

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 278**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 19/32 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09833644 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2358865**

54 Título: **Una cepa de corinebacterias para el aumento de la productividad de 5'-guanósín monofosfato y un procedimiento de producción de 5'-guanósín monofosfato utilizando la misma**

30 Prioridad:

17.12.2008 KR 20080128846

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

21.04.2016

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;
OH, YOON SEOK y
PARK, JANG HEE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 567 278 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

Una cepa de corinebacterias para el aumento de la productividad de 5'-guanosín monofosfato y un procedimiento de producción de 5'-guanosín monofosfato utilizando la misma

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una cepa de corinebacterias que tiene una actividad malato deshidrogenasa mayor que la endógena la cual puede por lo tanto producir ATP con alto rendimiento. La presente invención también se refiere a un procedimiento de producción de guanosín 5'-monofosfato que utiliza la cepa de corinebacterias en combinación con una enzima o microorganismo que tiene actividad de aminación.

Técnica antecedente

- 10 El guanosín 5'-monofosfato (de aquí en adelante designado "GMP") es un aditivo alimentario que se utiliza ampliamente como potenciador del sabor, igual que el inosín monofosfato (de aquí en adelante designado "IMP"). El GMP da lugar a un sabor umami y su uso depende del glutamato monosódico (MSG) que también se utiliza. A menudo se utiliza de manera sinérgica con IMP para aumentar la intensidad del sabor umami del MSG.

- 15 Ejemplos de los procedimientos para la preparación de GMP que se conocen hasta ahora incluyen (1) la degradación enzimática del ARN de levaduras, (2) fermentación por microorganismos directa a GMP, (3) fermentación por microorganismos a guanosina, seguida por fosforilación química, (4) fermentación por microorganismos a guanosina, seguida por fosforilación enzimática, (5) fermentación por microorganismos a xantosín 5'-monofosfato (de aquí en adelante designado "XMP"), seguida por la conversión en GMP por una cepa de corinebacterias y (6) fermentación por microorganismos a XMP, seguida por la conversión de XMP a GMP por
- 20 *Escherichia coli*, la cual tiene actividad aminasa. De estos, el procedimiento (1) tiene dificultades de suministro de material y no es rentable económicamente y el procedimiento (2) sufre la desventaja de tener un bajo rendimiento debido a la permeabilidad de membrana del GMP. Por lo tanto, los otros procedimientos se utilizan ampliamente en aplicaciones industriales.

- 25 Para el procedimiento (6) en el que se produce XMP y se convierte en GMP, es crítico proporcionar ATP como cofactor. La mayoría del ATP que se utiliza en la conversión de XMP a GMP se suministra a partir de una cepa productora de XMP. En la estrategia de conversión, el xileno tiene un importante papel debido a que aumenta la permeabilidad de la membrana al ATP y XMP. El xileno en el medio permite que el ATP y XMP penetren en una cepa productora de GMP, seguido por la conversión de XMP en GMP. Por lo tanto, la estrategia de producción de GMP se sirve de la estrategia de aumento de la productividad de ATP.

- 30 La conversión a partir de XMP en GMP se representa por la siguiente fórmula de reacción:



XMP Aminasa

- 35 Es decir, es esencial un suministro continuo de ATP, que funciona como cofactor, para el proceso de producción de GMP en el que primeramente se produce XMP por una cepa productora de XMP y luego se convierte en GMP en presencia de una enzima o microorganismo que tiene actividad XMP aminasa. Por lo tanto es muy importante aumentar la productividad de ATP de la cepa productora de XMP. El AMP producido en el proceso de conversión se reutiliza como sustrato para la producción de ATP. De hecho, los nucleótidos que se basan en adenina se reciclan para la producción de ATP.

- 40 Por lo tanto, es necesario el aumento de productividad de ATP de la cepa productora de XMP para la producción de alto rendimiento de GMP. La actividad de la malato deshidrogenasa tiene una gran influencia en la producción de GMP. Sin embargo, no hay microorganismos ni procedimientos que estén diseñados para aumentar la actividad de la malato deshidrogenasa para aumentar el rendimiento de la producción de GMP en ningún sitio que se mencione en documentos previos.

- 45 El documento KR 2007 0056491 A se refiere a un microorganismo tal como *Corynebacterium ammoniagenes* que tiene un gen codificante de 5'-fosforibosil-l-pirofosfato amidotransferasa y un procedimiento para producir xantosín 5'-monofosfato con una alta concentración y un alto rendimiento que utiliza el mismo.

- 50 Teniendo en mente que es importante aumentar la productividad de ATP de la cepa productora de XMP con el fin de aumentar el rendimiento de GMP con prioridad sobre la conversión en dos etapas, los presentes inventores realizaron una investigación intensiva y descubrieron un gen que es responsable del aumento. También se descubrió que cuando se utilizaba en combinación con XMP aminasa, una cepa de corinebacterias transformada con un vector recombinante que portaba dos copias del gen en tándem, podía producir XMP y ATP con alto rendimiento, aumentando de esta manera la productividad de GMP.

Divulgación**Problema técnico**

Por lo tanto es un objetivo de la presente invención proporcionar una cepa de corinebacterias que tenga actividad malato deshidrogenasa mayor que la endógena que por lo tanto pueda producir ATP con altos rendimientos.

- 5 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para producir GMP, que comprenda: cultivar el microorganismo transformado; producir XMP en el cultivo; añadir al cultivo una enzima o microorganismo que tenga actividad de aminación de XMP; y obtener GMP del cultivo.

Solución técnica

- 10 De acuerdo con un aspecto de la misma, la presente divulgación se refiere a una cepa de corinebacterias con un aumento de actividad malato deshidrogenasa sobre la endógena, produciendo de esta manera ATP con altos rendimientos. La cepa de corinebacterias de la presente invención está modificada para que tenga una actividad malato deshidrogenasa mayor que la actividad endógena, lo que da como resultado un aumento de la productividad de ATP.

- 15 La expresión “malato deshidrogenasa”, como se utiliza en el presente documento, significa una enzima que cataliza la conversión de malato en oxaloacetato por deshidrogenación. Esta enzima se encuentra en un amplio espectro de organismos vivos acompañada por la lactato deshidrogenasa y necesita para su actividad DPN y NAD como cofactores, estos se acompañan habitualmente por lactato deshidrogenasa. En la cepa de corinebacterias de acuerdo con la presente invención, la actividad de la malato deshidrogenasa está aumentada para producir ATP con alto rendimiento, lo que da como resultado un aumento de la productividad de GMP.

- 20 Como se utiliza 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 La expresión “mayor que la actividad endógena” significa el aumento de la actividad enzimática en comparación con la actividad de la variedad endógena, tanto si resulta de un aumento de la actividad de la enzima por sí misma o por un gen endógeno o por un gen ajeno. Por ejemplo, se puede conseguir un aumento de la actividad enzimática por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a, el aumento o disminución del número de copias genéticas, sustitución, modificación o mutación de un promotor de interés, etc.

- 30 La enzima malato deshidrogenasa diana cuya actividad se desea aumentar de acuerdo con la presente invención está codificada por el gen m_{qo} de corinebacterias. Siempre que sea biológicamente idéntico o se corresponda con el gen m_{qo}, se puede utilizar cualquier derivado o análogo en la presente invención. Es decir, si su actividad es sustancialmente la misma o similar a la del gen m_{qo}, cualquier gen que entre en el intervalo del gen m_{qo} es útil en la presente invención. De manera ventajosa, el gen útil en la presente invención comparte al menos un 70%, más preferentemente al menos un 80%, incluso más preferentemente un 90%, incluso mucho más preferentemente un 95%, y más preferentemente al menos un 98% de homología con la secuencia del gen m_{qo}. De manera más ventajosa, la malato deshidrogenasa está codificada por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7. El aumento de copias genéticas se puede conseguir por la introducción de genes exógenos y/o la amplificación de los genes endógenos. El número de copias del gen pueden determinarlos fácilmente los expertos en la técnica de acuerdo con las necesidades y los fines. La amplificación del gen endógeno se puede llevar a cabo también utilizando un procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, por cultivo en un medio selectivo adecuado bajo presión. En un ejemplo preferido, se introduce un vector que porta el gen que codifica la malato deshidrogenasa en una cepa de corinebacterias para generar un microorganismo transformado con un aumento por encima de la actividad endógena.

- 45 Siempre que se conozca en la técnica y pertenezca al género de corinebacterias, se puede utilizar cualquier cepa en la presente invención sin limitación. Preferentemente, ejemplos de cepas de corinebacterias útiles en la presente invención incluyen *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, y *Brevibacterium lactofermentum*, pero no se limita a estas. En detalle, entre las cepas de corinebacterias están *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 las mismas. Se prefiere la *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304 transformada a partir de la *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530.

- 50 Se puede utilizar un vector recombinante que porte un gen m_{qo} para generar un microorganismo capaz de producir ATP con alto rendimiento.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “gen m_{qo}”, una abreviatura de gen de la “malato:quinona oxidorreductasa”, significa un gen que codifica malato oxaloacetato que funciona oxidando el malato a oxaloacetato.

- 55 Se puede utilizar en la presente invención cualquier vector recombinante habitual, siempre que porte el gen m_{qo}, sin limitación. Es preferible el pDZ-m_{qo}. En un ejemplo preferido de la presente invención, se empleó el gen m_{qo} que

contiene la SEQ ID NO. 7 para construir un vector pDZ-mqo recombinante (véase la FIG. 1).

El término “vector”, como se utiliza en el presente documento, significa una molécula de ADN que se utiliza como un vehículo para transferir material genético ajeno en una célula hospedadora adecuada y es una construcción de ADN que contiene elementos reguladores que permiten a un transgén recombinarse con un genoma hospedador. Preferentemente, el vector recombinante que porta el gen mqo según la presente invención puede tener la estructura que se muestra en el mapa de escisión de la FIG. 1. El vector representado por el mapa de escisión de la FIG. 1 puede introducirse en corinebacterias secuencial o simultáneamente. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el vector recombinante se transforma en la *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM- 10530 que entonces se cultiva en un medio selectivo para permitir que se incorporen dos copias del gen mqo en el genoma del hospedador por medio de recombinación homóloga, lo que resulta en la generación de una *Corynebacterium ammoniagenes* mutante, que se llama *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304. Que se depositó con el número de registro KCCM10972P.

De acuerdo con otro aspecto de la misma, la presente divulgación se refiere a una cepa de corinebacterias transformada con un vector recombinante que porta un gen mqo. El gen mqo derivado de corinebacterias puede utilizarse usando un procedimiento de transformación que se conozca en la técnica sin limitación. Preferentemente, el gen mqo se clona en un vector para su uso en la transformación dentro de las células.

Se puede emplear cualquier procedimiento para la transformación que se conozca en la técnica. Como se utiliza en el presente documento, el término “transformación” es la alteración genética de una célula que resulta de la captación, incorporación genómica y expresión de un ADN ajeno. Los procedimientos típicos de transformación incluyen la precipitación en CaCl₂, un procedimiento de Hanahan en el que el efecto de la precipitación en CaCl₂ se mejora por combinación con DMSO (dimetilsulfóxido), electroporación, transfección en fosfato cálcico, fusión en 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 inhibición/desecación. La transformación con pDZ-mqo de acuerdo con la presente invención no se limita a los ejemplos de transformación, sino que se puede conseguir utilizando cualquier procedimiento que se conozca en la técnica sin limitación.

La *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10972P tiene dos copias del gen mqo incorporadas en el genoma de la misma como resultado de la introducción en su interior del pDZ-mqo que tiene la estructura que se muestra en el mapa de escisión de la FIG. 1 y la recombinación homóloga de dos copias del gen mqo con el gen endógeno.

De acuerdo con un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir GMP, que comprende: (a) cultivar la cepa de corinebacterias que tiene aumentada la actividad malato deshidrogenasa por encima de la actividad endógena, produciendo de esta manera ATP con alto rendimiento, en el que la malato deshidrogenasa está codificada por un gen mqo de *Corynebacterium*, la actividad de malato deshidrogenasa se aumenta aumentando el número de copias del gen mqo o sustituyendo el promotor del gen mqo; (b) producir XMP en el cultivo; (c) añadir al cultivo una enzima o microorganismo que tiene actividad de aminación del XMP; y (d) obtener GMP del cultivo. En la presente invención, el XMP se produce con un alto rendimiento a partir del microorganismo transformado y luego se convierte en GMP en presencia de una XMP aminasa o un microorganismo que tiene actividad de aminación de XMP. Preferentemente, el microorganismo transformado es la cepa de corinebacterias que tiene un aumento de la actividad malato deshidrogenasa sobre la actividad endógena.

Se puede utilizar cualquier medio conocido en la técnica sin limitación en el cultivo de la cepa capaz de producir XMP o GMP. Preferentemente, el medio contiene glucosa como fuente de carbono y opcionalmente otras varias fuentes de carbono. Para su uso en el cultivo de un microorganismo de interés, un medio debe cumplir las necesidades de crecimiento del microorganismo. Los medios de cultivo para las cepas de corinebacterias se conocen en la técnica (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., EE. UU., 1981). Ejemplos de las fuentes de carbono útiles para las cepas de corinebacterias incluyen azúcares y carbohidratos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón, celulosa, etc., aceites y lípidos tales como el aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de coco, etc., ácidos grasos tales como el ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, etc., alcoholes tales como glicerol, etanol, etc., y ácidos orgánicos tales como el ácido acético. Estas fuentes de carbono se pueden utilizar individualmente o en combinación. Se pueden utilizar 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 el cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico, individualmente o en combinación, como fuentes de nitrógeno en el medio. Puede ser útil como fuente de fósforo, el fosfato dihidrógeno potásico o el fosfato hidrógeno potásico, o las sales sódicas correspondientes. Además, el medio de cultivo puede contener sales metálicas tales como el sulfato magnésico, sulfato férrico, etc. Además, se pueden necesitar aminoácidos y/o vitaminas como elementos esenciales. El medio de cultivo también puede contener precursores adecuados. Estos materiales pueden añadirse al medio de una manera discontinua o de una manera continua.

Puede ajustarse el pH del medio de cultivo por compuestos básicos tales como el hidróxido sódico, hidróxido potásico, amoniaco, etc. o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Se puede utilizar un agente antiespumante tal como un éster poliglicólico de ácido graso para evitar la generación de burbujas durante el

cultivo. El medio se puede airear con oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) para mantener la condición aeróbica o con gas nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono para mantener la condición anaeróbica. La temperatura de cultivo se mantiene habitualmente a 20 °C ~ 45 °C, y preferentemente a 30 °C ~ 35 °C. El cultivo continúa hasta que se obtiene la máxima cantidad de XMP o GMP. A este respecto, se necesita un periodo de tiempo de desde 10 a 160 horas.

El microorganismo que tiene actividad de aminación de XMP útil en la presente invención puede ser *Escherichia coli*. La *E. coli* que tiene actividad de aminación de XMP se puede cultivar utilizando cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica. El medio de cultivo para la *E. coli* puede contener varios nutrientes que incluyen fuentes de nitrógeno inorgánico tales como amoníaco, cloruro amónico, sulfato amónico, etc., fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, agua de macerado de maíz, hidrolizado de caseína, pescado o harina de pescado, aglutinado o harina de soja desgrasada, y compuestos inorgánicos tales como fosfato monohidrógeno de potasio, fosfato dihidrógeno de potasio, sulfato magnésico, sulfato ferroso, sulfato de manganeso, y carbonato cálcico. Si es necesario se pueden utilizar vitaminas y bases auxotróficas. Para el cultivo, se puede utilizar un cultivo con agitado o removido para la aireación. La temperatura del cultivo varía desde 30 a 45 °C, y preferentemente desde 37 a 40 °C. Durante el cultivo, es preferible que el pH se ajuste a un nivel casi neutro. El periodo de cultivo es de 1 a 2 días. Como resultado, el microorganismo que tiene actividad de aminación de XMP se acumula en el medio de cultivo.

En la presente invención, se añade un medio de cultivo que contiene XMP al cultivo de *E. coli* que tiene actividad de aminación de XMP para convertir el XMP en GMP. A este respecto, se puede conseguir la conversión de XMP en GMP con un compuesto que aumente la permeabilidad de membrana de XMP, tal como el xileno. El xileno facilita la entrada de XMP del medio de cultivo en la cepa productora de GMP. Los compuestos útiles para el aumento de la permeabilidad de membrana al XMP se conocen bien en la técnica. Ejemplos de tales compuestos incluyen un material hidrófobo (por ejemplo, xileno, tolueno, benceno, etil acetato), un tensioactivo (tensioactivos catiónicos, por ejemplo, polioxietileneestearilamina, bromuro de cetiltrimetilamonio, Cation FB y Cation F2-40E; tensioactivos aniónicos, por ejemplo, sulfato de oleilamida sódica, Newrex TAB, y Rapizol 80) y un ion metálico (por ejemplo, ion cálcico, ion magnésico), pero no se limitan a los mismos. La cantidad de compuesto para aumentar la permeabilidad de membrana al XMP varía dependiendo de las características del mismo, y la pueden ajustar apropiadamente los expertos habituados en la técnica.

El GMP producido de esta manera puede segregarse al medio de cultivo o permanecer en la célula. El procedimiento de producción de GMP de acuerdo con la presente invención comprende la recuperación de GMP a partir de las células o del medio de cultivo. Para la recuperación del GMP a partir de las células o el medio de cultivo, se puede utilizar cualquier procedimiento bien conocido en la técnica. Ejemplos de tales procedimientos incluyen filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización, y HPLC, pero no se limitan a estos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "guanósín monofosfato" es un nucleótido, compuesto por guanósina y fosfato, que se encuentra en el ARN. El resto de fosfato puede posicionarse en 5', 3' o 2', que se denomina forma 5', 3' o 2', respectivamente. En la presente invención, el GMP (5'-guanósín fosfato) se produce como un cristal incoloro con forma de agujas, y existe en forma libre en el cuerpo. Tiene una fórmula molecular $C_{10}H_{14}N_5O_8P$. El guanósín monofosfato en forma de sus sales, tales como guanilato disódico, guanilato dipotásico y guanilato cálcico, son aditivos alimentarios que se utilizan como potenciadores del sabor basados en ácidos nucleicos para proporcionar el sabor a setas. Cuando se utiliza el microorganismo transformado de acuerdo con la presente invención, el GMP se puede producir con un alto rendimiento que se encuentra con una mejora de aproximadamente un 8,5% en comparación con los microorganismos convencionales.

Efectos ventajosos

La cepa de corinebacterias transformada con el vector recombinante de acuerdo con la presente invención, muestra una mejora de la actividad malato deshidrogenasa y por lo tanto produce ATP con alto rendimiento. Cuando se aplica a la conversión en GMP a partir de XMP, la cepa transformada de la presente invención permite una mayor productividad de GMP que los microorganismos convencionales.

Descripción de los dibujos

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

Modo de la invención

Se puede obtener un mejor entendimiento de la presente invención por medio de los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero no deben concebirse como limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1: Clonación del m_{qo} derivado de la cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530 productora de XMP y construcción del vector recombinante (pDZ-m_{qo}) para la incorporación genómica

La secuencia de nucleótidos del gen m_{qo} (NCBI ID_3345228) se obtuvo a partir de los datos del NIH GenBank. Basándose en la secuencia, se sintetizaron dos pares de cebadores (SEQ ID NO. 1 a 4).

- 5 Mientras que el genoma de *Corynebacterium* KCCM-10530 funcionaba como matriz, se llevó a cabo la PCR en presencia de la ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™ (Stratagene) utilizando los cebadores de las SEQ ID NO. 1 a 4, con 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 seg y extensión a 68 °C durante 2 min. Los productos de la PCR obtenidos de esta manera eran dos copias del gen m_{qo}, cada uno de 2,1 kb de longitud (m_{qo}-A, m_{qo}-B), que se amplificaron utilizando dos grupos de SEQ ID NO. 1 y 2, y SEQ ID NO. 3 y 4, respectivamente.

SEQ ID NO: 1; gctctagaATCGGTCATTCCATGAACCC
 SEQ ID NO: 2; cgcgatccCATCGATATCGCCAACTCCA
 SEQ ID NO: 3; cgcgatccATCGGTCATTCCATGAACCC
 SEQ ID NO: 4; gctctagaCATCGATATCGCCAACTCCA

- 15 Tras tratarse con las enzimas de restricción adecuadas (m_{qo}-A: XbaI + BamHI, m_{qo}-B: BamHI + XbaI), se insertaron los productos de la PCR m_{qo}-A y m_{qo}-B en el vector pDZ que se había tratado previamente con XbaI y fosfatasa alcalina de camarón, por medio de la unión de tres piezas (véase Solicitud de Patente coreana N° 10-2007-94433). Finalmente, se obtuvo un vector recombinante pDZ-m_{qo} en el que se clonaron dos copias del gen m_{qo} para su incorporación en el genoma de *Corynebacterium*.

20 Ejemplo 2: Generación de una cepa con m_{qo} insertado

- La construcción del vector pDZ-m_{qo} se transformó en la cepa KCCM-10530 y se sometió a recombinación con el genoma para insertar una copia genética de m_{qo} en una posición adyacente al gen m_{qo} del genoma. De esta manera, se obtuvo una nueva cepa productora de XMP, llamada *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304, que tenía dos copias del gen m_{qo} en el genoma de la misma. La inserción de dos copias del gen m_{qo} en tándem se identificó utilizando una PCR que utilizaba un grupo de cebadores (SEQ ID NO. 5 y 6) que se dirigían a secuencias de nucleótidos corriente arriba y corriente abajo de las dos copias del gen m_{qo}.

SEQ ID NO. 5: CTTTTCGATGACGCCCAA
 SEQ ID NO. 6: CCACTTTATCGGGTGAGACCA

Ejemplo 3: Actividad malato deshidrogenasa de la cepa con inserción de m_{qo}

- 30 La *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304 productora de XMP que se preparó en el Ejemplo 2 se ensayó en cuanto a su actividad malato deshidrogenasa de la siguiente manera. La cepa se inoculó en un medio que contenía 10 g/l de bactopectona, 5 g/l de extracto bacto-carne, 5 g/l de extracto bacto-levadura, 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 lavaron dos veces con un tampón que comprendía 50 mM de HEPES, 10 mM de acetato potásico, 10 mM de CaCl₂ y 10 mM de MgCl₂, y se suspendieron en 1 ml del mismo tampón. Tras la interrupción con el uso de un sonicador, el lisado celular se centrifugó. El sobrenadante se re-centrifugó para dar un aglomerado que se suspendió entonces en 100 µl de tampón. Se utilizaron 10 µl de esta suspensión como una solución enzimática. Se preparó un tampón de reacción mezclando 50 mM de HEPES, 10 mM de acetato potásico y 50 µM de 2,6-dicloroindolofenol (Cl₂Ind). El Cl₂Ind se descongeló y se 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 por incubación a 30 °C durante 15 min con agitado. La actividad enzimática se determinó midiendo la concentración de Cl₂Ind reducido. El Cl₂Ind tiene un coeficiente de absorción de 22 cm⁻¹mM⁻¹ a 600 nm.

[Tabla 1]

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

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

Ejemplo 4: Nivel de ATP en la cepa con inserción de m_{qo}

La *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304 productora de XMP que se preparó en el Ejemplo 2 se midió en cuanto al nivel intracelular de ATP de la siguiente manera.

La cepa madre *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530 y la KCJ-1304 se inocularon en respectivos tubos de 14 ml, que contenía cada uno 3 ml del medio de siembra posterior, y se incubaron a 30 °C durante 20 h con agitado a 200 rpm. Luego, se añadió una cantidad de 0,4 ml de los cultivos de siembra a 25 ml del medio de siembra en respectivos matraces de 250 ml con deflectores en las esquinas, seguido por cultivo con agitado a 30 °C y 230 rpm durante 20 h. Se midió la DO y los niveles de ATP de los cultivos celulares. Se descubrió que la KCJ-1304 mutante producía ATP a una tasa mayor por DO que la cepa madre KCCM-10530, indicando que la cepa mutante de la presente invención podía presentar una mayor productividad de GMP en comparación con la cepa madre. Los resultados se resumen en la Tabla 2, a continuación.

[Tabla 2]

Cepa	DO(A562)	Nivel de ATP (µM)	Nivel de ATP/DO
KCCM-10530	20,76	32,92	1,59
KCJ-1304	21,44	69,74	3,25

Como se muestra en la Tabla 2, el nivel intracelular de ATP por DO de KCJ-1304 aumentó aproximadamente un 104% en comparación con el de la cepa madre KCCM-10530.

Ejemplo 5: Fermentación de XMP y producción de GMP de la cepa con inserción de mqo

La cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1304 que se preparó en el Ejemplo 2 se cultivó para producir GMP de la siguiente manera.

La cepa madre de *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530 y la KCJ-1304 mutante se inocularon en respectivos tubos de 14 ml, que contenía cada uno 3 ml del medio de siembra posterior, y se incubaron a 30 °C durante 20 horas con agitado a 200 rpm. Luego, se añadió una cantidad de 0,4 ml de los cultivos sembrados a 32 ml del medio de producción posterior (24 ml de medio principal + 8 ml de medio A) en respectivos matraces de 250 ml con deflectores en las esquinas, seguido por cultivo con agitado a 30 °C y 230 rpm durante 96 h. Con el fin de someter el XMP producido de esa manera a la conversión en GMP, se añadieron los aditivos de conversión posteriores y XMP aminosasa de *E. coli* a los matraces de Erlenmeyer, tras lo cual se llevó a cabo una reacción de conversión a 40 °C durante 4 h. Se descubrió que la KCJ-1304 mutante aumentó la tasa de conversión, que representa la producción de GMP por XMP consumido, en comparación con la cepa madre KCCM-10530. Es decir, la cepa mutante de la presente invención es mejor en productividad de GMP en comparación con la cepa convencional. Los resultados se resumen en la Tabla 3, a continuación.

[Tabla 3]

Cepa	Nivel (g/l)		Tasa de conversión (%) (GMP producido/XMP consumido)
	XMP	GMP	
KCCM-10530	28,6	21,2	74,1
KCJ-1304	30,3	23,0	75,9

Como es evidente a partir de los datos de la Tabla 3, se descubrió que la KCJ-1304 aumentaba la tasa de conversión en un 2,4% y el nivel de GMP en un 8,5% en comparación con la cepa madre KCCM-10530.

Medio de siembra: glucosa 30 g/l, peptona 15 g/l, extracto de levadura 15 g/l, NaCl 2,5 g/l, urea 3 g/l, adenina 150 mg/l, guanina 150 mg/l, pH 7,2

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

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

Aditivo de conversión: ácido fítico 1,8 g/l, MgSO₄ 4,8 g/l, nymeen 3 µg/l, xileno 2%, adenina 100 mg/l, Na₂HPO₄ 7,7 g/l, glucosa 46 g/l.

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> UNA CEPA DE CORINEBACTERIAS PARA EL AUMENTO DE LA PRODUCTIVIDAD DE 5'-GUANOSÍN MONOFOSFATO Y UN PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE 5'-GUANOSÍN MONOFOSFATO UTILIZANDO LA MISMA

<130> R 59484

<140> EP 09833644.9
<141> 17-12-2009

<150> KR10-2008-0128846
<151> 17-12-2008

5 <160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 28
<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo para mqo-A

<400> 1

**gctctagaat cggtcattcc atgaaccc
28**

15 <210> 2

<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador inverso para mqo-A

<400> 2

**cgcggatccc atcgatatcg ccaactcca
29**

25 <210> 3

<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo para mqo-B

<400> 3

**cgcggatcca tcggtcattc catgaaccc
29**

30 <210> 4

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

35 <220>
<223> cebador inverso para mqo-B

<400> 4

**gctctagaca tcgatatcgc caactcca
28**

40 <210> 5
<211> 18
<212> ADN

ES 2 567 278 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo para detectar mqo

<400> 5

cttttcgatg acgcccaa
18

5

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> cebador inverso para detectar mqo

<400> 6

ccactttatc gggtgagacc a
21

15

<210> 7

<211> 1503

<212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 7

ES 2 567 278 T3

atgtcagatt ccccgaagaa cgcaccgagg attacgatg aggcagatgt agttctcatt
60

ggtgccggta tcatgagctc cacgctgggt gcaatgctgc gtcagctgga gccaaagctgg
120

actcagatcg tcttcgagcg tttggatgga ccggcacaag agtcgtcctc cccgtggaac
180

aatgcaggaa ccggccactc tgctctatgc gagctgaact acaccccaga ggtaagggc
240

aaggttgaaa ttgccaaggc tntaggaatc aacgagaagt tccaggtttc ccgtcagttc
300

tggtctcacc tcgttgaaga gggagtgctg tctgatccta aggaattcat caaccctgtt
360

cctcacgtat ctttcggcca gggcgcagat caggttgcat acatcaaggc tcgctacgaa
420

gctttgaagg atcaccact cttccagggc atgacctac 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 tgttcgtcgg cgcaggcggg tacgcaactg atctgcttcg cagcgcaggc
780

atcccacagg tcaagggctt cgctggattc ccagtatccg gcctgtggct tcgttgcacc
840

aacgaggaac tgatcgagca gcacgcagcc aaggtatatg gcaaggcatc tgttggcgt
900

cctccaatgt ctgttcctca ccttgacacc cgcgttatcg agggtgaaaa gggctctgctc
960

ES 2 567 278 T3

tttggacctt acggtggctg gaccctaag ttcttgaagg aaggctccta cctggacctg
1020

ttcaagtcca tccgcccaga caacattcct tcctaccttg gcgttgctgc tcaggaattt
1080

gatctgacca agtaccttgt cactgaagtt ctcaaggacc aggacaagcg tatggatgct
1140

cttcgagagt acatgccaga ggcacaaaac ggcgattggg agaccatcgt tgccggacag
1200

cgtgttcagg ttattaagcc tgcaggattc cctaagttcg gttccctgga attcggcacc
1260

accttgatca acaactccga aggcaccatc gccggattgc tcggtgcttc ccctggagca
1320

tccatcgac cttccgcaat gatcgagctg cttgagcgtt gcttcggtga ccgcatgac
1380

gagtggggcg acaagctgaa ggacatgac ccttcctacg gcaagaagct tgcttccgag
1440

ccagcactgt ttgagcagca gtgggcacgc acccagaaga ccctgaagct tgaggaagcc
1500

taa
1503

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de guanosín 5'-monofosfato (GMP), que comprende:
 - 5 (a) cultivar una cepa de corinebacterias con productividad de ATP mejorada que tiene mayor actividad malato deshidrogenasa que la de la cepa de corinebacterias de tipo silvestre, para preparar de esta manera una solución de cultivo que incluye ATP y xantosín 5'-monofosfato (XMP), en la que la malato deshidrogenasa está codificada por un gen m_{qo} de *Corynebacterium*, se aumenta la actividad malato deshidrogenasa aumentando el número de copias del gen m_{qo} o sustituyendo un promotor del gen m_{qo};
 - 10 (b) mezclar la solución de cultivo con XMP aminasa o un microorganismo que tenga actividad XMP aminasa y cultivar la mezcla resultante, para de esta manera convertir el XMP en GMP; y
 - (c) obtener GMP de la mezcla.
2. El procedimiento de acuerdo con reivindicación 1, en el que el aumento de la actividad malato deshidrogenasa resulta de un aumento de la expresión de m_{qo}.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la cepa se transforma con un vector
15 recombinante que porta dos copias de genes m_{qo} en tándem.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cepa es de *Corynebacterium ammoniagenes*.

[Fig. 1]

