

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 531**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 9/78** (2006.01)

**C12P 19/26** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2009 E 09822192 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2348101**

54 Título: **Microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene capacidad para producir N-acetilglucosamina y método para producir N-acetilglucosamina o glucosamina usando el mismo**

30 Prioridad:

**20.10.2008 KR 20080102633**

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

**28.09.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HONG, KUK-KI;  
CHUNG, JIN-SU;  
SHIN, SOOAN;  
PARK, HYERAN y  
JO, JAEHYUN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 584 531 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene capacidad para producir N-acetilglucosamina y método para producir N-acetilglucosamina o glucosamina usando el mismo

5

**Antecedentes de la invención**

## 1. Campo de la invención

10 La invención se refiere a un microorganismo genéticamente modificado del género *Corynebacterium* que produce N-acetilglucosamina, y un método para producir N-acetilglucosamina o glucosamina usando el mismo.

En particular, la invención se refiere a

15 un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene capacidad para producir N-acetilglucosamina, en donde el microorganismo tiene una actividad glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa y una actividad glucosamina-6-fosfato desaminasa reducida o delecionada comparada con un microorganismo de tipo salvaje, en donde la glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa se expresa constitutivamente y en donde el microorganismo es seguro para seres humanos y animales y a

20

un método para producir N-acetilglucosamina o glucosamina, que comprende los pasos de:

(a) cultivar los microorganismos del género *Corynebacterium* que tienen capacidad de producir N-acetilglucosamina de la invención y

25 (b) recoger la N-acetilglucosamina o glucosamina producida en el paso de cultivo.

## 2. Descripción de la técnica relacionada.

30 La glucosamina es un derivado amino de glucosa, y la N-acetilglucosamina es un derivado acetilado de glucosamina. Son constituyentes importantes de muchos polisacáridos naturales, y pueden formar materiales estructurales para células, constituyendo la pared celular.

35 La N-acetilglucosamina es un componente importante de la síntesis de proteínas, está implicada en la regeneración de tejidos, y por tanto, la N-acetilglucosamina tiene potencial terapéutico en la prevención y tratamiento de una amplia variedad de enfermedades tal como gastritis, alergias alimenticias, enfermedad intestinal inflamatoria (EII), diverticulitis, y formas agudas y crónicas de artritis reumatoide y artrosis, así como los estados patológicos que surgen de trastornos metabólicos de los tejidos osteoarticulares. La glucosamina también se usa como un alimento funcional aplicado para para la prevención y tratamiento de enfermedades osteoartíticas humanas.

40 La glucosamina se obtiene por hidrólisis ácida de quitina, un hidrato de carbono complejo derivado de N-acetilglucosamina. Alternativamente, la glucosamina también se puede producir por hidrólisis ácida de quitosanos. La materia prima, quitina, es un copolímero de N-acetilglucosamina y glucosamina, y es una sustancia natural común encontrada en artrópodos y hongos. La quitina se puede obtener de desechos de artrópodos (exoesqueletos de langosta, gamba, krill, cangrejo y langostino) y más recientemente de fuentes baratas como biomasa fúngica usada en la producción de ácido cítrico.

45 La práctica industrial común es purificar la quitina tratándola con combinaciones de ácidos y bases para eliminar otras impurezas acompañantes minerales, proteínas, etc., y después despolimerizar y desacetilar la quitina en un único paso a glucosamina mediante el uso de ácido clorhídrico concentrado con bajos rendimientos a alta temperatura durante un tiempo largo. La glucosamina como base libre es muy inestable y objeto de degradación. En consecuencia, se producen sales estables tal como clorhidrato.

50 El contenido en glucosamina en desechos de artrópodos y biomasa fúngica es bajo y, por tanto, se producen grandes volúmenes de residuos. La glucosamina es considerablemente cara debido a que el proceso de producción mismo tiene un rendimiento relativamente bajo es intenso en energía y químicamente. Además, con las formas comunes de glucosamina, que derivan de crustáceos, se sabe que existe potencial para reacciones alérgicas en personas sensibles al marisco. Además, la disponibilidad de materia prima (por ejemplo, una fuente de quitina, tal como caparazones de cangrejo) se vuelve gradualmente limitada. Por tanto, hay una necesidad para un método rentable para producir glucosamina y N-acetilglucosamina en altos rendimientos para venta comercial y uso.

55 60 La publicación PCT No. WO 02/66667 divulga un método de hacer glucosamina a partir de biomasa microbiana para eliminar la posibilidad de reacciones alérgicas. Este método de producción salva problemas asociados con alergia al marisco, pero padece un problema principal de bajo rendimiento. Más particularmente, puesto que el método se basa en los residuos de biomasa generados en la fermentación de otros productos tal como ácido cítrico, no es suficiente para producir cantidades suficientes de glucosamina que cumplan la demanda creciente del mercado para el producto.

65

Mientras tanto, la N-acetilglucosamina se produce actualmente mediante la acetilación de glucosamina usando un reactivo de acetilación orgánico tal como anhídrido acético, pero este método de producción requiere altos costes. Además, debido al bajo rendimiento de producción, no es fácil producir N-acetilglucosamina a gran escala. Para superar estos problemas, el documento WO 2004/003175 y la patente en EE UU No. 7.332.304 divulgan un método de producir N-acetilglucosamina por fermentación de *E. coli*. Este método sugiere la fermentación de *E. coli* para un alto rendimiento de producción de N-acetilglucosamina que resuelve drásticamente los problemas encontrados incluyendo el bajo rendimiento de producción de N-acetilglucosamina debido al proceso convencional complicado. Además, se sabe que la glucosamina se puede producir de la desacetilación de N-acetilglucosamina por simple tratamiento ácido (Novikov V.Y. *et al.* Russ. J. Appl. Chem. 1997:1467-1470), y por tanto también es posible producir glucosamina en un alto rendimiento.

Sin embargo, este método no es adecuado para la producción de alimentos naturales, porque el uso de *E. coli* genera endotoxinas potencialmente tóxicas. Además, la glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa, esencial para la producción de N-acetilglucosamina (véase la figura 1: GNA1), no existe en *E. coli*, y por tanto se deben introducir otros microorganismos tal como levadura. Hay una limitación en que la expresión de la enzima crucial requiere un sistema de expresión inducible (Deng M.D. *et al.* Met Eng. 2005:201-214). La expresión no regulada de la enzima crucial produce inhibición grave de la proliferación celular. El sistema de expresión inducible es desventajoso en que se necesita un material inductor, lo que produce un aumento en los costes de producción y se debe determinar un punto de tiempo de inducción, y por tanto se considera que no es adecuado para la producción industrial mediante fermentación a gran escala. En términos de seguridad de producción y posibilidad de adaptación industrial, el método anterior tiene una desventaja de usar *E. coli* y un sistema de expresión inducible.

Hasta ahora, la tecnología de fermentación de *E. coli* se ha desarrollado para superar los problemas de la disponibilidad limitada de materias primas y bajo rendimiento de producción. Sin embargo, no ha habido cepas, adecuadas para la producción de N-acetilglucosamina y glucosamina, que sean seguras para seres humanos y animales. Además, no ha habido artículos de una cepa de producción que utilice un sistema de expresión constitutivo diferente de un sistema de expresión inducible para facilitar la producción enzimática industrial.

En contraste a *E. coli*, se sabe que *Corynebacterium* es no patógena y que no tiene endotoxinas peligrosas (Srivastava P. y Deb J.K., Protein Expression and Purification 40(2005) 221-229 y documento US 2007/0269872). *Corynebacterium glutamicum* ya se ha usado para la producción industrial de lisina (Becker J. *et al.*, Applied and Environmental Microbiology Vol. 71, No. 12 (2005) 8587-8596).

Para resolver los problemas anteriores, se ha desarrollado un microorganismo del género *Corynebacterium* para la fermentación a gran escala de N-acetilglucosamina y glucosamina sin producir problemas medioambientales, capaz de realizar estabilidad de producción y aplicación industrial, y un método para producir N-acetilglucosamina y glucosamina usando el mismo, completando de esta manera la invención.

#### 40 **Compendio de la invención**

Es un objeto de la invención proporcionar un microorganismo genéticamente modificado del género *Corynebacterium* que produce N-acetilglucosamina, y preferiblemente un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene actividad glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa y actividad glucosamina-6-fosfato desaminasa reducida o delecionada.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un método para producir N-acetilglucosamina o glucosamina usando el microorganismo del género *Corynebacterium*.

#### 50 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 ilustra la ruta biosintética de N-acetilglucosamina y la modificación génica en la cepa productora de N-acetilglucosamina, en la que nagA se inactiva y se amplifica un gen GNA1 exógeno;

La figura 2 ilustra una estructura del vector pDZ-nagA1ST, en el que se clona nagA1 que tiene un codón de terminación en pDZ;

La figura 3 ilustra una estructura del vector pECCG117-PEFTU-GNA1, en el que el promotor de expresión constitutiva PEFTU se clona en primer lugar en un vector pECCG117, y GNA1 se clona adicionalmente en el mismo; y

La figura 4 ilustra una estructura del vector pVWEx2-GNA1, en el que GNA1 se clona en un vector pVWEx2.

#### 65 **Descripción detallada de las formas de realización preferidas**

5 En un aspecto, la invención se refiere a un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una capacidad para producir N-acetilglucosamina y glucosamina, en el que el microorganismo tiene una actividad glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa constitutivamente expresada y una actividad glucosamina-6-fosfato desaminasa reducida o delecionada comparado con un microorganismo de tipo salvaje, en donde el microorganismo es seguro para seres humanos y animales.

10 En la invención, glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa se refiere a una enzima para producir N-acetilglucosamina-6-fosfato a partir de la acetilación de glucosamina-6-fosfato. Esta enzima se encuentra en los microorganismos del género *Saccharomyces*, pero no en los microorganismos del género *Corynebacterium*.

15 Como se usa en el presente documento, el término “que tiene una actividad glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa” o “un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una actividad glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa” significa que el gen de la glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa no presente en los microorganismos del género *Corynebacterium* se introduce en un microorganismo del género *Corynebacterium* para expresar glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa y, por tanto, el microorganismo del género *Corynebacterium* puede convertir N-glucosamina-6-fosfato a N-acetilglucosamina-6-fosfato usando la enzima.

20 El método de impartir la actividad glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa al microorganismo del género *Corynebacterium* por introducción del gen se puede realizar por una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. En la forma de realización específica de la invención, la secuencia de ácido nucleico que codifica la glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa se introduce en un vector, y el vector recombinante se usa para transformar el microorganismo del género *Corynebacterium*.

25 El gen de la glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa es cualquier gen que tiene una secuencia de ácido nucleico que está operativamente unida en el microorganismo del género *Corynebacterium*. En una forma de realización específica, el gen es un gen derivado de *Saccharomyces cerevisiae* y, preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 11. En particular, la secuencia que codifica la glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa se puede modificar en algún grado siempre que retenga su actividad. Los expertos en la materia entenderán fácilmente que la secuencia de ácido nucleico que retiene el 70% o más de homología por la modificación artificial es equivalente a la derivada de la secuencia de ácido nucleico de la invención, siempre que retenga la actividad génica deseada en la invención.

35 Preferiblemente, un promotor está operativamente unido al gen de glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa de la invención de modo que induce la expresión del gen. Más preferiblemente, con respecto a los objetos de la invención, el promotor es un promotor para inducir la expresión constitutiva de glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa por el microorganismo del género *Corynebacterium*, y el promotor es cualquier gen que sea capaz de inducir la expresión constitutiva de glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa introducido en el microorganismo del género *Corynebacterium*. En una forma de realización específica, el promotor constitutivo es un promotor de EFTU.

40 Cuando se induce la expresión de glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa en *E. coli* en un estadio temprano del crecimiento, se produce inhibición del crecimiento grave y, por tanto, se debe usar solo un sistema de expresión inducible (Deng M.D. *et al.* Met Eng. 2005:201-214). Por el contrario, el microorganismo del género *Corynebacterium* de la invención tiene una ventaja que su crecimiento no está afectado por la expresión constitutiva de la enzima.

45 Como se usa en el presente documento, el término “glucosamina-6-fosfato desaminasa” se refiere a una enzima implicada en la conversión de acetilglucosamina-6-fosfato a glucosamina-6-fosfato. Para los objetos de la invención, el microorganismo del género *Corynebacterium* de la invención se caracteriza en que muestra expresión menor o nula del gen que codifica la glucosamina-6-fosfato desaminasa, comparado con el gen natural, debido a la deleción/mutación parcial o total de la secuencia de ácido nucleico que codifica la glucosamina-6-fosfato desaminasa. La menor o falta de expresión del gen que codifica la glucosamina-6-fosfato desaminasa, comparado con el gen natural, debido a la deleción/mutación parcial o total en la secuencia de ácido nucleico que codifica la glucosamina-6-fosfato desaminasa se puede expresar en el presente documento como “reducción” o “deleción”.

50 Para inducir expresión nula o menor del gen de la glucosamina-6-fosfato desaminasa, por ejemplo, se puede producir una mutación en el promotor y las regiones reguladoras localizadas antes del gen estructural. Un casete regulador unido antes del gen estructural también puede ejecutar las mismas funciones. El promotor se puede modificar para reducir la expresión, o la traducción del gen puede estar regulada por estabilidad reducida del ARNm de modo que se reduce la expresión. Además, la actividad de glucosamina-6-fosfato desaminasa se puede reducir o deleccionar por sustitución de una parte o el total del gen con un fragmento delecionado o mutado por tecnología de recombinación de ADN específica de sitio. Sin embargo, es obvio para los expertos en la materia que se puede lograr la expresión nula o menor del gen por una variedad de métodos bien conocidos en la técnica, además de estos métodos.

60 Como se usa en el presente documento, el término “capacidad para producir N-acetilglucosamina” significa que el microorganismo del género *Corynebacterium* de la invención tiene una capacidad para producir y acumular N-acetilglucosamina en el medio en el que se cultiva. Como se usa en el presente documento, el término “capacidad

para producir glucosamina” se refiere a una capacidad para producir glucosamina a partir de un material producido por fermentación microbiana, y se refiere a una capacidad del microorganismo del género *Corynebacterium* de la invención, que produce y acumula glucosamina por desacetilación de N-acetilglucosamina acumulada en el medio de cultivo en glucosamina, según varios métodos conocidos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término “microorganismo que tiene una capacidad para producir N-acetilglucosamina y/o glucosamina” es un microorganismo que pertenece al género *Corynebacterium*. Preferiblemente, el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum* (por ejemplo, ATCC13032), *Corynebacterium ammoniagenes* (por ejemplo, ATCC 6872), *Brevibacterium lactofermentum* (por ejemplo, ATCC13869), *Brevibacterium flavum* (por ejemplo, ATCC14067), *Corynebacterium thermoaminogenes* (por ejemplo, FERM-BP1539), *Corynebacterium efficiens* (por ejemplo, *C. efficiens* cepa YS-314) o similares, pero no está limitado a los mismos. Más preferiblemente, el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*, e incluso más preferiblemente, *Corynebacterium glutamicum* CJNAG1 depositado en KCCM (Centro Coreano de Cultivo de Microorganismo, Eulim Buld., 361-221, Hongje-1-Dong, Seodaemun-Ku, Seúl, 120-861, Corea) el 29 de septiembre, 2008 con el número de registro: KCCM10967P.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para producir N-acetilglucosamina o glucosamina que comprende cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una capacidad para producir N-acetilglucosamina.

En particular, la invención se refiere a un método para producir N-acetilglucosamina o glucosamina, que comprende los pasos de (a) cultivar los microorganismos del género *Corynebacterium* que tienen una capacidad para producir N-acetilglucosamina de la invención y (b) recoger N-acetilglucosamina o glucosamina producida en el paso de cultivo.

El cultivo anterior de la invención se puede realizar mediante un medio y condiciones apropiadas que conocen los expertos en la materia. Los expertos en la materia entienden bien que el método de cultivo se puede usar para ajustar fácilmente el mismo, según la cepa seleccionada. Por ejemplo, los métodos de cultivo incluyen, pero no están limitados a, cultivo por lotes, continuo y lote alimentado. Se describen una variedad de métodos de cultivo en, por ejemplo, la siguiente referencia: "Biochemical Engineering" por James N. Lee, Prentice-Hall International Editions, pp. 138-176. El medio usado en el cultivo tiene que cumplir las condiciones de cultivo para una cepa específica.

El medio usado en la invención contiene glucosa como una fuente principal de carbono, y el medio puede contener una cantidad apropiada de varias fuentes de carbono. La fuente de nitrógeno que se va a usar se ejemplifica por tales fuentes de nitrógeno orgánicas como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maceración de maíz y harina de habas y tal fuente inorgánica de nitrógeno como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar solas o en combinaciones. El medio en el presente documento puede incluir además dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato dipotásico, y las correspondientes sales que contienen sodio como una fuente de fosfato. El medio también puede incluir una sal metálica tal como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, se pueden añadir aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Estos medios o precursores se pueden añadir al cultivo mediante tipo lote o tipo continuo.

Durante el cultivo, se pueden añadir apropiadamente hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico para ajustar el pH de los cultivos. Se pueden añadir apropiadamente agentes desespumantes tal como éster poliglicólico de ácidos grasos para reducir la formación de espumas en los cultivos. Para mantener los cultivos en estados aerobios, se puede inyectar oxígeno o gas que contiene oxígeno en los cultivos. Para mantener los cultivos en estados anaerobios y microaerobio, se puede no inyectar gas, o se puede inyectar gas nitrógeno, hidrógeno, o dióxido de carbono en los cultivos. Los cultivos se mantienen de 30 a 37°C, y preferiblemente de 35 a 37°C. El cultivo se puede seguir hasta que se obtiene una cantidad deseada del material deseado, y preferiblemente durante 10 a 160 horas.

El paso de recoger y/o recuperar la N-acetilglucosamina o glucosamina producida en el paso de cultivo de la invención se puede realizar por un método apropiado conocido en la técnica, dependiendo de los procedimientos de cultivo, por ejemplo, de tipo lotes, de tipo continuo o de tipo lote alimentado, de modo que se recoja la N-acetilglucosamina o glucosamina deseada del medio de cultivo.

Además, la invención puede incluir además el paso de convertir la N-acetilglucosamina recogida a glucosamina por desacetilación. Será aparente para los expertos en la materia que la conversión se puede realizar por el método ampliamente conocido en la técnica (por ejemplo, Novikov V.Y. *et al.* Russ. J. Appl. Chem. 1997:1467-1470).

De aquí en adelante, la invención se describirá en más detalle con referencia a los ejemplos.

**Ejemplo 1: Construcción de mutante de N-acetilglucosamina 6-fosfato desaminasa y vector recombinante de sustitución de ADN cromosómico pDZ-nagAST**

Para prevenir la utilización de N-acetilglucosamina-6-fosfato por *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032) de tipo salvaje, se inactivó nagA1 (NCg12556, SEQ ID NO: 1) que codifica N-acetilglucosamina-6-fosfato desaminasa que utiliza N-acetilglucosamina-6-fosfato como sustrato.

La inactivación se puede realizar por varios métodos tal como delección génica o introducción de secuencia adicional, y en el presente ejemplo, se insertó un codón de terminación en el ORF (marco abierto de lectura) del gen *nagA1* para inducir la inactivación de la traducción del gen.

Específicamente, se aisló un ADN genómico de *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032), y se realizó PCR usando el ADN genómico como un molde y los cebadores de SEQ ID NO. 2 y 3 para obtener el gen que codifica N-acetilglucosamina-6-fosfato desaminasa (*nagA1*: NCg12556).

Cada secuencia de los cebadores usados para amplificar el gen *nagA1* es como sigue.

SEQ ID NO. 2 (*nagA1* - 5)  
5' - GGAATTCATGGCAGAAGTGGTGCATTATCAAG - 3'

SEQ ID NO. 3 (*nagA1* - 3)  
5' - GCTCTAGAGATGATGTCCATGGTCGGACTCC - 3'

Para construir un mutante de N-acetilglucosamina-6-fosfato desaminasa que tiene un codón de terminación en el ORF usando el gen de N-acetilglucosamina-6-fosfato desaminasa de tipo salvaje, se prepararon cebadores adicionales (SEQ ID NO. 4 y 5) para insertar un codón de terminación entre la isoleucina en la posición 196 y la alanina en la posición 197.

Específicamente, se realizó PCR usando el *nagA1* de tipo salvaje obtenido por PCR como molde y cada uno de los cebadores de SEQ ID NO. 2 y 4 y SEQ ID NO. 3 y 5. Dos productos finales eran una parte del *nagA1*, y por tanto tenían la mitad del tamaño del mismo. Estos dos productos se usaron simultáneamente como molde y los cebadores de SEQ ID NO. 2 y 3 se usaron para realizar PCR otra vez. Mediante este procedimiento, se obtuvieron genes que codifican mutantes de N-acetilglucosamina-6-fosfato desaminasa inactivada. El fragmento del gen *nagA1* inactivado se introdujo en un vector de sustitución de ADN cromosómico pDZ usando las enzimas de restricción *EcoRI* (New England Biolabs, Beverly, MA) y *XbaI* (New England Biolabs, Beverly, MA) mediante la técnica de biología molecular divulgada en la Publicación de Patente Coreana No. 2008-0025355, para construir un vector pDZ-*nagA1*ST (figura 2).

SEQ ID NO. 4 (*nagA1*ST - 5)  
5' - GTGCCCGAAGGAAGCTTAAATGATGTGGTGCGC - 3'

SEQ ID NO. 5 (*nagA1*ST - 3)  
5' - GCGCACCATCATTTAAGCTTCCTTCGGGCAC - 3'

### **Ejemplo 2: Construcción de *Corynebacterium glutamicum* CJNAGKO**

Para transformar la cepa *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032) de tipo salvaje con el vector pDZ-*nagA1*ST construido, se insertó un codón de terminación en el ORF del gen *nagA1* en el cromosoma por entrecruzamiento secundario, como se describe en la Publicación de Patente Coreana No. 2008-0025335. Por último, se insertó un codón de terminación entre la isoleucina en la posición 196 y la alanina en la posición 197 para construir CJNAGKO.

### **Ejemplo 3: Construcción del vector de expresión constitutiva de glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa**

Para producir N-acetilglucosamina, se construyó un vector que expresa glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa, que es una enzima que produce N-acetilglucosamina-6-fosfato usando glucosamina-6-fosfato como sustrato. Para aplicación industrial, se usó un promotor constitutivo para construir el vector para asegurar la expresión constitutiva de la enzima durante el crecimiento celular. La enzima usada para la expresión fue GNA1, el gen de glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa conocido de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para la expresión constitutiva de la enzima, se usó un promotor de EFTU (Judith B. et al. Appl Environ Microbiol. 2005:8587-8596.) que es conocido como un promotor constitutivo en *Corynebacterium glutamicum*. Se realizó PCR usando el cromosoma aislado de *Corynebacterium glutamicum* como molde y los cebadores de SEQ ID NO. 6 y 7 para obtener el promotor de EFTU (SEQ ID NO. 8). El producto de PCR obtenido del promotor de EFTU se introdujo en un vector pECCG1117 (Biotechnology letters vol 13, No.10, p.721-726(1991) o la Publicación de Patente Coreana No. 92-7401) usando las enzimas de restricción, NdeI (New England Biolabs, Beverly, MA) y HindIII (New England Biolabs, Beverly, MA) por la técnica de biología molecular conocida. El vector construido se designó pECCG117-PEFTU. Además, se realizó PCR usando el cromosoma aislado de *Saccharomyces cerevisiae* como molde y los cebadores de SEQ ID NO. 9 y 10 para obtener GNA1 (SEQ ID NO. 11). El GNA1 obtenido se introdujo

en el vector pECCG117-PEFTU usando Spel (New England Biolabs, Beverly, MA) y XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA) para construir un vector pECCG117-PEFTU-GNA1 (figura 3).

Cada secuencia de los cebadores usados para amplificar el promotor de EFTU y el gen GNA1 es como sigue.

5 SEQ ID NO. 6 (EFTU - 5)  
5' - GACTAGTATGTTCCGGTTACGTCGGTGACCTTC - 3'

10 SEQ ID NO. 7 (EFTU - 3)  
5' - CCCAAGCTTCTATTTTCTAATTTGCATTTCCACGCCTGC - 3'

SEQ ID NO. 9 (GNA1 - 5)  
5' - GGAATTCATATGAGCTTACCCGATGGATTTTATATAAGG - 3'

15 SEQ ID NO. 10 (GNA1 - 3)  
5' - GCTCTAGACTATTTTCTAATTTGCATTTCCACGCC - 3'

#### Ejemplo 4: Construcción del vector de expresión inducible de glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa

20 Se construyó un sistema de expresión inducible de *Corynebacterium glutamicum* para comparar con el sistema de expresión constitutiva de *Corynebacterium glutamicum* del ejemplo 3.

25 Específicamente, se realizó PCR usando el cromosoma aislado de *Saccharomyces cerevisiae* como molde y los cebadores de SEQ ID NO. 9 y 10 para obtener GNA1. El GNA1 obtenido se introdujo en un vector pVWEx2 conocido como un sistema de expresión de *Corynebacterium glutamicum* (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007. 76:545-552) usando PstI (New England Biolabs, Beverly, MA) y XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA) para construir un vector pVWEx2-GNA1 (figura 4). Se usó un promotor lacIq-Ptac para la expresión inducible. Cada secuencia de los cebadores usados es como sigue.

30 SEQ ID NO. 12 (Vw2-GNA1 - 5)  
5' - AACTGCAGATGAGCTTACCCGATGGATTTTATATAAGG - 3'

35 SEQ ID NO. 13 (Vw2-GNA1 - 3)  
5' - GCTCTAGACTATTTTCTAATTTGCATTTCCACGCCTGC - 3'

#### Ejemplo 5: Producción de N-acetilglucosamina usando *Corynebacterium glutamicum* CJNAGKO con GNA1 introducido

40 Para producir N-acetilglucosamina usando *Corynebacterium glutamicum*, se introdujo glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa (GNA1) en el mutante CJNAGKO que tiene un codón de terminación en el ORF de la N-acetilglucosamina-6-fosfato desaminasa (nagA1) en el cromosoma. Es decir, cada uno de p117-PEFTU-GNA1 y pVWEx2-GNA1 construidos en los ejemplos 3 y 4 se transformaron en CJNAGKO para preparar cepas que tienen una actividad glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa (GNA1) sin actividad N-acetilglucosamina-6-fosfato desaminasa. Las cepas preparadas se designan CJNAG1 (KCCM10967P) y CJNAG2, respectivamente (tabla 1).

45 Para probar si las cepas preparadas producen N-acetilglucosamina, se prepararon una cepa que tenía N-acetilglucosamina-6-fosfato desaminasa inactivada solo (control 2) y una cepa que tenía glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa amplificada solo (control 3) y se usaron como grupos control. El *Corynebacterium glutamicum* de tipo salvaje también se usó como grupo control (control 1). Por último, se analizó la producción de N-acetilglucosamina (tabla 1).

50 La composición del medio y el método de cultivo fueron como sigue. Se pusieron 5 ml de medio de siembra (5 g de triptona, 2,5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 18,5 g de infusión de cerebro y corazón en 500 ml de agua destilada, y 91 g de sorbitol en 500 ml de agua destilada, cada uno de ellos se esterilizó a alta presión y alta temperatura, y después se mezclaron) en tubos de ensayos, y después las cepas de prueba se inocularon en los mismos, seguido por incubación a 30°C durante 12 horas. Se hicieron alícuotas de 20 ml de medio de cultivo (basado en 1 L de agua destilada, 90 g de glucosa esterilizada por separado, 40 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 g de proteína de soja, 5 g de sólidos de maceración de maíz, 3 g de urea, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 100 µg de biotina, 1000 µg de clorhidrato de tiamina, 200 µg de pantotenato de calcio, 3000 µg de nicotinamida, 30 g de CaCO<sub>3</sub> esterilizado por separado) en matraces Erlenmeyer de 250 ml, y después se inocularon en los mismos 200 µl de medio de cultivo de siembra, seguido por fermentación a 30°C durante 42 horas. En particular, se añadió 100 µM de IPTG al 'control 3' y 'CJNAG2' que se transformaron con pVWEx2-GNA1, cuando la densidad óptica (DO) de las células fue 10 a 600 nm. Cada cepa se probó usando tres matraces, y se midieron el número medio de células y concentración de N-acetilglucosamina. Los resultados de fermentación mostraron que se produjo N-acetilglucosamina a una concentración de aproximadamente 1,0 g/l o más, independientemente de expresión constitutiva o inducible (tabla 1). Se puede ver que el sistema de expresión constitutiva se puede usar

adicionalmente en *Corynebacterium*, mientras que la producción de NAG conocida mediante el uso de *E. coli* debe adoptar solo el sistema de expresión inducible que permite la separación del crecimiento y la fase de producción.

[Tabla 1]

Cepa		DO celular (Abs. 600 nm)	N-acetilglucosamina (mg/l)
Control 1	Cepa de tipo salvaje	87,2	42
Control 2	Cepa con nagA1 inactivada	81,1	44
Control 3	Cepa de expresión inducible de GNA1	82,3	50
CJNAG1	Cepa con nagA1 inactivada y expresión constitutiva de NGA1	88,1	1.241
CJNAG2	Cepa con nagA1 inactivada y expresión inducible de NGA1	83,1	1.108

- 5 Se puede producir glucosamina de la desacetilación de la N-acetilglucosamina producida por tratamiento ácido, que se puede realizar por el método conocido descrito en Novikov V.Y. *et al.* (Russ. J. Appl. Chem. 1997:1467-1470), lo que indica que la producción de N-acetilglucosamina fácilmente permite producción adicional de glucosamina.

**Efecto de la invención**

- 10 Según la invención, se puede desarrollar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene una capacidad de producir N-acetilglucosamina y, por tanto, se produce N-acetilglucosamina o glucosamina usando el microorganismo, produciéndose de esta manera la producción en masa de N-acetilglucosamina y glucosamina sin el riesgo de reacciones alérgicas. Además, es industrialmente aplicable, ya que se pueden producir de forma segura alimentos naturales y materiales terapéuticos, y las enzimas cruciales se pueden expresar constitutivamente.

15

**Lista de secuencias**

- <110> CJ CheilJedang Corporation
- 20 <120> UN MICROORGANISMO DEL GÉNERO CORYNEBACTERIUM QUE PRODUCE N-ACETILGLUCOSAMINA Y UN MÉTODO DE PRODUCIR N-ACETILGLUCOSAMINA O GLUCOSAMINA USANDO EL MISMO
- <130> OPA09098/PCT
- 25 <150> KR2008-0102633  
<151> 20-10-2008
- <160> 13
- 30 <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1  
<211> 1167  
<212> ADN
- 35 <213> *Corynebacterium glutamicum*
- <220>  
<221> gen  
<222> (1)...(1167)
- 40 <223> nagA1 (NCg12556)
- <400> 1

ES 2 584 531 T3

atggcagaag tggatgatta tcaagaaaat gcaggtaag cagttaaaaa aattgaagga 60  
 agaattgtta cccccacgg ggtgattgat ggctttctcc aactcgaaaa cggcatcatc 120  
 acggaactct ctggagaacc agcacctaaa aacgcaggat tccaccccga actccccacg 180  
 attgttccca gttttattga tcttcataat cacgggtgaa acgggtggcg gtttcctacg 240  
 ggaacgcagg accaggcgag gaatgccgag cagtatcacc gcgaacatgg cacgaccgtg 300  
 atgttgcaa gcatggtttc ggccgaggct gacgcactgg cagcgcagggt ggaaaacctt 360  
 attcccttgt gtgaagaggg cctgctgtgc ggcatcacc tcgagggtcc tttcatcaac 420  
 gcatgccgtt gtggtgctca aaaccggat tttatTTTTc ccggcaacc aacagatctt 480  
 gcccaggatga tccatgcggg aaaagggttg atcaaatcga tcacagtagc gccgaaact 540  
 gacaatctta ctgagcttct cgatctctgc gcagcgcacc acatcattgc ttccttcggg 600  
 cacactgatg cagatTTTga taccactacc agcgcattg ccttggttaa agagaaaaat 660  
 gtgacggta cggtacgca tttgttcaat gcgatgcctc cgctgcatca tagggatccc 720  
 ggcagcgtgg gcgctttgct tgctgcggca cgtgccggg acgcatatgt tgagttgatc 780  
 gccgacggcg tgcatttggc cgatggaacg gtcgatctag ctggttcaa caacgccttt 840  
 ttcatacagg acgcatgga agccgcccga atgccagacg gtgagtacat tttggcggtt 900  
 ttgaacgta ccgtcacga tggcgtcgcc cgtctgcgag atggcggcg catcgccggg 960  
 ggtaccagca cactagcgag tcagttcgtg caccacgtgc gcaggggtat gacgcttacc 1020  
 gacgcgaccc tccacactc aaccgtcgcc gccaaaattc tcggacttag cgatcacgaa 1080  
 atcgttaa at ccaaccctgt aaatTTTgtg gtctttgact caaacggcca gttacaacag 1140  
 gtccatttag accatcaagt aatttaa 1167

5 <210> 2  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> cebador directo para la amplificación de nagA1

<400> 2  
 ggaattcatg gcagaagtgg tgcattatca ag 32

15 <210> 3  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> cebador inverso para la amplificación de nagA1

<400> 3  
 gctctagaga tgatgtccat ggtcggactc c 31

25 <210> 4  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> cebador directo para la amplificación de nagA1 mutada	
5	<400> 4 gtgcccgaag gaagcttaaa tgatgtggtg cgc	33
	<210> 5	
	<211> 33	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso para la amplificación de nagA1 mutada	
15	<400> 5 gcgcaccaca tcatttaagc ttccttcggg cac	33
	<210> 6	
20	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador directo para la amplificación del promotor de EFTU	
	<400> 6 gactagtatg ttcggttacg tcggtgacct tc	32
30	<210> 7	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador inverso para la amplificación del promotor de EFTU	
	<400> 7 ccaagcttc tattttctaa ttgcatttc cacgcctgc	39
40	<210> 8	
	<211> 497	
	<212> ADN	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
45	<220>	
	<221> promotor	
	<222> (1)...(497)	
	<223> promotor de EFTU	
50	<400> 8	

# ES 2 584 531 T3

	atgttcggtt acgtcgggtga ccttcgctct aagaccagc gtcgtgcaaa ctactccatg	60
	gtcttcgatt cctacgctga ggtcccagcc aacggtgccg cagatgttat tgctgagcgc	120
	aacggcaccg cttcctaaag atcgtttaga tccgaaggaa aacgctgaaa agcaatttgc	180
	ttttcgaagc cccaccccgc gcgttttagc gtgtcagtag gcgcgtaggg taagtggggc	240
	agcggcttgt tagatatctt gaaatcggct ttcaacagca ttgatttoga tgtatttagc	300
	tggccgttac cctgcgaatg tccacagggt agctggtagt ttgaaaatca acgccgttgc	360
	ccttaggatt cagtaactgg cacattttgt aatgcgctag atctgtgtgc tcagtcttcc	420
	aggctgctta tcacagtga agcaaaacca attcgtggct gcgaaagtgc tagccaccac	480
	gaagtccagg aggacat	497
	<210> 9 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador directo para la amplificación de GNA1	
10	<400> 9 ggaattccat atgagcttac ccgatggatt ttatataagg	
	40	
15	<210> 10 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para la amplificación de GNA1	
	<400> 10 gctctagact attttctaat ttgcatttcc acgcc	
	35	
25	<210> 11 <211> 480 <212> ADN <213> Saccharomyces cerevisiae	
30	<220> <221> gen <222> (1)...(480) <223> GNA1	
35	<400> 11	

# ES 2 584 531 T3

atgagcttac ccgatggatt ttatataagg cgaatggaag agggggattt ggaacaggtc	60
actgagacgc taaaggtttt gaccaccgtg ggactactatta cccccgaatc cttcagcaaa	120
ctcataaaat actggaatga agccacagta tggaatgata acgaagataa aaaaataatg	180
caatataacc ccatggtgat tgtggacaag cgcaccgaga cggttgccgc tacggggaat	240
atcatcatcg aaagaaagat cattcatgaa ctggggctat gtggccacat cgaggacatt	300
gcagtaaact ccaagtatca gggccaaggt ttgggcaagc tcttgattga tcaattggta	360
actatcggct ttgactacgg ttgttataag attattttag attgcatga gaaaaatgc	420
aaattctatg aaaaatgtgg gtttagcaac gcaggcgtgg aaatgcaaat tagaaaatag	480

<210> 12  
 <211> 38  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> cebador directo para la amplificación de Vw2-GNA1

10 <400> 12  
 aactgcagat gagcttacc gatggatttt atataagg 38

15 <210> 13  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

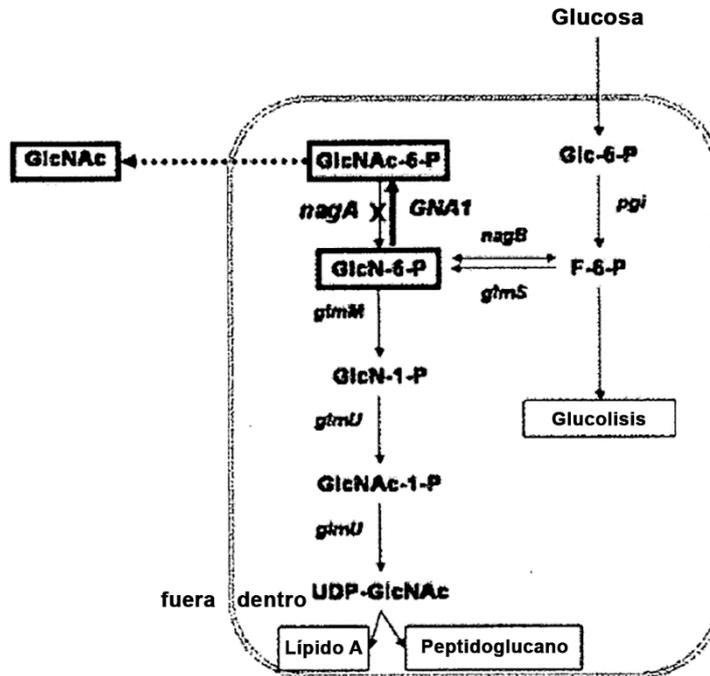
20 <220>  
 <223> cebador inverso para la amplificación de Vw2-GNA1

<400> 13  
 gctctagact attttctaatttgcatttcc acgctctgc 38

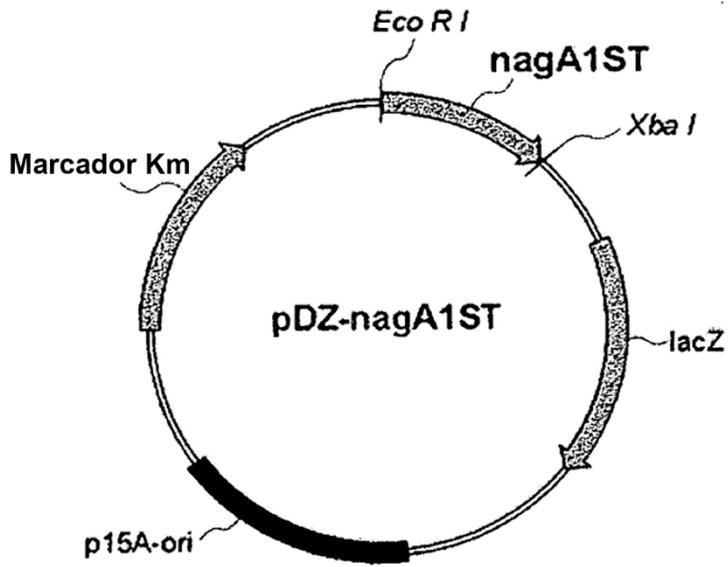
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene capacidad para producir N-acetilglucosamina, en donde el microorganismo tiene una actividad glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa y una actividad glucosamina-6-fosfato desaminasa reducida o delecionada comparado con un microorganismo de tipo salvaje, en donde la glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa se expresa constitutivamente, y en donde el microorganismo es seguro para seres humanos y animales.
- 10 2. El microorganismo del género *Corynebacterium* según la reivindicación 1, en donde la glucosamina-6-fosfato acetiltransferasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO. 11.
3. El microorganismo del género *Corynebacterium* según la reivindicación 1, en donde la expresión constitutiva está dirigida por un promotor del factor de elongación TU (EFTU).
- 15 4. El microorganismo del género *Corynebacterium* según la reivindicación 1, en donde el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum*.
- 20 5. El microorganismo del género *Corynebacterium* según la reivindicación 1, en donde el microorganismo es *Corynebacterium glutamicum* CJNAG1 depositado con el número de registro KCCM10967P.
- 25 6. Un método para producir N-acetilglucosamina o glucosamina, que comprende los pasos de:
  - (a) cultivar los microorganismos del género *Corynebacterium* que tienen una capacidad para producir N-acetilglucosamina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y
  - (b) recoger N-acetilglucosamina o glucosamina producida en el paso de cultivo.
7. El método según la reivindicación 6, en donde la N-acetilglucosamina recogida en el paso (b) se desacetila para producir glucosamina.

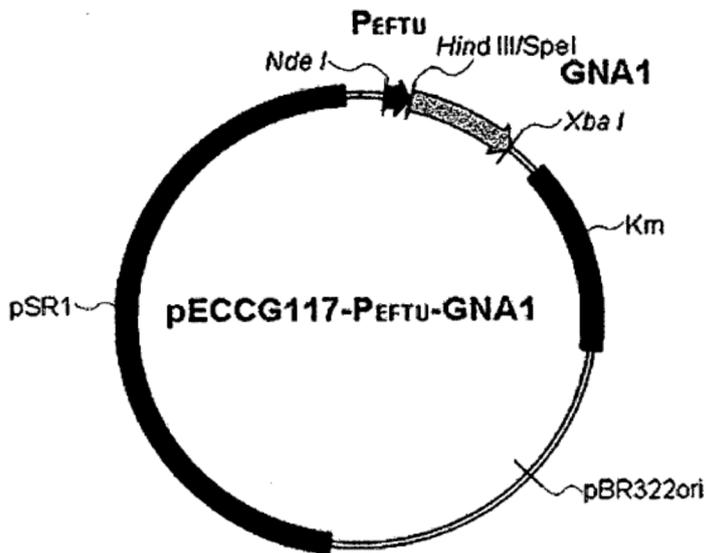
[FIG. 1]



[FIG. 2]



[FIG. 3]



[FIG. 4]

