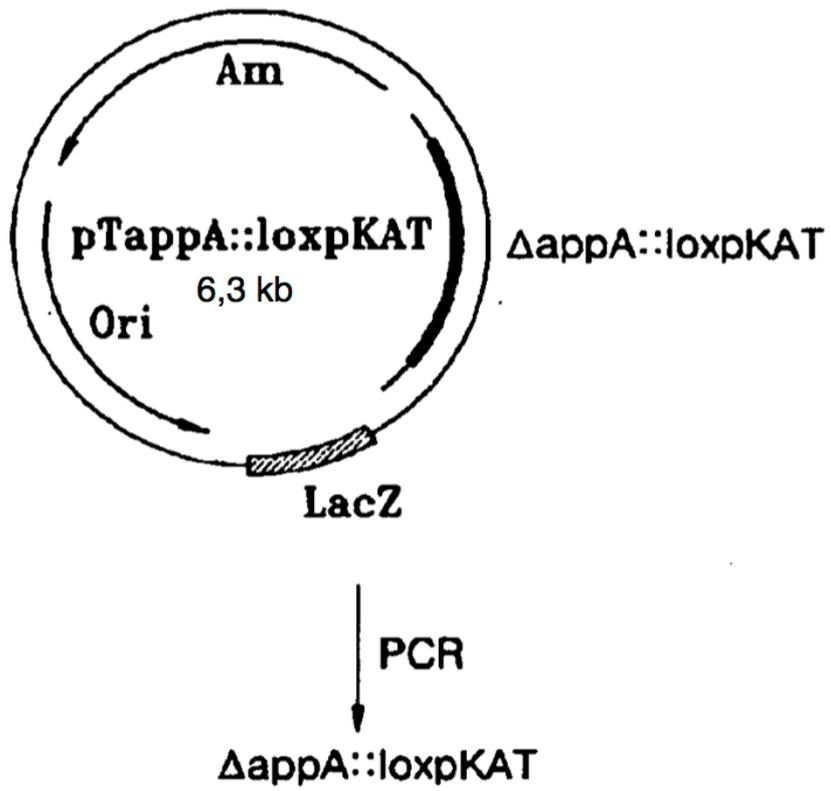
**FIG. 2B**



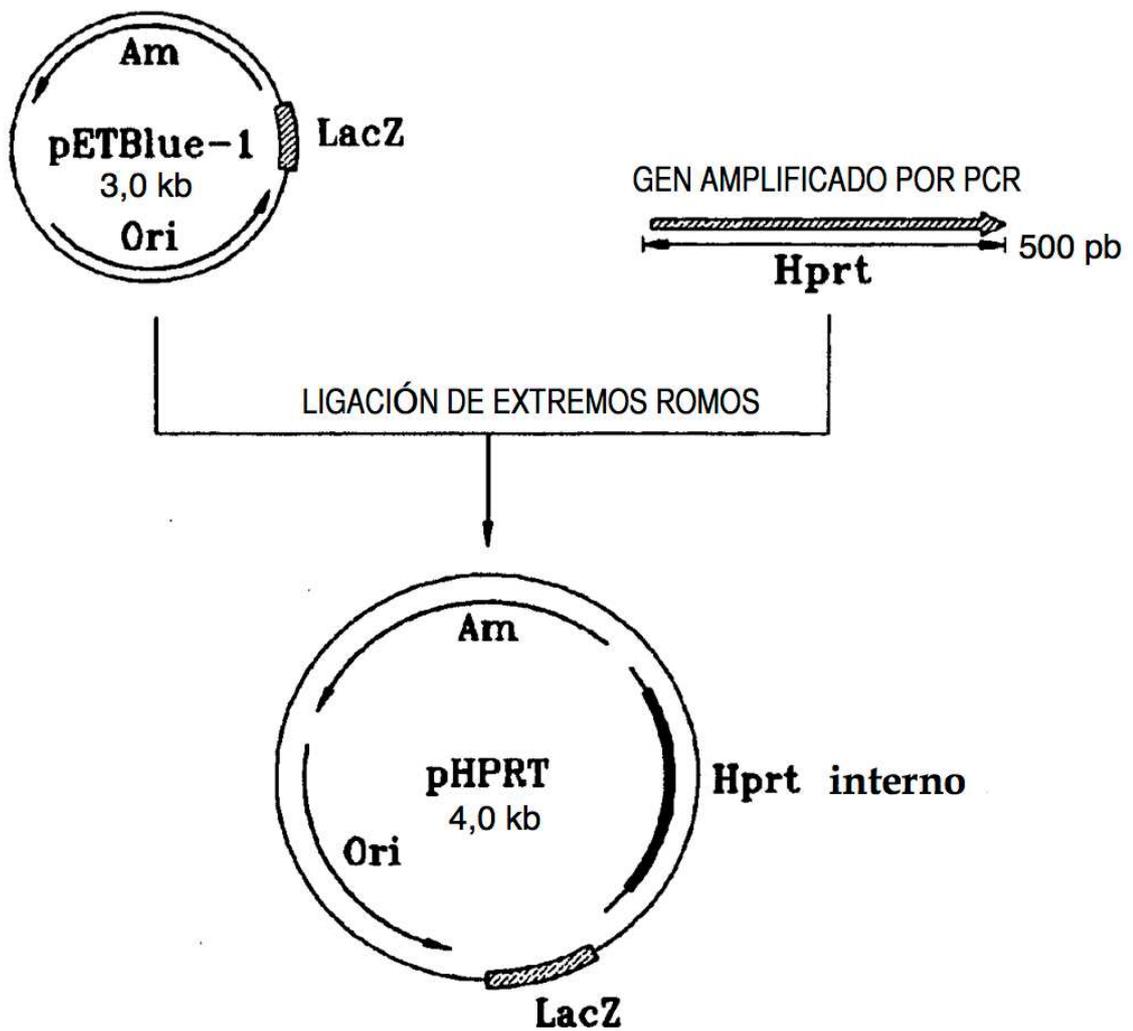
**FIG. 3A**



**FIG. 3B**



**FIG. 4A**



# FIG. 4B

