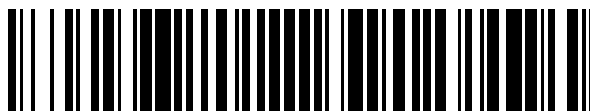


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 571**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 19/34 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09833645 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2358866**

54 Título: **Cepa de corinebacteria que tiene mejorada la productividad de 5'-xantosina monofosfato y procedimiento de producción de 5'-xantosina monofosfato usando la misma**

30 Prioridad:

17.12.2008 KR 20080128847

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

10.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHO, JINMAN;
KIM, HYE WON;
LEE, JINNAM;
LEE, JI-HYE;
OH, YOON SEOK y
PARK, JANG HEE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 553 571 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 corinebacteria que tiene mejorada la productividad de 5'-xantosina monofosfato y procedimiento de producción de 5'-xantosina monofosfato usando la misma

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un vector recombinante, que tiene la estructura mostrada en el mapa de escisión de la FIG. 1 que transporta un gen de SEC ID N°: 7 y una cepa de Corinebacteria, trasformada con el vector recombinante, que tiene una actividad malato deshidrogenasa más alta que la endógena. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de xantosina 5'-monofosfato usando la cepa de Corinebacteria.

10 Antecedentes de la técnica

La 5'-guanosina monofosfato (en lo sucesivo en el presente documento denominada "GMF") es un aditivo alimentario ampliamente usado como potenciador del sabor, como la inosina monofosfato (en lo sucesivo en el presente documento denominada "IMF"). La GMF provoca un sabor umami y su uso es dependiente del glutamato monosódico (GMS) que también se usa. A menudo se usa en sinergia con la IMF para aumentar la intensidad del sabor umami del GMS.

15 Los ejemplos de los procedimientos para la preparación de GMF conocidos hasta ahora incluyen (1) la degradación enzimática del ARN de levadura, (2) la fermentación directa con microorganismos a GMF, (3) la fermentación con microorganismos a guanosina, seguida de una fosforilación química, (4) la fermentación con microorganismos a guanosina, seguida de una fosforilación enzimática, (5) la fermentación con microorganismos a xantosina 5'-monofosfato (en lo sucesivo en el presente documento denominado "XMF"), seguida de la conversión en GMF por una cepa de corinebacteria, y (6) la fermentación con microorganismos a XMF, seguida de la conversión de la XMF en GMF por *Escherichia coli* que tiene actividad aminasa. De estos, el procedimiento (1) tiene dificultades de suministro de material y no es beneficioso económicamente y el procedimiento (2) sufre la desventaja de ser de bajo rendimiento debido a la permeabilidad de la membrana al GMF. Por lo tanto, los otros procedimientos se usan ampliamente en aplicaciones industriales.

20 Para los procedimientos en los que se produce XMF y se convierte en GMF, es crítico aumentar la productividad de XMF. Por ejemplo, la Solicitud de Patente Coreana N°: 10-1991-018016 desvela una cepa inactiva en XMF aminasa capaz de producir XMF en un rendimiento alto, que es semi-auxotrófica para la adenina y la guanina, tolerante a los análogos de guanosina y muy susceptible a la lisozima, una enzima que destruye las paredes celulares. La Solicitud de Patente Coreana N°: 10-2001-000513 desvela una cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* que puede acumular directamente XMF a una concentración alta en un medio de cultivo y un procedimiento de producción de XMF usando la misma. La cepa se prepara mediante la irradiación del microorganismo madre con luz UV tratando con el mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), y seleccionando un mutante tolerante a la norvalina, un análogo de la valina que afecta a la biosíntesis de la XMF. La Solicitud de Patente Coreana N°: 10-2008-006537 describe un procedimiento de aumento del rendimiento de la XMF en el que se modifican el purN y el purH, genes involucrados en la biosíntesis de la XMF.

30 Por otro lado, la productividad de ATP conduce a una producción de XMF debido a que el ATP está involucrado en la biosíntesis de XMF. También, la actividad malato deshidrogenasa tiene una gran influencia en la producción de ATP. Sin embargo, en ningún lado se mencionan en los documentos anteriores microorganismos y procedimientos que se diseñen para potenciar la actividad malato deshidrogenasa para aumentar los rendimientos de producción de XMF.

35 El documento WO 2010/071366 A2 (que tiene la misma fecha de prioridad que la presente solicitud) se refiere a la producción de guanosina 5'-mofosfato mediante el cultivo de células bacterianas del género *Corynebacterium*.

40 El documento US 2002/0098552 A1 se refiere a la producción de xantosina 5'-mofosfato mediante el cultivo de células bacterianas del género *Corynebacterium*. Sin embargo, no se desvela el uso inventivo del gen mgo.

Teniendo en cuenta que es importante aumentar la productividad de ATP de la cepa de producción de XMF, los presentes inventores han llevado a cabo una intensa investigación y han encontrado un gen que es responsable del aumento. También, se ha encontrado que una cepa de Corinebacteria transformada con un vector recombinante que transporta dos copias del gen conjuntamente, podría producir XMF en un alto rendimiento.

50 Divulgación

Problema técnico

Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar una cepa de Corinebacteria que tenga una actividad malato deshidrogenasa más alta que la endógena.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un vector recombinante que tenga la estructura mostrada en el mapa de escisión de la FIG. 1 que transporte el gen de SEC ID N°: 7.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar una cepa de Corinebacteria transformada con el vector recombinante.

- 5 Es un objeto adicional más de la presente invención proporcionar un procedimiento de producción de XMF mediante el cultivo del microorganismo transformado y de obtención de la XMF del cultivo.

Solución técnica

10 De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente invención se dirige a una cepa de corinebacteria con mejoras sobre la actividad malato deshidrogenasa endógena. La cepa de corinebacteria de la presente invención se modifica para tener una actividad malato deshidrogenasa más alta que su actividad endógena de tipo silvestre, mediante el aumento del número de copias del gen m_{qo} que codifican la malato deshidrogenasa, o mediante la sustitución o modificación de un promotor de un gen m_{qo}, que resulta en una mejora en la productividad de XMF.

15 La expresión “malato deshidrogenasa”, como se usa en el presente documento, significa una enzima que cataliza la conversión de malato en oxalacetato por deshidrogenación. Esta enzima se encuentra en un espectro muy amplio de organismos vivos con el acompañamiento de lactato deshidrogenasa y requiere DPN y NAD como cofactores para su actividad, generalmente estos acompañan a la lactato deshidrogenasa. En la cepa de corinebacteria de acuerdo con la presente invención, se aumenta la actividad malato deshidrogenasa para producir XMF en un rendimiento más alto.

20 Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión “actividad endógena” se refiera a la actividad enzimática de interés en un microorganismo de tipo silvestre.

25 El término “más alta que la actividad endógena” significa una mayor actividad enzimática comparada con la actividad de la variedad endógena, ya sea como resultado de un aumento de la actividad por la propia enzima o por un gen endógeno o un gen extraño. Por ejemplo, un aumento en la actividad enzimática puede conseguirse mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica para aumentar el número de copias del gen, o para reemplazar o modificar un promotor de un gen m_{qo}.

30 La enzima objetivo malato deshidrogenasa cuya actividad se busca aumentar de acuerdo con la presente invención se codifica por el gen m_{qo} de Corinebacteria. Puede usarse cualquier derivado o análogo en la presente invención, mientras que sea biológicamente idéntico o corresponda al gen m_{qo}. Es decir, si su actividad es sustancialmente la misma que o similar a la del gen m_{qo}, cualquier gen que queda dentro del intervalo del gen m_{qo} es útil en la presente invención. Ventajosamente, el gen útil en la presente invención comparte una homología con la secuencia del gen m_{qo} de al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 90 %, incluso mucho más preferentemente al menos el 95 % y más preferentemente al menos el 98 %. Más ventajosamente, la malato deshidrogenasa está codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 7. El aumento de las copias del gen puede conseguirse mediante la introducción de genes exógenos y/o la amplificación de los genes endógenos. El número de copias del gen puede determinarse fácilmente por los expertos en la materia de acuerdo con las necesidades y el propósito. La amplificación del gen endógeno también puede llevarse a cabo usando un procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el cultivo en un medio selectivo adecuado a presión. En un ejemplo preferido, un vector que transporta un gen que codifica la malato deshidrogenasa se introduce en una cepa de corinebacteria para generar un microorganismo transformado con una mejora sobre la actividad endógena de tipo silvestre.

35 Siempre y cuando se conozca en la técnica y pertenezca al género corinebacteria, cualquier cepa puede usarse en la presente invención sin limitación. Preferentemente, los ejemplos de la cepa de corinebacteria útil en la presente invención incluyen *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, y *Brevibacterium lactofermentum*, pero sin limitación a los mismos. En detalle, entre las cepas de corinebacteria están el *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* R, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 y derivados de los mismos. Se prefiere *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304 transformado de *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530.

40 De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente invención se dirige a un vector recombinante que tiene la estructura mostrada en el mapa de escisión de la FIG. 1, que transporta el gen de SEC ID N°: 7.

45 El gen de SEC ID N°: 7 tiene una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre de un gen m_{qo} de Corinebacteria. Sin embargo, es obvio que un vector recombinante que transporta un derivado o análogo del gen m_{qo} es también útil en la presente invención, mientras el derivado o análogo sea biológicamente idéntico o corresponda al gen m_{qo}, como se ha mencionado anteriormente. Como se usa en el presente documento, el término “gen m_{qo}”, una abreviación del gen “malato: quinona oxidoreductasa”, significa un gen que codifica malato oxalacetato que sirve para oxidar malato a oxalacetato.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un vector recombinante que transporta el gen m_{qo} de SEC ID N^o: 7. Mientras transporte un gen m_{qo}, cualquier vector recombinante normal puede emplearse en la presente invención sin limitación. Se prefiere el pDZ-m_{qo}. En un ejemplo preferido de la presente invención, el gen m_{qo} que contiene la SEC ID N^o: 7 se ha empleado para construir un vector recombinante pDZ-m_{qo} (véase la FIG. 1).

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención se dirige a una cepa de *Corinebacteria* transformada con un vector recombinante que transporta el gen m_{qo}.

El gen m_{qo} derivado de *corinebacteria* puede usarse usando un procedimiento de transformación conocido en la técnica sin limitación. Preferentemente, el gen m_{qo} se clona en un vector para su uso en la transformación en las células.

Puede emplearse cualquier procedimiento para la transformación si se conoce en la técnica. Como se usa en el presente documento, el término "transformación" es la alteración genética de una célula que resulta de la captación, la incorporación genómica y la expresión de un ADN extraño. Los procedimientos de transformación típicos incluyen la precipitación con CaCl₂, un procedimiento Hanahan en el que el efecto de la precipitación con CaCl₂ se mejora en combinación con DMSO (dimetilsulfóxido), electroporación, transfección con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, transformación mediada por fibra de carburo de silicio, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por PEG, sulfato de dextrano, lipofectamina, y transformación mediada por desecación/inhibición. La transformación con pDZ-m_{qo} de acuerdo con la presente invención no se limita a los ejemplos de transformación, sino que puede lograrse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica sin limitación.

El término "vector", como se usa en el presente documento, significa una molécula de ADN usada como vehículo para transferir material genético extraño en una célula huésped adecuada y es una construcción de ADN que contiene elementos reguladores que permiten a un transgen hacer la recombinación con un genoma huésped. Preferentemente, el vector recombinante que transporta el vector m_{qo} de acuerdo con la presente invención puede tener la estructura mostrada en el mapa de escisión de la FIG. 1. El vector representado por el mapa de escisión de la FIG. 1 puede introducirse en *corinebacteria* secuencial o simultáneamente. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el vector recombinante se transforma en *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530 que después se cultiva en un medio selectivo para permitir incorporar dos copias del gen m_{qo} en el genoma del huésped a través de una recombinación homóloga, que resulta en la generación de un mutante de *Corynebacterium ammoniagenes*, llamado *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304. Se ha depositado con el número de referencia KCCM10972P.

Corynebacterium ammoniagenes KCJ-1304 tiene dos copias del gen m_{qo} incorporadas en el genoma del KCCM-10530 que resultan de la introducción en su interior del pDZ-m_{qo} que tiene la estructura mostrada en el mapa de escisión de la FIG. 1 y la recombinación homóloga de las dos copias del gen m_{qo} con el gen endógeno.

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención se dirige a un procedimiento de producción de XMF, que comprende: el cultivo de la cepa de *corinebacteria* transformada y la obtención de XMF del cultivo. En la presente invención, la XMF se produce en un rendimiento más alto mediante la fermentación directa del microorganismo transformado. El microorganismo transformado es la cepa de *corinebacteria* que se mejora en la actividad malato deshidrogenasa sobre la actividad endógena de tipo silvestre. El gen m_{qo} del vector recombinante se incorpora preferentemente en el genoma del microorganismo transformado que puede producir así XMF en un alto rendimiento. En una realización preferida, el microorganismo es *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10972P.

Cualquier medio conocido en la técnica puede usarse sin limitación en el cultivo de la cepa capaz de producir XMF. Preferentemente, el medio contiene glucosa como fuente de carbono y opcionalmente otras fuentes de carbono diversas. Para su uso en el cultivo de un microorganismo de interés, un medio debe cumplir los requisitos para el crecimiento del microorganismo. Los medios de cultivo para las cepas de *corinebacteria* son conocidos en la técnica (por ejemplo, *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Bacteriology. Washington D.C., Estados Unidos, 1981). Los ejemplos de las fuentes de carbono útiles para las cepas de *corinebacteria* incluyen azúcares y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, celulosa, etc., aceites y lípidos tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino, aceite de coco, etc., ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linolénico, etc., alcoholes tales como glicerol, etanol, etc., y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden usarse individualmente o en combinación. Los materiales orgánicos tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, agua de macerado de maíz, soja, etc., urea, y compuestos inorgánicos tales como cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio pueden usarse individualmente o en combinación como fuentes de nitrógeno en el medio. El dihidrógeno fosfato de potasio o hidrógeno fosfato de dipotasio, o las sales de sodio correspondientes pueden ser útiles como fuentes de fósforo. Además, el medio de cultivo puede contener sales de metal tales como sulfato de magnesio, sulfato de hierro, etc. Además, los aminoácidos y/o vitaminas pueden requerirse como elementos esenciales. El medio de cultivo también puede contener precursores adecuados. Estos materiales pueden añadirse a un medio de manera discontinua o de manera continua.

El pH en el medio de cultivo puede ajustarse mediante compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco, etc., o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Un agente antiespumante tal como el éster de poliglicol de ácido graso puede usarse para prevenir la formación de burbujas durante el cultivo. El medio puede airearse con oxígeno o gas que contiene oxígeno (por ejemplo, aire) para mantener una condición aeróbica o con gas nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono para mantener una condición anaeróbica. La temperatura de cultivo se mantiene generalmente a 20 °C ~ 45 °C, y preferentemente a 30 °C ~ 35 °C. El cultivo se continúa hasta que se obtiene la cantidad máxima de XMF. A este respecto, se requiere un periodo de tiempo de 10 a 160 horas.

La 5XMF así producida puede secretarse en el medio de cultivo o permanecer dentro de la célula. El procedimiento de producción de XMF de acuerdo con la presente invención comprende recuperar XMF de las células o del medio de cultivo. Para la recuperación de XMF de las células o del medio del cultivo, puede utilizarse cualquier procedimiento bien conocido en la técnica. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, y HPLC, pero sin limitación a los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "xantosina 5'-monofosfato" es un intermedio en la biosíntesis del ácido nucleico y es de importancia fisiológica en animales y plantas. Por lo tanto, encuentra aplicaciones en una diversidad de campos incluyendo la industria alimentaria, la industria farmacéutica y la industria médica. La xantosina monofosfato es un aditivo alimentario usado como potenciador del sabor basado en ácido nucleico para proporcionar el sabor de las setas particularmente en sinergia con GMS. La XMF es un intermedio en el metabolismo de las purinas, formada a partir de IMF, que forma GMF. Cuando se usa el microorganismo transformado de acuerdo con la presente invención, puede producirse XMF en un alto rendimiento que se sabe que se mejora en aproximadamente un 6 % comparado con los microorganismos convencionales.

Efectos ventajosos de la invención

Gracias a la actividad malato deshidrogenasa mejorada, la cepa de corinebacteria transformada de la presente invención produce XMF en un rendimiento más alto a como lo hacen los microorganismos convencionales.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra la estructura del vector recombinante pDZ-mqo en la que dos copias de un gen mqo se insertan en un vector pDZ.

Modo para la invención

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención a través de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustración, pero no deben interpretarse como limitativos de la presente invención.

Ejemplo 1: Clonación del mqo derivado de la cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530 productora de XMF y construcción del vector recombinante (pDZ-mqo) para la incorporación genómica

La secuencia de nucleótidos del gen mqo (NCBI ID_3345228) se obtuvo de los datos del GenBank del NIH. Basándose en la secuencia, se sintetizaron dos pares de cebadores (SEC ID N°: 1 a 4).

Mientras el genoma de *Corynebacterium* KCCM-10530 sirvió como molde, se llevó a cabo la PCR en presencia de ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™ (Stratagene) usando los cebadores de SEC ID N°: 1 a 4, con 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y extensión a 68 °C durante 2 min. Los productos de la PCR así obtenidos fueron dos copias del gen mqo, cada una de 2,1 kb de longitud (mqo-A, mqo-B), que se amplificaron usando dos conjuntos de SEC ID N°: 1 y 2, y SEC ID N°: 3 y 4, respectivamente.

SEC ID N°: 1; gctctagaATCGGTCATTCCATGAACCC
 SEC ID N°: 2; cgcgatccCATCGATATCGCCAACTCCA
 SEC ID N°: 3; cgcgatccATCGGTCATTCCATGAACCC
 SEC ID N°: 4; gctctagaCATCGATATCGCCAACTCCA

Tras tratarse con las enzimas de restricción adecuadas (mqo-A: XbaI + BamHI, mqo-B: BamHI + XbaI), los productos de la PCR mqo-A y mqo-B se insertaron en el vector pDZ que se trató previamente con XbaI y fosfatasa alcalina de gamba, a través de la unión de los tres fragmentos (véase la Solicitud de Patente Coreana N°: 10-2007-94433). Finalmente, se obtuvo un vector recombinante pDZ-mqo en el que se clonaron conjuntamente dos copias del gen mqo. La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra la estructura del vector recombinante pDZ-mqo para incorporarlo en el genoma de *Corynebacterium*.

Ejemplo 2: Generación de una cepa con el mqo insertado

La construcción del vector pDZ-mqo se transformó en la cepa KCCM-10530 y se sometió a recombinación homóloga con el genoma para insertar una copia del gen mqo en una posición adyacente al gen mqo en el genoma. De este modo, se obtuvo una novedosa cepa productora de XMF, llamada *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304, que tenía dos copias del gen mqo en el genoma de la misma. La inserción de las dos copias del gen mqo conjuntamente

se identificó usando la PCR usando un conjunto de cebadores (SEC ID N°: 5 y 6) que se dirigieron a secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena abajo de las dos copias del gen mqo.

SEC ID N°: 5; CTTTTTCGATGACGCCCAA
SEC ID N°: 6; CCACTTTTATCGGGTGAGACCA

5 Ejemplo 3: Actividad malato deshidrogenasa de la cepa con el mqo insertado

La *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304 productora de XMF preparada en el ejemplo 2 se ensayó para la actividad malato deshidrogenasa de la siguiente forma. La cepa se inoculó en un medio que contenía 10 g/l de bactopectona, 5 g/l de bactoextracto de carne, 5 g/l de bactoextracto de levaduras, 2,5 g/l de NaCl, 50 mg/l de adenina, y 50 mg/l de guanina y se incubó a 30 °C durante 12 h hasta que se obtuvo una DO de 10. Se recuperaron 10 ml del cultivo celular, se lavó dos veces con un tampón que comprendía HEPES 50 mM, acetato de potasio 10 mM, CaCl₂ 10 mM y MgCl₂ 10 mM, y se suspendió en 1 ml del mismo tampón. Tras la interrupción usando un equipo de ultrasonidos, se centrifugó el lisado celular. El sobrenadante se recentrifugó para proporcionar unos gránulos que después se suspendieron en 100 µl de tampón. Se usaron 10 µl de esta suspensión como solución enzimática. Se preparó un tampón de reacción mediante el mezclado de HEPES 50 mM, acetato de potasio 10 mM y 2,6-dicloroindolifenol (Cl₂Ind) 50 µM. El Cl₂Ind se descongeló y mezcló justo antes de la reacción. Se añadieron a 980 µl de la mezcla de reacción 10 µl de malato 100 mM como sustrato y 10 µl de la solución enzimática, seguido de una incubación a 30 °C durante 15 min con agitación. La actividad enzimática se determinó mediante la medida de la concentración del Cl₂Ind reducido. El Cl₂Ind tenía un coeficiente de absorción de 22 cm⁻¹mM⁻¹ a 600 nm.

20 Tabla 1
[Tabla 1]

[Tabla]

Cepa	KCCM-10530	KCJ-1304
Cl ₂ Ind reducido (µM)	15,45	20,17

Como se muestra en la Tabla 1, se observó que la KCJ-1304 aumenta en actividad malato deshidrogenasa un 30,6 % comparado con la cepa madre KCCM-10530.

25 Ejemplo 4: Producción de XMF de la cepa con el mqo insertado

La cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304 productora de XMF preparada en el Ejemplo 2 se cultivó para producir XMF de la siguiente forma. La cepa madre de *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530 y la mutante KCJ-1304 se inocularon en los respectivos tubos de 14 ml, que contenían cada uno 3 ml del medio de siembra siguiente, y se incubó a 30 °C durante 20 h con agitación a 200 rpm. Después, se añadieron los cultivos de siembra en una cantidad de 0,4 ml a 32 ml del medio de producción siguiente (24 ml del medio principal + 8 ml del medio A) en respectivos matraces de 250 ml con deflectores en las esquinas, seguido de la agitación del cultivo a 30 °C y 230 rpm durante 96 h. A partir de ahí, la producción de 5'-XMF se midió cuantitativamente usando HPLC. Las cantidades de XMF producidas por *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530 y KCJ-1304 se proporcionan en la Tabla 2, a continuación.

35 Tabla 2

[Tabla 2]

Cepa	KCCM-10530	KCJ-1304
KCCM-10530	28,6	30,3

Medio de siembra: 34 g/l de glucosa, 15 g/l de peptona, 15 g/l de extracto de levadura, 2,6 g/l de NaCl, 3 g/l de urea, 150 mg/l de adenina, 150 mg/l de guanina, pH 7,2

40 Medio de producción (principal): 80 g/l de glucosa, 10 g/l de sulfato de magnesio, 20 mg/l de sulfato de hierro, 10 mg/l de sulfato de cinc, 10 mg/l de sulfato de manganeso, 30 mg/l de adenina, 30 mg/l de guanina, 100 µg/l de biotina, 1 mg/l de sulfato de cobre, 5 mg/l de cloruro de tiamina, 10 mg/l de cloruro de calcio, pH 7,2

Medio de producción (medio A): 10 g/l de fosfato monopotásico, 10 g/l de fosfato dipotásico, 7 g/l de urea, 5 g/l de sulfato de amonio

45

ES 2 553 571 T3

Como se desprende de los datos de la Tabla 2, se encontró que la KCJ-1304 aumenta en la producción de XMF en 1,7 g/l, que corresponde a un aumento del 5,9 %, comparado con la cepa madre KCCM-10530.

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

5 <120> UNA CEPA DE CORINEBACTERIA QUE TIENE MEJORADA LA PRODUCTIVIDAD DE 5'-XANTOSINA MONOFOSFATO Y UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE 5'-XANTOSINA MONOFOSFATO USANDO LA MISMA

10 <130> OPA09120/PCT

<150> KR10-2008-0128847
<151> 17-12-2008

15 <160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador directo para m_{qo}-A

25 <400> 1
gctctagaat cggtcattcc atgaacc 28

30 <210> 2
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> cebador inverso para m_{qo}-A

<400> 2
cgcgatccc atcgatatcg ccaactcca 29

40 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> cebador directo para m_{qo}-B

50 <400> 3
cgcgatcca tcggtcattc catgaacc 29

55 <210> 4
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso para m_{qo}-B

60 <400> 4
gctctagaca tcgatatcg caactcca

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

ES 2 553 571 T3

<220>
 <223> cebador directo para la detección de mqo

5 <400> 5
 cttttcgatg acgccc aa 18

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador inverso para la detección de mqo

15 <400> 6
 ccactttatc gggtagagacc a 21

<210> 7
 <211> 1503
 20 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagenes*

<400> 7

atgtcagatt ccccgaagaa cgcaccgagg attaccgatg aggcagatgt agttctcatt 60

ggtagccggta tcatgagctc cacgctgggt gcaatgctgc gtcagctgga gccaaagctgg 120

actcagatcg tcttcgagcg tttggatgga ccggcacaag agtcgtcctc cccgtggaac 180

aatgcaggaa ccggccactc tgctctatgc gagctgaact acaccccaga ggtaagggc 240

aaggttgaaa ttgccaaggc tgtaggaatc aacgagaagt tccaggtttc ccgtcagttc 300

tggctcacc tcgttgaaga gggagtgctg tctgatccta aggaattcat caaccctggt 360

cctcacgtat ctttcggcca gggcgcagat caggttgcat acatcaaggc tcgctacgaa 420

gctttgaagg atcaccact cttccagggc atgacctacg ctgacgatga agctaccttc 480

accgagaagc tgcctttgat ggcaaagggc cgtgacttct ctgatccagt agcaatctct 540

tggatcgatg aaggcaccga catcaactac ggtgctcaga ccaagcagta cctggatgca 600

gctgaagttg aaggcactga aatccgctat ggccacgaag tcaagagcat caaggctgat 660

ggcgcaaagt ggatcgtgac cgtcaagaac gtacacactg gcgacaccaa gaccatcaag 720

gcaaacttcg tgttcgctcg cgcaggcggg tacgcaactg atctgcttcg cagcgcaggc 780

atcccacagg tcaagggtt cgctggattc ccagtatccg gcctgtggct tcgttgcacc 840

25 aacgaggaac tgatcgagca gcacgcagcc aaggatatg gcaaggcatc tgttggcgct 900

ES 2 553 571 T3

cctccaatgt ctgttcctca ccttgacacc cgcgttatcg agggtgaaaa gggctctgctc	960
tttgacctt acggtggctg gaccocctaag ttcttgaagg aaggctccta cctggacctg	1020
ttcaagtcca tccgcccaga caacattcct tcctaccttg gcgttgctgc tcaggaattt	1080
gatctgacca agtaccttgt cactgaagtt ctcaaggacc aggacaagcg tatggatgct	1140
cttcgcgagt acatgccaga ggcacaaaac ggcgattggg agaccatcgt tgccggacag	1200
cgtgttcagg ttattaagcc tgcaggattc cctaagttcg gttccctgga attcggcacc	1260
accttgatca acaactccga aggcaccatc gccgattgc tcggtgcttc ccctggagca	1320
tccatcgcac cttccgcaat gatcgagctg cttgagcgtt gcttcggtga ccgcatgac	1380
gagtggggcg acaagctgaa ggacatgac ccttcctacg gcaagaagct tgcttccgag	1440
ccagcactgt ttgagcagca gtgggcacgc acccagaaga ccctgaagct tgaggaagcc	1500
taa	1503

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una cepa de *Corinebacteria* para la producción de xantosina 5'-monofosfato, en el que la cepa de *Corinebacteria* tiene una actividad malato deshidrogenasa más alta que su actividad endógena de tipo silvestre, mediante el aumento del número de copias del gen *mqo* que codifican la malato deshidrogenasa, o mediante la sustitución o modificación de un promotor de un gen *mqo*.
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad malato deshidrogenasa se mejora como resultado de un aumento en la expresión del gen *mqo*.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el gen *mqo* es de SEC ID N°: 7.
- 10 4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa se transforma con un vector recombinante que comprende un gen *mqo*.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el gen *mqo* es de SEC ID N°: 7.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cepa de *Corinebacteria* es *Corynebacterium ammoniagenes*.
- 15 7. Un procedimiento de producción de xantosina 5'-monofosfato, que comprende el cultivo de una cepa de *Corinebacteria* que tiene una actividad malato deshidrogenasa más alta que su actividad endógena de tipo silvestre, mediante el incremento del número de copias del gen *mqo* que codifica la malato deshidrogenasa, o mediante la sustitución o modificación de un promotor de un gen *mqo*; y la obtención de xantosina 5'-monofosfato del cultivo.
- 20 8. Una cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* con la productividad de xantosina 5'-monofosfato aumentada, que tiene una actividad malato deshidrogenasa más alta que su actividad endógena de tipo silvestre, mediante el incremento del número de copias del gen *mqo* que codifica la malato deshidrogenasa, o mediante la sustitución o modificación de un promotor de un gen *mqo*.

[Fig. 1]

