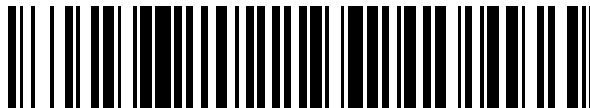


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 513**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12P 19/32** (2006.01)

**C12P 19/40** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2008 PCT/KR2008/000236**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2008 WO08088156**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2008 E 08704775 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2115120**

54 Título: **Microorganismo que produce inosina y método de producción de inosina usando el mismo**

30 Prioridad:

**15.01.2007 KR 20070004341**

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

**15.02.2017**

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)  
500, NAMDAEMUNRO 5-GA  
JUNG-GU, SEOUL 100-095, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, YOUNG-HOON;  
CHO, KWANG-MYUNG;  
LEE, HEE-JONG y  
LEE, JIN-NAM**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 601 513 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 que produce inosina y método de producción de inosina usando el mismo

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante que produce inosina, uno de los nucleósidos de purina que son materiales muy importantes para la síntesis de ácido 5'-inosínico, y método para producir inosina usando el mismo. Más particularmente, la presente invención se refiere a *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante que produce inosina a alta concentración, en que el gen que codifica la nucleósido hidrolasa II de *Corynebacterium ammoniagenes* que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1 (mencionado como "rih II" a partir de ahora en este documento) está inactivado y en que el gen que codifica la 5'-nucleotidasa que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 (mencionada como "ushA" a partir de ahora en este documento) está sobreexpresado, y método para producir inosina usando el mismo

## 15 Técnica anterior

Como enzima relacionada con la síntesis de nucleósidos, la nucleósido hidrolasa II se sabe que está implicada en la degradación de nucleósidos y la 5'-nucleotidasa se sabe que está implicada en la síntesis de nucleósidos.

Un gen que codifica la nucleósido hidrolasa II es el gen que codifica la enzima que cataliza la ribosa y las correspondientes bases, que son purina y pirimidina, de forma irreversible, en la ruta de rescate de nucleósidos. Este gen contiene una secuencia de nucleósidos de 1326 pb y codifica una proteína de 308 aminoácidos y tiene especificidad de sustrato por nucleósidos tanto de purina como de pirimidina (Microbiology, 2006, vol. 152, pág. 1169-1177).

Un gen que codifica la 5'-nucleotidasa es el gen que codifica la enzima que cataliza la desfosforilación de nucleósidos tales como AMP, GMP, IMP y XMP en la ruta de biosíntesis de nucleósidos (ruta de novo). Este gen codifica una proteína de 705 aminoácidos.

La inosina es un sustrato importante para la síntesis química y síntesis por enzima, de la transferencia de ácido 5'-inosínico que está en el centro de atención como un condimento potenciador del aroma. Además, la inosina es un intermedio de la biosíntesis de ácidos nucleicos, que no solamente es un factor fisiológico importante en animales y plantas, sino que también se aplica en diversos campos incluyendo las industrias de alimentos y medicamentos. Se ha informado de que los nucleósidos y sus derivados tienen muchos usos como antibióticos, agentes antineoplásicos y sustancias antiviricas (J. Virol, vol.; 72, pág. 4858-4865).

El método convencional para producir inosina es fermentación directa usando un microorganismo tal como *Bacillus* (Agric. Biol. Chem., 46, 2347 (1982); patente coreana n.º 27280) o *Corynebacterium ammoniagenes* (Agric. Biol. Chem., 42, 399(1978)), o descomposición térmica de ácido 5'-inosínico (publicación de patente japonesa suspendida n.º S43-3320). Sin embargo, la descomposición térmica requiere calor masivo, que no lo hace práctico. De acuerdo con la fermentación directa, la actividad de la cepa productora de inosina es muy baja, de modo que los costes de producción aumentan y la fermentación conlleva más tiempo, provocando baja productividad.

Para producir inosina por fragmentación directa usando un microorganismo a alta concentración con alto rendimiento, es muy importante desarrollar una cepa que sea apropiada para la acumulación de inosina a alta concentración en su caldo de cultivo.

Los presentes inventores estudiaron de forma persistente la producción de inosina con alta productividad/alto rendimiento por fragmentación directa usando un microorganismo. Y al fin, los presentes inventores completaron esta invención confirmando que el microorganismo productor de ácido 5'-inosínico podría producir inosina con alta productividad/alto rendimiento cuando el gen *rih II* que codifica la nucleósido hidrolasa II está inactivado y el gen *ushA* que codifica 5'-nucleotidasa está potenciado.

Kim H. *et al.*, (2006) "Genes encoding ribonucleoside hydrolase 1 and 2 from *Corynebacterium ammoniagenes*", Microbiology 152: 1169-1177 describe un mutante de delección de *C. ammoniagenes* CA315Δrih2 derivado de *C. ammoniagenes* de tipo silvestre (ATCC 6872).

## 60 Descripción de la invención

## 60 Problema técnico

La presente invención se establece basándose en el hallazgo anterior. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante que produce inosina, en que el gen que codifica la nucleósido hidrolasa II que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ. ID. NO: 1 está

inactivado y en que el gen que codifica la 5'-nucleotidasa que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 está sobreexpresado.

5 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un método para producir inosina cultivando *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante anterior y obteniendo la inosina acumulada de la solución de cultivo.

Solución técnica

10 Los objetivos anteriores y otros objetivos de la presente invención pueden conseguirse por las siguientes realizaciones de la presente invención.

La presente invención se describe en detalle a partir de ahora en este documento.

15 Se describe un microorganismo que tiene productividad de nucleósidos conseguida por manipulación de los genes implicados en la ruta de síntesis de nucleósidos de CJIP2401 (KCCM-10610), la cepa mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 que es capaz de acumular ácido 5'-inosínico a alta concentración.

20 La cepa precursora de uso en la preparación de los microorganismos recombinantes de la presente invención, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610) [publicación de patente coreana n.º 10-2004-0099466], es la cepa mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* MP377 (KFCC11141). La cepa mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* MP377 (KFCC11141) [solicitud de patente coreana n.º 10-2000-0013303] se origina a partir de *Corynebacterium ammoniagenes* KFCC-10814 [patente coreana n.º 127853], la cepa mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* 6872. Por lo tanto, el microorganismo de la presente invención comparte las características principales explicadas a continuación y tiene efectos similares a *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610).

- 25
- 1) Auxótrofo de adenina
  - 2) Tipo filtrante de guanina
  - 3) Auxótrofo de biotina
  - 30 4) Sensibilidad a lisozima 8 g/ml
  - 5) Resistente a 3,4-dihidropolina 3500 g/ml
  - 6) Resistente a 6-mercaptapurina 300 g/ml
  - 7) Resistente a 5-fluorotriptófano 100 mg/l

35 El gen *rih II* que codifica la nucleósido hidrolasa II se aisló de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 de tipo silvestre y tenía la secuencia representada por la SEQ. ID. NO: 1.  
El gen *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa se aisló de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 de tipo silvestre y tenía la secuencia representada por la SEQ. ID. NO: 2.

40 La presente invención proporciona *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante que produce inosina en que el gen *rih II* de la SEQ. ID. NO: 1 que codifica la proteína nucleósido hidrolasa II está inactivado, y en que el gen *ushA* de la SEQ. ID. NO: 2 que codifica la 5'-nucleotidasa está sobreexpresado.

45 La "inactivación" puede inducirse por cualquier método de inactivación conocido para los expertos en la materia. El término "inactivación" en este documento pretende indicar que la expresión del gen *rih II* que codifica la nucleósido hidrolasa II está reducida hasta un nivel bajo en comparación con la cepa de tipo silvestre, o se producen genes que no se expresan y genes que expresan productos que no tienen actividad o tienen actividad reducida a pesar de expresarse.

50 La "inactivación" puede inducirse por uno o más métodos de mutación seleccionados del grupo que consiste en inserción de uno o más pares de bases en el gen *rih II*, delección de uno o más pares de bases en el gen, transición o transversión de pares de bases por inserción de un codón sin sentido en el gen.

55 En una realización preferida, el microorganismo que contiene el gen inactivado puede obtenerse cultivando un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con el vector que contiene una parte del gen *rih II*.

La parte del gen puede sintetizarse usando cebadores representados por la SEQ. ID. NO: 3 y NO: 4.

60 El gen *rih II* se inactivó por la inserción de un vector recombinante en corinebacterias. Sin embargo, en lugar del vector recombinante, puede usarse cualquier método conocido incluyendo infección con virus para inactivar el gen *rih II*, pero no siempre se limita a ello.

65 La potenciación de la expresión génica puede realizarse por cualquier método convencional conocido para los expertos en la materia. En este documento, el refuerzo de la expresión génica significa la regulación positiva del gen *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa, en comparación con la cepa de tipo silvestre.

La potenciación de la expresión génica se induce por activación del sistema de expresión completo que contiene la región promotora del gen *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa.

5 En una realización preferida, el microorganismo que contiene el gen potenciado puede obtenerse cultivando un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con el vector que contiene la secuencia representada por la SEQ. ID. NO: 2 para expresar el sistema de expresión completo que incluye la región promotora del gen *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa.

10 Se describe *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG650 (n.º de acceso: KCCM-10828P) que tiene inactivado el gen *rih II* y que produce ácido 5'-inosínico e inosina a alta concentración, que es la cepa mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM10610).

15 La presente invención también proporciona *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG651 (n.º de acceso: KCCM-10829P) que tiene inactivado el gen *rih II* y potenciado el gen *ushA* y que produce inosina a alta concentración que es la cepa mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG650 (KCCM-10828P).

Se describe un método para producir inosina a alta concentración con alto rendimiento cultivando *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG650 (KCCM-10828P) y CJIG651 (KCCM-10829P) y acumulando inosina en el caldo de cultivo.

20 El proceso de construcción de la cepa del a presente invención es el siguiente.

Se realizó secuenciación con el cromosoma de un microorganismo del género *Corynebacterium* que produce ácido 5'-inosínico, por ejemplo, *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872. Como resultado, se confirmó que el tamaño del gen *rih II* que codifica la nucleósido hidrolasa II era de aproximadamente 1326 pb (SEQ. ID. NO: 1). Se realizó PCR para obtener el fragmento génico para construir un vector recombinante. El microorganismo del género *Corynebacterium* que produce ácido 5'-inosínico se transformó con el vector y se seleccionó la cepa que produce ácido 5'-inosínico e inosina a alta concentración de las cepas transformadas. A partir de la secuenciación con el cromosoma de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872, se confirmó que el tamaño del gen *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa era de aproximadamente 2115 pb (SEQ. ID. NO: 2). Se realizó PCR para obtener el fragmento génico para construir un vector recombinante. El microorganismo del género *Corynebacterium* que produce ácido 5'-inosínico e inosina se transformó con el vector y se seleccionó la cepa productora de inosina en solitario a alta concentración de las cepas transformadas.

35 El microorganismo de la presente invención se obtiene preferiblemente transformando el microorganismo del género *Corynebacterium* que produce ácido 5'-inosínico con el vector recombinante que contiene el gen *rih II* que codifica la nucleósido hidrolasa II y el vector recombinante que contiene el gen *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa. El vector recombinante que contiene el gen de la nucleósido hidrolasa II incluye 500 pb de la secuencia génica estructural de *rih II*, mientras que el vector recombinante que contiene el gen de la 5'-nucleotidasa incluye aproximadamente 300 pb del promotor, la secuencia génica estructural de *ushA* y aproximadamente 300 pb de terminador. El microorganismo se genera alterando el gen insertando el vector recombinante que contiene el gen *rih II* construido usando el cromosoma del microorganismo del género *Corynebacterium* que produce ácido 5'-inosínico y sobreexpresando el gen *ushA* como una forma de plásmido.

45 El vector recombinante que contiene el gen de la nucleósido hidrolasa II se construye por los siguientes procesos; el gen *rih II* obtenido por PCR se separa y purifica; y el gen purificado se inserta en el vector pCR2.1-TOPO por ligamiento. El vector recombinante en este documento es preferiblemente el vector pTOPO-*rih II* construido insertando una parte del gen estructural de la nucleósido hidrolasa II en el vector CR2.1-TOPO. El vector recombinante que contiene el gen de la 5'-nucleotidasa se construye por los siguientes procesos; el gen *ushA* obtenido por PCR se digiere con *EcoRV* y *BamHI*; y el fragmento génico se inserta en el vector predigerido con las mismas enzimas de restricción de ADN usando la ADN ligasa T4. El vector aplicable no está limitado a uno específico, y puede usarse cualquier vector convencional del que hayan informado los expertos en la materia. Sin embargo, el vector pECCG117 [Biotechnology letters vol. 13, n.º 10, pág. 721-726(1991) o publicación de patente coreana n.º 92-7401] es preferido y particularmente se prefiere el vector pECCG117-*ushA* construido insertando el gen *ushA* en el vector pECCG117.

55 Usando el vector recombinante, por ejemplo, pTOPO-*rih II*, puede insertarse un fragmento de ADN lineal en el microorganismo (por ejemplo, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610)) por electroporación general y el microorganismo se cultiva en el medio que contiene kanamicina, el antibiótico usado como marcador de selección, seguido por selección. La inserción del vector pTOPO-*rih II* en la cepa transformada seleccionada puede confirmarse por PCR.

60 Para sobreexpresar el gen *ushA* en la cepa transformada seleccionada, se inserta un fragmento de ADN lineal en la cepa transformada seleccionada usando vector pECCG117-*ushA* por electroporación y la cepa se cultiva en el medio que contiene cloranfenicol, el antibiótico usado como marcador de selección, seguido por selección. La inserción del vector pECCG117-*ushA* en la cepa transformada seleccionada puede confirmarse por PCR.

65

El microorganismo de la presente invención puede cultivarse en el medio convencional que contiene una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, aminoácidos y vitaminas apropiados, en condiciones aeróbicas con regulación de la temperatura y el pH apropiadamente.

5 Como fuente carbono, se selecciona uno de los carbohidratos del grupo que consiste en glucosa, fructosa y melazas pretratadas esterilizadas (melazas convertidas en azúcar reductor). La fuente de nitrógeno se ejemplifica por fuente de nitrógeno inorgánico tal como amoníaco, cloruro de amonio y sulfato de amonio y fuente de nitrógeno orgánico tal como peptona, NZ-amina, caldo, extracto de levadura, licor del macerado del maíz, hidrolizado de caseína, pescado o productos de descomposición de los mismos, y torta de soja desgrasada o productos de degradación de la misma.

10 El medio en este documento puede incluir adicionalmente compuestos inorgánicos tales como dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de dipotasio, sulfato de magnesio, sulfato de hierro, sulfato de manganeso y sulfato de calcio, etc. Además, pueden añadirse también vitaminas y bases auxotróficas. El cultivo se realiza en condiciones aeróbicas por cultivo de agitación o cultivo sumergido preferiblemente a 20~40 °C. El pH se regula preferiblemente aproximadamente a neutro durante el cultivo. La duración del cultivo es preferiblemente de 4~5 días. La inosina acumulada por fermentación directa puede recuperarse por el método convencional.

15

De acuerdo con el método de la presente invención, puede producirse inosina con alto rendimiento.

Breve descripción de los dibujos

20 La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se entiende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, donde:

25 La Fig. 1 es un diagrama que ilustra el proceso de clonación del fragmento génico *rih II* que codifica la nucleósido hidrolasa II originada a partir de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 de tipo silvestre, y el vector clonado pTOPO-*rih II*.

La Fig. 2 es un diagrama que ilustra el proceso de clonación del fragmento génico *ushA* que codifica la 5'-nucleotidasa originada a partir de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 de tipo silvestre, y el vector clonado pECCG117-*ushA*.

30

Mejor modo para realizar la invención

Las realizaciones prácticas y actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas, como se muestran en los siguientes Ejemplos.

35

Ejemplo 1: Clonación del gen *rih II*

En este ejemplo, se amplificó el fragmento génico *rih II* de 1326 pb (SEQ. ID. NO: 1) por PCR usando ADN cromosómico de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 de tipo silvestre como molde con cebadores de oligonucleósidos representados por la SEQ. ID. NO: 3 y NO: 4 para construir el vector (vector de alteración del gen *rih II*) que contiene una parte del gen *rih II* que codifica la nucleósido hidrolasa II y un marcador de antibiótico. Se realizó PCR del siguiente modo; desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 52 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 30 segundos (30 ciclos). El fragmento génico *rih II* amplificado se clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen Co., EE.UU.). Como resultado, se obtuvo el vector pTOPO-*rih II*. El proceso de clonación del fragmento génico *rih II* y el vector clonado pTOPO-*rih II* se ilustran en la Fig. 1.

40

45

Se transformó *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610) con el vector pTOPO-*rih II* por electroporación. Después, se recuperaron colonias individuales que crecieron en medio sólido CM (caldo 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l, bactopectona 10 g/l, cloruro sódico 2,5 g/l, bactoagar al 1,7 %, pH 7,0) que contenía kanamicina (25 mg/l).

50

Las colonias se cultivaron en medio CM que contenía el mismo antibiótico, seguido por separación del plásmido. El tamaño del plásmido se midió primero y después se realizó PCR de colonias usando los cebadores que comprenden ambos extremos de la región de clonación múltiple de pCR2.1-TOPO para confirmar la transformación midiendo el tamaño del ADN insertado.

55

Los cebadores usados para inactivar el gen *rih II* son los siguientes.

Cebador *rih II*-F (SEQ. ID. NO: 3):

60 5'- TGCTGGCGATGCACTTGAAT -3

Cebador *rih II*-B (SEQ. ID. NO: 4):

65 5'- TGTGCGACCAATGGTGGGGCC -3'

La cepa que contenía el gen *rih II* seleccionada anteriormente se llamó *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG650, que se depositó en KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms) de KFCC (Korean Federation of Culture Collection) el 15 de diciembre de 2006 (n.º de acceso: KCCM 10828P).

#### 5 Ejemplo 2: Clonación del gen *ushA*

En este ejemplo, se amplificó el fragmento génico *ushA* de 2115 pb (SEQ. ID. NO: 2) por PCR usando ADN cromosómico de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC 6872 de tipo silvestre como molde con cebadores de oligonucleósidos representados por la SEQ. ID. NO: 5 y NO: 6. Se realizó PCR del siguiente modo; desnaturalización a 96 °C durante 30 segundos, hibridación a 52 °C durante 30 segundos y polimerización a 72 °C durante 30 segundos (30 ciclos). El fragmento génico obtenido se digirió con *EcoRV* y *BamHI*. El fragmento génico se ligó al vector pECCG117 lineal digerido con las mismas enzimas de restricción de ADN usando ADN ligasa T4. Como resultado se obtuvo el vector pECCG117-*ushA*. El proceso de clonación del fragmento génico *ushA* y el vector clonado pECCG117-*ushA* se ilustran en la Fig. 2.

La cepa mutante preparada en el Ejemplo 1 se transformó con el vector pECCG117-*ushA* construido por electroporación. Después, se recuperaron colonias individuales que crecieron en medio sólido CM (caldo 10 g/l, extracto de levadura 10 g/l, bactopectona 10 g/l, cloruro sódico 2,5 g/l, bactoagar al 1,7 %, pH 7,0) que contenía cloranfenicol (7,5 mg/l). Las colonias se cultivaron en medio CM que contenía el mismo antibiótico, seguido por separación del plásmido. El tamaño del plásmido se midió primero y después se realizó PCR de colonias usando los cebadores que comprenden ambos extremos de la región de clonación múltiple de pECCG117 para confirmar la transformación midiendo el tamaño del ADN insertado.

Los cebadores usados para sobreexpresar el gen *ushA* son los siguientes.

25 Cebador *ushA*-F (SEQ. ID. NO: 5):

5'- GTGTCTAAGTTTCGCCGTTTTGGC -3'

30 Cebador *ushA*-B (SEQ. ID. NO: 6):

5'- GCCGGATCCCTAGAATTTGATGTGGCTAACCTCG -3'

35 La cepa que contenía el gen *ushA* seleccionada anteriormente se llamó *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG651, que se depositó en KCCM (Korean Culture Center of Microorganisms) de KFCC (Korean Federation of Culture Collection) el 15 de diciembre de 2006 (n.º de acceso: KCCM 10829P).

#### Ejemplo 3: Ensayo de fermentación en matraz Erlenmeyer

40 Se distribuyeron 3 ml de medio de siembra en tubos de ensayo de 18 mm de diámetro, que se esterizaron por autoclave. Se inocularon *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG650 (KCCM-10828P), CJIG651 (KCCM-10829P) y la cepa precursora (KCCM-10610) en los tubos de ensayo respectivamente, seguido por cultivo de agitación a 30 °C durante 24 horas para preparar la solución de cultivo de siembra. Se distribuyeron 27 ml de medio de fermentación en matraz Erlenmeyer de 500 ml para agitación, que se esterilizó por autoclave a 120 °C durante 10 minutos. Después de inoculación de 3 ml de la solución de cultivo de siembra, se realizó el cultivo durante 4~5 días. Las RPM se regularon como 200, y la temperatura se estableció a 32 °C y el pH se reguló como 7,2.

Las composiciones del medio de siembra y el medio de fermentación son las siguientes.

50 Medio de siembra: glucosa al 5 %, peptona al 0,5 %, caldo al 0,5 %, extracto de levadura al 1 %, cloruro sódico al 0,25 %, adenina 100 mg/l, guanina 100 mg/l, pH 7,2.

55 Medio de fermentación en matraz: glutamato sódico al 0,1 %, cloruro de amonio al 1 %, sulfato de magnesio al 1,2 %, cloruro de calcio al 0,01 %, sulfato de hierro 20 mg/l, sulfato de manganeso 20 mg/l, sulfato de zinc 20 mg/l, sulfato de cobre 5 mg/l, L-cisteína 23 mg/l, alanina 24 mg/l, ácido nicotínico 8 mg/l, biotina 45 mg/l, tiamina HCl 5 mg/l, adenina 30 mg/l, ácido fosfórico (85 %) al 1,9 %, azúcar reductora al 8 % convertido a partir de la mezcla de fructosa, glucosa y melazas.

60 Las acumulaciones de ácidos inosínico (IMP) o inosina en los medios de cultivo de CJIG650 (KCCM-10828P), CJIG651 (KCCM-10829P) y la cepa precursora (KCCM-10610) se compararon entre sí. Y los resultados se muestran en la Tabla 1. Como se muestra en la Tabla 1, solo el ácido inosínico se acumulaba en el medio de cultivo de la cepa precursora (KCCM-10610) y la inosina no se acumulaba en absoluto en la misma. Sin embargo, las cepas de la presente invención, CJIG650 (KCCM-10828P) producía ácido inosínico e inosina a alta concentración, y la cepa CJIG651 (KCCM-10829P) producía inosina a alta concentración.

65 Por lo tanto, las cepas de la presente invención CJIG650 (KCCM-10828P) y CJIG651 (KCCM-10829P), se confirmó que eran las cepas capaces de producir inosina a alta concentración.

[Tabla 1]

Cepa	Concentración de IMP (g/l)	Concentración de inosina (g/l)
Control (KCCM-10610)	14,1	-
CJIG650	8	4
CJIG651	-	8,3

Aplicabilidad industrial

5 Como se explica anteriormente en este documento, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG650 y CJIG651 preparadas por inactivación del gen que codifica la nucleósido hidrolasa II y por refuerzo del gen que codifica la 5'-nucleotidasa pueden producir inosina a alta concentración.

10 <110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Microorganismo que produce inosina y método de producción de inosina usando el mismo

<130> PP07-0143

15 <160> 6

<170> Kopat entln 1.71

<210> 1

20 <211> 927

<212> ADN

<213> *Corynebacterium ammoniagenes*

25 <400> 1

```

at gaagat ga t t t t agat ct agacaccggt at cgat gat g cct t t gcgt t ggct at gcc 60
at cgcacacc cgggt at cga t t t gat t ggt gt caccggaa ct t at ggcaa t gt caccat t 120
gaacaaggca t ggccaat ac ccaggcact g t t gacgct ac t gggcgcagc cgat gt gccc 180
gt at at gccg gacgcgct at cgat ggct t t gaggt at ct g aagcct ct gc t cgt at t cac 240
gggcgcaat g gcgt gggg ga ggt agat at c gct gcagat g at gcgcaat c t gct ggcgat 300
gcact t gaat t t t t aagcga agcagcggcg aaat acggcg at gat t t ggt gat cgt t ccc 360
accggcgcgc aaacgacgct t ggcggggct t t agaaaaag at cct gcat t gcgaggcat t 420
cgcat ggt ca gcat gggcgg cgct t aacc gt cccgggaa at gt gt cacc agcggct gag 480
gcaaat at ct cccaggacc agt ct ct t cc aacact gt gt accagt t ggc t gaggat at g 540
accat ggt gg gct t ggat gt cact at gcaa acacagct ca cacgt gct ga ggcggat t cg 600
t ggcggggaa cgccagct gg agat gt ct t t gct gat at gg ccgct at t a cat cgacgct 660
t at caggaaa at aat ccgca cat ggat ggc t ggcct t gc at gaccct t ggcct ggcg 720
gt t gcagct g at cct gact t ggt ggat t gt t t gat t ct t c ccct gcaggt cgat accgaa 780
ggccccacca t t ggt cgcac aat t ggacgg t gggat ggct ct gaggt aga aaccct gt a 840
gccgt t gggg t aaacgt gga t agt t t cgt g ccggat t t ca t cgacaagct ggcgcaact a 900
t t t ggacgat t ggt ccaaaa ccagt aa 927
    
```

<210> 2

<211> 2115

30 <212> ADN

<213> *Corynebacterium ammoniagenes*

ES 2 601 513 T3

<400> 2

gt gt ct aagt t t cgccgt t t t ggccgt ct g ct ggct gcaa ccaccgt at c cgccaccat c	60
gt agt t ggcg cgcccgct agc ct t t ggt caa gaagat aat g t t gt t gat t t ct cagt cacc	120
aat at cact g act t ccat gg ccacct t t ct acgcaggagg ct gacgct cc t gat gccaac	180
t cagagat gg gggcggccaa gct caaggaa ct gat t gagi acgt t aat ca ggaccaggaa	240
t acat cat ga ct acct ccgg cgat aacgt c ggcggf agcg ct t t cgt ct c ggcaat cgct	300
gat gat gagg caacct aga t gt cct caac at gct cggcg t t gacgt ct c t gcggt aggt	360
aacct gaat t cgaccgcg ct at gacgat t t gct cggt c gt at t gct ga aaaat ccgcc	420
t acctat t gc t gggcgcgaa t gt cacct t a aacggf gaac cgat gt t gga t gct t cct ac	480
gt t caagaaa t t gacggcgt caaggt ggga t t t gt cggf a ct gt gaccac ct t gact aag	540
gacaaggt cg caccat ccgc agt t gaaggt gt ggagt t t t ct gaccccgf cgaggct acg	600
aat aaggaat ct gaccgt ct gaaggaat ct ggccaagcag acgt t gt t gt agcgct cat g	660
cacgaggacg cgcagcagt a cgct gct ggc t t caacaaca at gt ggat at cct t t t cgga	720
ggcgact ct c accagcgct c gcagggcat c at cgaacgt g at ggt gcgca gccact gcac	780
t gggcgcagg ggcat gaat a t ggcaaggt t ct ccaagacg ccgat at t t c ct t t aacaag	840
gacaccggcg aaat t gagt c cgt cgaat c acccagt acg accgct cgat gcct gaggt t	900
gaagcact ag cccct gat gc agaaat t gcc gct cgcgt gg cagccgct ga ggcagaagct	960
gaagagct t g gagct aaagt t gt cggccag at ggaccgcg ct act t t ccg t ggt caagat	1020
gagggcgcag gagcggggag caaccgcggt gt t gaat ct a cgt t gaact c gct aat t gct	1080
gat gccaac gcgcat cagt t gct aaggcg act ggt gcgg acgt ggat t t gggcat t at g	1140
aat gct ggt g gcgt acgt gc t gacct t cct gcaggcgat g t cact t t cca ggat gt gct t	1200
accgt gcagc ct t t cggcaa t t cgat t gca t accggcact t t gaccggcca agat at t t t g	1260
gat gct t t gg aagct cagt g gcagccagga t cgt ct cgt c cacgct t ggc t t t gggf ct a	1320
t ct gct ggat t t gagt acgc ct acgacca act gcagagc aaggccagcg cgt t at ct cc	1380
gcgacct t gg at ggccaaga aat t gacca t cagcggaat aact gt t gc aact t ccacg	1440
t t cct ct t cg at ggt ggcca caact t cgca t ct ct ggcca at gt ccaaaa cct cact gac	1500
gt gggct aca t ggact act c agt t ct caat gact acat ca aagat ggcg agaggt acag	1560
gaaggccagt ct gat at cgg t at cagcacc gaaggcacc t ggcagct gg t gaagaagt t	1620
acct t caacc t cacct cgct t aact acact at ggaagaag at ccacaagc caccacagcg	1680
accgt caccg t gggcgact gcaagaaacc gccgat at cg acgct cagt g gaat gct gaa	1740
gaagat ccgc agaagaat ga at t t ggccgt gct agcgt aa cgct gact ct gccagaggac	1800
at t gagggaaa ccgact t ggt t accgt aacc accgat gcc gcaccgagat t act gt gccg	1860
ct gagggcct t gggcaccaa cgagggcagc gacggcggct ccaat cct gg cagcagcgca	1920
cct ggcacag gt aagggt c t t ct cgggt gct t cggct g ct gcaggaat cgct ggagt g	1980
t t ggcagcga t t gcgggcat cgcccgct t t at t ggt ct ga accgt cagt t t gat cagt t c	2040
at cccagct a acat gcagcg cgct ct t ggt gacct gcgca gt cagct caa cgaggt t agc	2100
cacat caaat t ct ag	2115

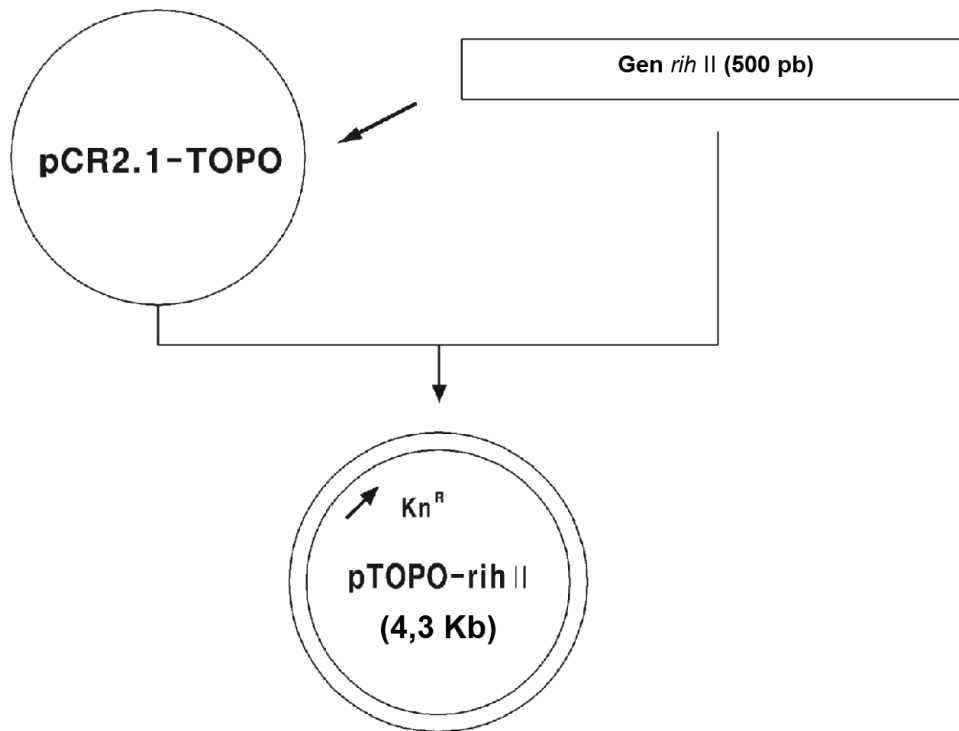


# ES 2 601 513 T3

5  
<210> 3  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador *rih II-F*  
  
10 <400> 3  
t gct ggcgat gcact t gaat 20  
  
15 <210> 4  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador *rih II-B*  
  
20 <400> 4  
t gt gcgacca at ggt ggggc c 21  
  
25 <210> 5  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador *ushA-F*  
  
30 <400> 5  
gt gt ct aagt ttcgccgt t t t ggc 24  
  
35 <210> 6  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Cebador *ushA-B*  
  
40 <400> 6  
gccggat ccc tagaattga t gt ggct aac ct cg 34

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante que produce inosina, en que el gen que codifica la nucleósido hidrolasa II que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ. ID. NO: 1 está inactivado y en que el gen que codifica la 5'-nucleotidasa que tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2 está sobreexpresado.
- 10 2. La *Corynebacterium ammoniagenes* de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inactivación se ha inducido por transformación de *Corynebacterium ammoniagenes* con un vector que comprende una parte de la secuencia representada por la SEQ. ID. NO: 1 y un marcador de antibiótico.
- 15 3. La *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la sobreexpresión del gen se ha inducido por transformación de una *Corynebacterium ammoniagenes* con un vector que contiene la secuencia representada por la SEQ. ID. NO: 2.
- 20 4. La *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante es *Corynebacterium ammoniagenes* CJIG651 KCCM-10829P.
5. Un método para producir inosina cultivando la *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y obteniendo la inosina acumulada de la solución de cultivo.



[Fig. 2]

