

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 477**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2011 PCT/KR2011/001866**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11115439**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 11756570 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2548949**

54 Título: **Microorganismos con producción mejorada de 5'-xantosina monofostato y 5'-guanina monofostato, y un procedimiento de producción de 5'-xantosina monofostato y 5'-guanina monofostato usando los mismos**

30 Prioridad:

19.03.2010 KR 20100024929

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

29.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CHO, JIN MAN;
LEE, JIN NAM;
KIM, HYE WON;
LEE, JI HYE;
YOON, NAN YOUNG;
LEE, KWANG WOO;
OH, YOON SEOK y
PARK, JANG HEE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 644 477 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

Microorganismos con producción mejorada de 5'-xantosina monofostato y 5'-guanina monofostato, y un procedimiento de producción de 5'-xantosina monofostato y 5'-guanina monofostato usando los mismos

Antecedentes de la invención5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un microorganismo *Corynebacterium* que tiene una actividad de prolina deshidrogenasa aumentada en comparación con su actividad endógena, a un procedimiento para la producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato a partir de una solución de cultivo mediante el cultivo del microorganismo transformado, y al uso del microorganismo para la producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato.

10 **2. Descripción de la técnica relacionada**

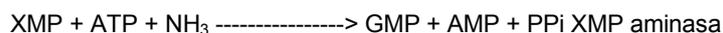
La 5'-guanina monofostato (GMP) es un aditivo alimentario extensamente utilizado como un potenciador del sabor, junto con la inosina monofostato (IMP). Se sabe que la GMP confiere por sí misma un sabor a seta y que aumenta la intensidad del sabor del glutamato monosódico (MSG, del inglés *monosodium glutamate*) cuando se la combina con él. Se utiliza a menudo en combinación con la IMP.

Los ejemplos de procedimientos para la preparación de GMP conocidos hasta ahora comprenden (1) la degradación enzimática de ARN (ácido ribonucleico) extraído de células de levadura, (2) fermentación de microorganismo directa a GMP, (3) fermentación de microorganismo a guanosina, seguido de fosforilación química, (4) fermentación de microorganismo a guanosina, seguido de fosforilación enzimática, (5) fermentación de microorganismo a xantosina 5'-monofostato (XMP), seguido de conversión a GMP por una cepa de *Corynebacterium* y (6) fermentación de microorganismo a XMP, seguido de conversión de XMP a GMP por *Escherichia coli*. Entre estos, el procedimiento (1) tiene las dificultades de un suministro de material limitado y de ser económicamente no beneficioso, y el procedimiento (2) sufre la desventaja de ser de bajo rendimiento debido a la permeabilidad de membrana del GMP. Por lo tanto, los otros procedimientos se utilizan extensamente en aplicaciones industriales.

En los procedimientos descritos anteriormente, cuando se produce GMP mediante la conversión de XMP en GMP, se necesita aumentar la productividad de XMP o suministrar de forma continua ATP, que se utiliza como un cofactor durante la conversión a GMP. Para aumentar la productividad de XMP, los procedimientos convencionales produjeron guanosina o microorganismos resistentes a XMP mediante mutación. Por ejemplo, la solicitud de patente coreana n.º 10-1991-018061 desvela una cepa inactiva en XMP aminasa que tiene la capacidad de producir XMP con un alto rendimiento, que es semiautótrofa para adenina y guanina, tolerante a análogos de guanosina y muy susceptible a lisozima, una enzima que destruye las paredes celulares. Adicionalmente, la solicitud de patente coreana n.º 10-2001-000513 desvela una cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* que es capaz de acumular de forma directa XMP a una alta concentración en un medio de cultivo y un procedimiento de producción de XMP utilizando la misma, en el cual la cepa se prepara irradiando el microorganismo "madre" con luz UV, tratando con el mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y seleccionando un mutante tolerante a norvalina, un análogo de valina que afecta a la biosíntesis de XMP. Adicionalmente, la solicitud de patente coreana n.º 10-2008-006537 describe un procedimiento de aumento del rendimiento de producción de XMP en el que se modifican los genes purN y purH, implicados en la biosíntesis de XMP. Además, la solicitud de patente coreana n.º 10-2007-0056491 desvela un microorganismo *Corynebacterium* sp. que produce XMP mediante la introducción de un gen que codifica la 5'-fosforribosil-l-pirofosfato amidotransferasa.

Como se mencionó anteriormente, para la conversión de XMP a GMP es crítico suministrar ATP, que se utiliza como un cofactor durante la conversión a GMP. La mayoría del ATP utilizado en la conversión de XMP a GMP se suministra a partir de una cepa productora de XMP. En la estrategia de conversión, el xileno aumenta la permeabilidad de membrana a ATP y XMP, y la adición de xileno al medio permite al ATP y al XMP penetrar en la cepa productora de GMP, seguido de la conversión de XMP en GMP. Por lo tanto, la estrategia de producción de GMP toma la estrategia de aumentar la productividad de ATP.

La conversión de XMP a GMP se representa por la siguiente fórmula de reacción:



Es decir, un suministro continuo de ATP, que sirve como un cofactor, es esencial para el proceso de conversión en el que se produce principalmente XMP y después se convierte a GMP mediante la adición de una enzima o microorganismo que tiene actividad XMP aminasa al medio de cultivo que comprende XMP y un microorganismo. Por lo tanto, es muy importante potenciar 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, en el proceso de conversión se reciclan nucleótidos basados en adenina para la producción de ATP.

Por lo tanto, la mejora de la productividad de XMP es necesaria para el alto rendimiento de producción de GMP, y la

productividad de XMP puede mejorarse aumentando la productividad de ATP. A base de este antecedente, los presentes inventores han realizado muchos esfuerzos para desarrollar un procedimiento para aumentar la productividad de ATP. Como resultado, descubrieron que la actividad potenciada de la prolina deshidrogenasa mejora los rendimientos de producción de XMP y GMP mediante el aumento de la producción de ATP.

- 5 Por lo tanto, los presentes inventores identificaron un gen responsable de la mejora del rendimiento de producción de XMP, diseñaron un vector que comprende el gen y prepararon un microorganismo del género *Corynebacterium* transformado con el vector, y descubrieron que puede producirse XMP o GMP a partir del microorganismo con un alto rendimiento, efectuando de este modo la presente invención.

Sumario de la invención

- 10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo *Corynebacterium* para producir 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato, que tenga actividad prolina deshidrogenasa aumentada en comparación con su actividad endógena.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato a partir de una solución de cultivo mediante el cultivo del microorganismo.

- 15 Otro objeto más de la presente invención es proporcionar el uso del microorganismo para la producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que muestra la estructura de un vector pDZ-putA que se prepara clonando un gen putA en un vector pDZ.

- 20 **Descripción detallada de las realizaciones preferentes**

En un aspecto, para conseguir los objetos anteriores, la presente invención se refiere a un microorganismo *Corynebacterium* para producir 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato, que tiene actividad prolina deshidrogenasa aumentada, en el que la actividad aumentada es el resultado de un número de copias aumentado de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa o el reemplazo de un promotor de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa.

La presente invención proporciona un microorganismo *Corynebacterium* que tiene actividad prolina deshidrogenasa aumentada en comparación con su actividad endógena, para mostrar productividades mejoradas de 5'-xantosina monofostato (XMP) y 5'-guanina monofostato (GMP).

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "prolina deshidrogenasa" es prolina deshidrogenasa/delta-1-pirrolin-5-carboxilato deshidrogenasa, y se sabe que está implicada en las rutas metabólicas de la alanina, el aspartato y el glutamato, las rutas metabólicas de la arginina y la prolina. La presente invención se refiere a un microorganismo que muestra rendimientos de producción de XMP y GMP mejorados, mediante el aumento de la actividad de la enzima correspondiente.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad endógena" se refiere a la actividad enzimática intrínseca en un microorganismo de tipo silvestre, y la expresión "que aumenta en comparación con la actividad endógena" significa actividad enzimática aumentada en comparación con la actividad intrínseca. La actividad enzimática aumentada de la presente invención comprende una mejora de una actividad endógena de un producto génico, la amplificación del gen endógeno mediante factores internos o externos, un aumento del número de copias del gen o un aumento de la actividad mediante la introducción de un gen ajeno, así como un aumento de la actividad de la propia enzima, para lograr efectos más allá de las funciones intrínsecas. La actividad enzimática aumentada puede lograrse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica sin limitación, por ejemplo, el aumento del número de copias de un gen, el reemplazo o modificación de un promotor, y el aumento de la actividad enzimática mediante mutación, pero el procedimiento no se limita a estos ejemplos.

45 La prolina deshidrogenasa, cuya actividad se aumenta mediante la presente invención, puede estar codificada por el gen putA de *Corynebacterium*. La presente invención puede comprender cualquier derivado o análogo, siempre que sea biológicamente idéntico o corresponda al gen. En la presente invención está comprendido cualquier gen, siempre que muestre una actividad biológica que sea sustancialmente idéntica o similar a la del gen putA, y tenga una homología con la secuencia del gen putA preferentemente del 70 % o mayor, más preferentemente del 80 % o mayor, incluso más preferentemente del 90 % o mayor, incluso mucho más preferentemente del 95 % o mayor, y muy preferentemente del 98 % o mayor. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 7 puede codificar el gen putA de la presente invención. Cuando el número de copias de un gen se aumenta mediante factores internos o externos, el experto en la materia puede determinar fácilmente el número de copias a aumentar de acuerdo con las necesidades y el fin. La amplificación del gen endógeno también puede realizarse utilizando un procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el cultivo bajo una presión de selección adecuada, pero el procedimiento de amplificación del gen endógeno no se limita a este ejemplo.

En un ejemplo preferente de la presente invención, se introduce un vector que porta un gen que codifica la prolina deshidrogenasa en un microorganismo *Corynebacterium*, de forma que se genera un microorganismo transformado con una potenciación con respecto a la actividad endógena.

5 El "microorganismo *Corynebacterium*" de la presente invención puede ser cualquier cepa sin limitación, siempre que sea conocida en la técnica y pertenezca al género *Corynebacterium*. Preferentemente, los ejemplos de la misma pueden comprender *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* y *Brevibacterium lactofermentum*, pero el tipo de microorganismo del género *Corynebacterium* útil en la presente invención no se limita a estos ejemplos. En detalle, el microorganismo *Corynebacterium* comprende *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium glutamicum* R, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 y derivados de los mismos. Es preferente *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1346 transformada a partir de *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10530. En concreto, la cepa de la presente invención puede ser una cepa que tenga dos o más copias del gen *putA* incorporadas en el genoma de *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10530, que es el resultado de la introducción en la misma de un vector que tenga el mapa de escisión de la FIG. 1 y la recombinación homóloga de al menos dos copias del gen *putA* con el gen endógeno mediante el cultivo del microorganismo transformado con el vector.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "5'-xantosina monofostato (XMP)" es un intermediario en la biosíntesis de ácidos nucleicos y es de importancia fisiológica en animales y plantas. Además, haya aplicación en una diversidad de campos que comprenden la industria alimentaria, la industria farmacéutica y la industria médica. Es un aditivo alimentario utilizado como un potenciador del sabor basado en ácido nucleico en sinergia con el glutamato monosódico. La XMP es un intermediario en el metabolismo biosintético de los nucleótidos purínicos, y es un importante material bruto para la producción de 5'-guanina monofostato (GMP). Preferentemente, el microorganismo transformado que tiene productividad de XMP mejorada se preparó y cultivó para obtener XMP a partir de la solución de cultivo. Como resultado, se descubrió que el microorganismo transformado mostraba una producción de XMP de aproximadamente el 4,5 % mayor que los microorganismos convencionales y, por lo tanto, la producción de XMP podría aumentarse utilizando el microorganismo.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "5'-guanina monofostato (GMP)" es uno de los nucleótidos, compuesto de guanosina y fosfato. Se encuentra en los ácidos nucleicos y se divide en 3 tipos de formas 5'-, 3'- y 2'-de acuerdo con la posición. En la presente invención se produce 5'-guanina monofostato como un cristal incoloro con forma de aguja y existe en el cuerpo en forma libre. Tiene una fórmula molecular de $C_{10}H_{14}N_5O_8P$. Sus sales de sodio proporcionan el sabor de seta shiitake y, por lo tanto, se utilizan como condimentos químicos. La GMP es uno de los potenciadores del sabor basados en ácido nucleico para proporcionar el sabor a seta. Preferentemente, la presente invención identificó un procedimiento de producción de 5'-guanina monofostato con un alto rendimiento, utilizando el microorganismo transformado, y se descubrió que el procedimiento mostraba una concentración de GMP aumentada aproximadamente el 7 %, en comparación con los procedimientos que utilizan microorganismos convencionales.

40 En la presente invención, se introdujo un vector que comprende el gen *putA* para preparar un microorganismo que tiene actividad prolina deshidrogenasa aumentada. Con respecto a los objetos de la presente invención, el vector puede comprender un vector que comprende un gen que tenga una actividad biológica sustancialmente idéntica a la del gen *putA*. Para los expertos en la materia es evidente que la secuencia del gen que muestra una función biológica sustancialmente idéntica o similar a la del gen *putA* puede diferir de acuerdo con el tipo y características del microorganismo transformado. Preferentemente, la presente invención se refiere a un vector recombinante que comprende el gen de SEQ ID NO. 7, que tiene el mapa de escisión de la FIG. 1. El gen de SEQ ID NO. 7 de la presente invención es una secuencia de nucleótidos del gen *putA* de tipo silvestre de *Corynebacterium*. El "gen *putA*" significa un gen que codifica la prolina deshidrogenasa. En el caso de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, el gen que muestra la función anterior es conocido con el número de referencia NC_006958, y su secuencia de ARNm se conoce como YP_224396.1.

50 En la realización preferente, la presente invención proporciona un vector recombinante que comprende el gen *putA* que representa SEQ ID NO. 7. El vector de la presente invención puede ser cualquier vector utilizado normalmente en la técnica, sin limitación, siempre que sea capaz de comprender al gen *putA*. El vector óptimo se selecciona preferentemente de acuerdo con las características del hospedador a utilizar. Preferentemente, el vector es pDZ-*putA*. En el ejemplo preferente de la presente invención, el gen *putA* de SEQ ID NO. 7 se introdujo en pDZ, preparando de este modo el vector pDZ-*putA* (FIG. 1).

55 El microorganismo transformado de la presente invención puede prepararse mediante una introducción del gen *putA* en un microorganismo hospedador. Preferentemente, el gen *putA* se clona en el vector, el cual se transforma en una célula.

60 La transformación puede realizarse mediante cualquier procedimiento, sin limitación, y realizarse fácilmente de acuerdo con un procedimiento típico conocido en la técnica. Como se utiliza en el presente documento, el término "transformación" significa la introducción de ADN en una célula hospedadora, de forma que el ADN pueda replicar, ya sea como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica, y es la modificación genética

artificial resultante de la captación de ADN ajeno. Los procedimientos de transformación típicos comprenden precipitación por CaCl_2 , un procedimiento de Hanahan en el cual el efecto de la precipitación con CaCl_2 se mejora en combinación con DMSO (dimetilsulfóxido) como material reductor, electroporación, transfección con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, transformación mediada por fibras de carburo de silicio, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por polietilenglicol (PEG), sulfato de dextrano, lipofectamina y transformación mediada por deshidratación/inhibición. La transformación con pDZ-putA de la presente invención no se limita a estos ejemplos, y puede lograrse utilizando cualquier procedimiento conocido en la técnica, sin limitación.

Como se utiliza en el presente documento, el término “vector”, que describe un vector recombinante que tiene la capacidad de dirigir una proteína diana a una célula hospedadora adecuada, se refiere a una construcción genética que comprende elementos reguladores esenciales a los que un inserto génico está ligado, de tal manera que se incorpore en el cromosoma de la célula hospedadora. Preferentemente, el vector recombinante que comprende el gen putA de la presente invención puede ser un vector recombinante que comprende el mapa de escisión de la FIG. 1. En el ejemplo preferente de la presente invención, el vector se introduce en *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10530 mediante el procedimiento de transformación, la cual se cultiva después en un medio selectivo para permitir el reemplazo del gen endógeno por dos copias del gen putA a través de recombinación homóloga, dando como resultado la inserción de dos copias del gen putA en los cromosomas. Como resultado, se designó un nuevo microorganismo transformado como KCJ-1346, generado por la transformación de *Corynebacterium ammoniagenes*, que se depositó con el número de referencia KCCM11068P en una Autoridad Internacional de Depósito, el Centro coreano de cultivo de microorganismos (KCCM, 361-221, Yurim B/D, Hongie-1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea) el 24 de febrero de 2010.

De acuerdo con la presente invención, XMP o GMP pueden producirse en el medio de cultivo con un alto rendimiento mediante fermentación directa del microorganismo transformado descrito anteriormente. Preferentemente, el microorganismo utilizado en el procedimiento es un microorganismo que tiene actividad mejorada de prolina deshidrogenasa, y el gen putA del vector se inserta en el cromosoma del microorganismo hospedador, aumentando de este modo la producción de XMP y GMP. Preferentemente, el microorganismo utilizado en el procedimiento de producción puede ser un microorganismo que tiene el número de referencia KCCM11068P.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato a partir de una solución de cultivo, mediante el cultivo del microorganismo de acuerdo con la presente invención.

Preferentemente, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de XMP, que comprende la etapa de cultivar el microorganismo *Corynebacterium* transformado con el vector que comprende el gen putA, de manera que se obtiene XMP, y también proporciona un procedimiento de producción de GMP, que comprende las etapas de (a) cultivar el microorganismo *Corynebacterium* transformado con el vector que comprende el gen putA; (b) añadir XMP a la solución de cultivo del microorganismo *Corynebacterium* obtenido en la etapa (a) y (c) obtener GMP a partir de la solución de cultivo de la etapa (b). Más preferentemente, se proporciona un procedimiento de producción de XMP mediante la acumulación de forma directa de XMP en el medio de cultivo, con un alto rendimiento, a través de la fermentación directa del microorganismo depositado. De forma adicional, el procedimiento de conversión se realiza mediante la adición de una enzima o un microorganismo que tiene actividad XMP aminosasa, preferentemente *E. coli*, al medio de cultivo que comprende XMP y el microorganismo transformado y, posteriormente, se separa la GMP y se purifica a partir del medio de cultivo de forma que se obtiene GMP. En una realización preferentemente, la presente invención se refiere a un procedimiento para aumentar la actividad prolina deshidrogenasa en un microorganismo *Corynebacterium*, para aumentar la producción de 5' xantosina monofostato o 5' guanina monofostato, en el que la actividad aumentada es el resultado de (i) aumentar el número de copias de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa, (ii) reemplazar o modificar un promotor de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa o (iii) aumentar la actividad enzimática mutando un gen que codifica la prolina deshidrogenasa en un microorganismo *Corynebacterium* de tipo silvestre.

El medio utilizado en la presente invención puede ser cualquier medio habitualmente utilizado en la técnica, sin limitación. Preferentemente, el medio contiene glucosa como fuente de carbono y, opcionalmente, una cantidad apropiada de diversas otras fuentes de carbono. Para su uso en cultivo un medio debe cumplir requisitos para el crecimiento del microorganismo. Los medios de cultivo para la cepa de *Corynebacterium* son conocidos en la técnica (por ejemplo, Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Bacteriology. Washington D.C., USA, 1981). Los ejemplos de fuentes de carbono a utilizar pueden comprender azúcares e hidratos de carbono tales como glucosa, galactosa, sacarosa, arabinosa, maltosa, xilosa, trehalosa, ribosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa, aceites y lípidos tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino y aceite de coco, ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de carbono pueden utilizarse de forma individual o en combinación. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno a utilizar pueden comprender fuentes de nitrógeno orgánicas tales como peptona, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, agua de macerado de maíz, soja y urea, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Estas fuentes de nitrógeno pueden utilizarse también de forma individual o en combinación. Los ejemplos de fuentes de fósforo a utilizar en el medio pueden comprender potasio dihidrógeno fosfato o potasio hidrógeno fosfato, o las correspondientes sales de sodio. Además, el medio de cultivo puede

comprender sales metálicas tales como sulfato de magnesio y sulfato de hierro necesarias para el crecimiento. Pueden estar comprendidos adicionalmente elementos esenciales tales como aminoácidos y vitaminas, o precursores adecuados, además de los materiales anteriores. Estos materiales pueden añadirse de forma apropiada al medio durante el cultivo, de una manera discontinua o de una manera continua.

- 5 Durante el cultivo, el pH del medio de cultivo puede ajustarse de forma apropiada mediante compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y amonio, o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico y ácido sulfúrico. Puede utilizarse para prevenir la generación de burbujas un agente antiespumante tal como éster de ácido graso de poliglicol. El medio puede airearse con oxígeno o con un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire) para mantener una condición aeróbica, o con gas de nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono para mantener las condiciones anaeróbica y microanaeróbica. La temperatura del cultivo se mantiene habitualmente a 20 °C a 45 °C, y preferentemente a 30 °C a 35 °C o a 35 °C a 37 °C. El cultivo puede continuarse hasta que se obtiene la máxima cantidad del material deseado y, preferentemente, esto puede lograrse al cabo de 10 a 160 horas.

- 15 El XMP o GMP puede secretarse en el medio de cultivo o permanecer dentro de la célula. El procedimiento de producción de XMP o GMP de la presente invención comprende la etapa de recuperar XMP o GMP a partir de las células o del medio de cultivo. El procedimiento de recuperación de XMP o GMP a partir de las células o del medio de cultivo se conoce extensamente en la técnica. El procedimiento de recuperación de XMP o GMP puede comprender filtración, cromatografía de intercambio aniónico, cristalización y HPLC, pero no se limita a ello.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del microorganismo de acuerdo con la presente invención para la producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato.

- 20 El microorganismo *Corynebacterium* para producir 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato, que tiene actividad prolina deshidrogenasa aumentada en comparación con su actividad endógena, es capaz de producir XMP o GMP con un alto rendimiento debido a la actividad mejorada de la prolina deshidrogenasa, utilizándose, de este modo, de forma eficaz para la producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato.

- 25 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solo para fines ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo 1: Clonación de putA obtenido de la cepa *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10530 productora de XMP y construcción del vector recombinante (pDZ-putA) para la incorporación genómica

- 30 En el presente Ejemplo, se utilizó el vector pDZ desvelado en la publicación de patente coreana n.º 10-2007-94433 para realizar la incorporación genómica del gen. Para la incorporación del gen en el genoma de *Corynebacterium* utilizando el vector pDZ, se construyó un vector pDZ que comprendía la secuencia del inserto en ambos extremos, debido a que debe estar comprendida en el vector pDZ una secuencia que tiene una homología con una región incorporada en el cromosoma.

- 35 En el presente Ejemplo, para la amplificación del gen putA, se obtuvo la secuencia de nucleótidos del gen putA (NCBI ID_3344496) basada en el NIH GenBank. A base de la secuencia, se sintetizaron dos parejas de cebadores (las SEQ ID NO. 1 a 4).

- 40 Se realizó la PCR en presencia de ADN polimerasa de alta fidelidad PfuUltra™ de alta fidelidad (Stratagene, USA) utilizando el genoma de *Corynebacterium* KCCM10530 como molde y los oligonucleótidos de las SEQ ID NO. 1 a 4 como cebadores, en las condiciones de PCR de 25 ciclos que consistían en desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos; apareamiento a 55 °C durante 30 segundos y polimerización a 68 °C durante 2 minutos. Los productos de PCR así obtenidos fueron dos copias del gen putA (putA-A, putA-B), cada uno de 4,4 kb de longitud, que se amplificaron utilizando los dos conjuntos de cebadores de las SEQ ID NO. 1 y 2, y las SEQ ID NO. 3 y 4, respectivamente.

- 45 SEQ ID NO. 1: CCCAAGCCTTGAGCGCGTTCGGTCACTCAACTA
 SEQ ID NO. 2: CAGCCAATCTTGCAGCCAA
 SEQ ID NO. 3: TGAGCGTTCGGTCACTCAACTA
 SEQ ID NO. 4: CGGGATCCCAGCCAATCTTGCAGTCCAA

- 50 Después de haber tratado con enzimas de restricción (putA-A: *Hind*III, putA-B: *Bam*HI), los productos de PCR putA-A, putA-B, se insertaron en el vector pDZ, que se había tratado previamente con *Hind*III y *Bam*HI, a través de la unión de tres trozos. Para finalizar, se obtuvo un vector pDZ-putA recombinante en el que estaban clonadas dos copias de gen putA en tándem. La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra la estructura del vector pDZ-putA para la incorporación en el genoma de *Corynebacterium*.

Ejemplo 2: Generación de la cepa insertada con putA

- 55 La construcción del vector pDZ-putA se transformó en la cepa KCCM10530 y se sometió a recombinación homologa secundaria con el genoma, para insertar una copia del gen putA en una posición adyacente al gen putA en el

5 genoma, como se describe en el Ejemplo 1. Por lo tanto, se obtuvo una *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1346 productora de XMP, que tenía dos copias del gen putA en el genoma de la misma. El nuevo microorganismo, denominado como KCJ-1346, se depositó con el número de referencia KCCM11068P en una Autoridad Internacional de Depósito, el Centro coreano de cultivo de microorganismos (KCCM, 361-221, Yurim B/D, Hongie-1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea), el 24 de febrero de 2010. La inserción de dos copias del gen putA en tándem se identificó utilizando PCR, utilizando un conjunto de cebadores (las SEQ ID NO. 5 y 6) que se dirigían a las secuencias de nucleótidos cadena arriba y cadena debajo de las dos copias del gen putA.

SEQ ID NO. 5: CGAACTACGTGGCACAGTTTG

SEQ ID NO. 6: AGCAGGCCATTA AAAACGACC

10 Ejemplo 3: Producción de XMP de la cepa insertada con putA

La cepa productora de XMP *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1346 preparada en el Ejemplo 2 se cultivó para producir XMP como sigue. La cepa "madre" *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10530 y la cepa KCJ-1346 se inocularon en respectivos tubos de 14 ml, conteniendo cada uno 3 ml del siguiente medio de siembra, y se incubó a 30 °C durante 20 horas con agitación a 200 rpm. Después, los cultivos de siembra se añadieron en una cantidad de 0,4 ml a 32 ml del siguiente medio de producción (24 ml de medio principal + 8 ml de medio adicional) en respectivos 15 matraces con deflector de ángulo de 250 ml, seguido del cultivo con agitación a 30 °C y 230 rpm durante 96 horas. Después de eso, la producción de 5'-xantosina monofostato se midió de forma cuantitativa utilizando HPLC. Las cantidades de XMP producidas por *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10530 y KCJ-1346 se proporcionan en la Tabla 1, a continuación.

20

[Tabla 1]

| Cepa | KCCM10530 | KCJ-1346 |
|-------|-----------|----------|
| (g/l) | 28,6 | 29,9 |

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)

25

Medio de producción (medio principal): glucosa 80 g/l, sulfato de magnesio 10 g/l, sulfato ferroso 20 mg/l, sulfato de cinc 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 de calcio 10 mg/l (pH 7,2)

Medio de producción (medio adicional): fosfato de monopotasio 10 g/l, fosfato de dipotasio 10 g/l, urea 7 g/l, sulfato de amonio 5 g/l

30 Como se muestra en la Tabla 1, se descubrió que KCJ-1346 aumenta la producción de XMP en 1,3 g/l, lo que corresponde al 4,5 % de aumento, en comparación con la cepa "madre" KCCM10530.

Ejemplo 4: Actividad de prolina deshidrogenasa de la cepa insertada con putA

35 La actividad prolina deshidrogenasa de *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1346 productora de XMP preparada en el Ejemplo 2 se ensayó como sigue. La cepa se inoculó en un medio que contenía 10 g/l de bacto-peptona, 5 g/l de extracto de bacto-carne, 5 g/l de extracto de 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 horas hasta que se obtuvo una DO de 10. Se recuperaron 10 ml del cultivo celular, se lavó dos veces con un tampón que comprendía HEPES 50 mM, acetato de potasio 10 mM, CaCl₂ 10 mM y MgCl₂ 10 mM, y se suspendió en 1 ml de tampón Tris-HCL 100 mM (pH 7,5).

40 Tras la ruptura utilizando un sonicador, el lisado celular se centrifugó para separar el sobrenadante. El sobrenadante se recentrifugó para proporcionar un sedimento que se suspendió después den 100 µl de tampón. Se utilizaron 10 µl de esta suspensión como una solución enzimática. Se preparó un tampón de reacción mezclando Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) y 2,6-dicloroindolifenol (Cl₂Ind) 50 µM). El Cl₂Ind se descongeló y se mezcló justo antes de la reacción. Se añadieron 10 µl de prolina 100 mM como sustrato y 10 µl de solución de enzima a 980 µl de la mezcla de reacción, seguido de la incubación a 30 °C durante 15 minutos con agitación. La actividad enzimática se determinó midiendo la concentración de Cl₂Ind reducido. El Cl₂Ind tenía un coeficiente de absorción de 22 cm⁻¹mM⁻¹ a 600 nm.

45

[Tabla 2]

| Cepa | KCCM10530 | KCJ-1346 |
|-----------------------------------|-----------|----------|
| Cl ₂ Ind reducido (µM) | 4,09 | 5,00 |

Como se muestra en la Tabla 2, se observó que KCJ-1346 aumenta la actividad prolina deshidrogenasa en el 22 %, en comparación con la cepa madre KCCM10530.

Ejemplo 5: Nivel de ATP en la cepa insertada con putA

Se midió el nivel intracelular de ATP en la cepa *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1346 productora de XMP

preparada en el Ejemplo 2 como sigue.

La cepa "madre" *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM10530 y la mutante KCJ-1346 se inocularon en respectivos tubos de 14 ml, conteniendo cada uno 3 ml del siguiente medio de siembra, y se incubaron a 30 °C durante 20 horas con agitación a 200 rpm. Posteriormente, se añadieron los cultivos de siembra en una cantidad de 0,4 ml a 25 ml del medio de siembra en respectivos matraces con deflector de ángulo de 250 ml, seguido del cultivo con agitación a 30 °C y 230 rpm durante 20 horas. Después de eso, se midió la DO y los niveles de ATP intracelulares en los cultivos celulares.

Como resultado, se descubrió que la mutante KCJ-1346 de la presente invención produce ATP a una alta tasa por DO, en comparación con la cepa "madre" KCCM10530, lo que indica que la cepa mutante de la presente invención podría mostrar altas productividades de XMP y GMP, en comparación con las cepas conocidas. Los resultados se muestran en la Tabla 3, a continuación.

[Tabla 3]

| Cepa | DO (A562) | Nivel de ATP (μ M) | Producción de ATP por DO (nivel de ATP/DO) |
|-----------|-----------|-------------------------|--|
| KCCM10530 | 17,3 | 37,54 | 2,17 |
| KCJ-1346 | 18,5 | 64,24 | 3,48 |

Como se muestra en la Tabla 3, el nivel intracelular de ATP por DO de KCJ-1346 aumentó en aproximadamente el 60 %, en comparación con el de la cepa madre KCCM10530.

15 Ejemplo 6: Fermentación de XMP y producción de GMP en la cepa insertada con puta

Se cultivó la cepa *Corynebacterium ammoniagenes* KCJ-1346 productora de XMP preparada en el Ejemplo 2 para producir GMP como sigue.

La cepa "madre" *Corynebacterium ammoniagenes* KCCM-10530 y la mutante KCJ-1346 se inocularon en respectivos tubos de 14 ml, conteniendo cada uno 3 ml del siguiente medio de siembra, y se incubaron a 30 °C durante 20 horas con agitación a 200 rpm. Después, los cultivos de siembra se añadieron en una cantidad de 0,4 ml a 32 ml del siguiente medio de producción (24 ml del medio principal + 8 ml del medio adicional) en respectivos matraces con deflector de ángulo de 250 ml, seguido del cultivo con agitación a 30 °C y 230 rpm durante 96 h. Para la conversión del XMP producido en GMP, se añadieron al líquido de fermentación los siguientes aditivos de conversión y XMP aminasa de *E. coli* en matraces Erlenmeyer, y después se realizó una reacción de conversión a 40 °C durante 2,5 horas.

Como resultado, se descubrió que el mutante KCJ-1346 de la presente invención aumenta la tasa de conversión, lo que explica la producción de GMP por XMP consumido, en comparación con la cepa "madre" KCCM10530. En consecuencia, la cepa mutante de la presente invención mostró una mejora en la productividad de GMP, en comparación con las cepas convencionales. Los resultados se muestran en la Tabla 4, a continuación.

[Tabla 4]

| Cepa | Concentración (g/l) | | Tasa de conversión (%) (GMP producido/XMP consumido) |
|-----------|---------------------|-------|---|
| | XMP | GMP | |
| KCCM10530 | 24,7 | 17,78 | 72,0 |
| KCJ-1346 | 25,9 | 19,02 | 73,4 |

Como se muestra en la Tabla 4, se descubrió que KCJ-1346 aumenta la tasa de conversión en el 1,4 % y el nivel de GMP en el 6,9 %, en comparación con la cepa "madre" KCCM10530.

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

Medio de producción (medio adicional): fosfato de monopotasio 10 g/l, fosfato de dipotasio 10 g/l, urea 7 g/l, sulfato de amonio 5 g/l

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

Efecto de la invención

Debido a la actividad mejorada de la prolina deshidrogenasa, el microorganismo *Corynebacterium* de la presente invención es capaz de producir XMP o GMP con un rendimiento mucho más alto que los microorganismos productores de XMP y GMP convencionales. Por lo tanto, XMP o GMP pueden producirse con un alto rendimiento utilizando el microorganismo de la presente invención.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> CJ Cheiljedang Corporation
- 5 <120> Microorganismo que tiene productividad de 5'-xantosina monofosfato y 5'-guanina monofosfato potenciada y un procedimiento de producción de 5'-xantosina monofosfato o 5'-guanina monofosfato usando el mismo
- <130> OPA11022/PCT
- <150> KR10-2010-0024929
- 10 <151> 19-03-2010
- <160> 7
- <170> KopatentIn 1.71
- 15 <210> 1
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> cebador directo para putA-A
- 25 <400> 1
cccaagcctt gagcgcgtcg gtcactcaac ta 32
- <210> 2
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> cebador inverso para putA-A
- 35 <400> 2
cagccaatct tgcagccaa 19
- <210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> cebador directo para putA-B
- 45 <400> 3
tgagcgtcgg tcactcaact a 21
- 50 <210> 4
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 55 <220>
<223> cebador inverso para putA-B
- <400> 4
cgggatccca gccaatcttg cagtccaa 28
- 60 <210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> cebador inverso de putA para PCR

ES 2 644 477 T3

<400>5
cgaactacgt ggcacagttt g 21

5 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador inverso de putA para PCR

<400> 6
agcaggccat taaaacgacc 20

15 <210> 7
<211> 3435
<212> ADN
<213> *Corynebacterium ammoniagenes*

20 <220>
<221> gen
<222> (1)..(3435)
<223> gen putA

25 <400> 7

atgactactg cgcacatac tcgcctaact gaatctaatac acgtcgaagc cgtcgttgat 60

gccgctgcc agcgcgcaag caagtggctc gcggtcactg aaggtgagca cgatgcttcc 120

tcagaacaac tagctgacct gcttcgtgat gaagacggtg ttgctttcac catggacttt 180

gtcgcaccgc ttatgcgccc ggaagatgac aaagtagcgg ccaaggcgcct taaggccatg 240

accaataaat tcgatccttc gtttctgggt cgttttaatac gcctgctggt cggatgggc 300

ggattcttcg gccctatatt gcccaacctg gttatgcctt tggcgcggtt gcgcatgcgg 360

caaatggctg gccacctggt gctcgatgcc gaatccgaca agctgaataa gactttggct 420

aaagctgcc agtccggtga acaattgaat ctcaacctgc tgggtgaggc ggtgctgggc 480

gaagatgaag cccgctcccg cgctgagcgc accctgcac tgattcgtaa tccgctggtc 540

acctatgttt ctgtgaaggc ctctccatg gtcgcgcagc taaaccctg ggatattgaa 600

ggttcgctgg agcgcctcaa agagcgtttg cttccgcttt acgatgaagc cgcgaagcgc 660

tctcccaacg tctttatcaa cttagacatg gaggaatata atgacctgca cctgaccatac 720

ES 2 644 477 T3

cggcctttca aagaaattct ggccgaccca aagttcaagg atctagaagt aggcattggt 780
 ttgcaggctt atctgccaga taccttcgag tgccctggggg atttgccgga atttgccgaa 840
 gagcgcgtgg cccagggcgg ggccgcgatt aagattcgcct tccgtgaaagg cgcgaatctg 900
 tccatggagc atgtccaagg cgaggtaaac ggctggcaag tccgcgacga cttgagtaaa 960
 gacgaggtcg atgccaaact ctaccgcctg ctggattata ttttgccccc gcagttcgag 1020
 ggagccgtgc gcattgggtg tgctacacat aacctcttta ccgcaggctt ggccatagag 1080
 ctgggtaaaa agcgcgacgt actgtccatg atggactcgg agatgctaca gggcatgtcg 1140
 ccatcgcagc aggcctgcggc acgcgagatg tttggccgcc agattctcta caccocagtc 1200
 gtgcacatgg aagacttcga tgcgcgggtg tcttacttgg tgcgcggtt ggaagaaaac 1260
 tctgccgagc agaacttcct ttatgctttg tttgcccag atgtggcaga taatgaaggg 1320
 cttacgccgc tgcagaagca ggaaaaggtc ttccgcgagg ctgttgctaa tccgtgggac 1380
 gtttttgccg ggccgcgccg caccocaggc cgtttaaccg aagaaggagg gctcaagct 1440
 gccaaagactg gccgctttgt caatgagcca gatactgacc cagccttggg agacaaccgc 1500
 gcctgggcac tggaggcatt ggctaataat ccaggcgcgc acgggatcac cgaggtcacc 1560
 gacacagagg ctgtaaacca ggctgtggcc aaagcccagg agttgggggc tcagtggggc 1620
 gcaaagcctg ccgatgaacg cgcgcgggtc ctgaggccca tccgtgatga acttgccgcc 1680
 agccgcggca agctagtcag cgttgctgct tatgaggcga ataagaccgt cacgcaaact 1740
 gaccocgaaa tctctgaggc catcgacttt tccgtctact acgcgcattc ggcacgtcag 1800
 ctogatgccg cgcgttctca gttcaccccc caccaggtea cctgggtgac tccgccgtgg 1860
 aatttcctta tccgtattcc gaccggaggc atgatggcag ccttggccgg gggctccggc 1920
 gtcacatca agccggcacc gcagggtggc cactgcgcga agaccgtcgt cgtgcccatt 1980
 cacactgcac ttgaagcga gggcttggat aaggacttag tccagctggt ttacaccgat 2040
 gaaggtgatg ccggcaaggc cctgatctcg catacggatg tcgataatgt gattctcacc 2100
 gggccttccg ataccgggca gctatttcgc tccctggccgc ccgagatgaa cttatctgcg 2160
 gaaacctccg gaaagaatgc gctgattatt accccagcag cagatcccga cctggccatc 2220
 gcagatctct acgactcagc gttcggccac tctggccaaa agtgcctggc agcttccctg 2280
 gttatcttcg tccgcgctgc cggcaagtcg gatcgcctac gcaatcagct tctcgatgcc 2340
 gtccgcactc tcaaagtcgg ccccggttc gaaatccaga ccaccatgaa tggcttgggt 2400
 gagccgccga gcgagaaact gctgcgcggc ctaaccocagc tggaccocggg ccgagaagtg 2460
 ctgattaagc ccgaaaagct caacgaagaa ggcaccctgt ggtcccctgg cgtgcgcgat 2520
 aatgtgcagc ctggctcgtg gtaccacctc aacgagtgct tccgaccggc cctaggcatc 2580
 atgcacgctg aaacctgga agaggccgct gaatggcaaa attccacggg ctttgggctc 2640
 acgggcggca ttcattcgcct tgacgatgaa gaactgcgct actggatcga caacgtcgaa 2700

ES 2 644 477 T3

| | |
|--|------|
| gtcggcaatg cttatgtcaa ccgcgggatt accggcgcgga ttgtgcagcg ccagtccttc | 2760 |
| ggtggctgga agaaatccgt catgggacca ggcgcaaaag ccggcgggcc gaactacgtg | 2820 |
| gcacagtttg gctcctggga agacgggtgac ctgaacccgg tcgatgtgga tatcgcgcog | 2880 |
| cagatcgtcg cgtggttacg cgaggtggca tcgttaagcg aagctgatac cgcctggctc | 2940 |
| tggcgcgccg ctgagctgga tcaattggcg tggcagacgg agtttgggcg cgagcatgac | 3000 |
| cgcaccggat tgggtctga ggcgaatata ttccgctacc gcccgctgct ggatgtcttg | 3060 |
| cgtatcccg taggtgctgg ataccagttg cgcgacgttt tacgccagca acttgcagcg | 3120 |
| ctgattacgg gaactgaaat ccggatttct gcgcctgccg agattgctgc ggagctaccg | 3180 |
| gttaatgtca cgttacagtc cgcgcgggaa tttgctgagg aggtcgcgaa tgcagaatcg | 3240 |
| gcccgaattc gcgcactagg cgaagtcgag ccggagggtt atgaggctgc ggtgaaatct | 3300 |
| aactcggtag ttctcgcgca gcccgctgct gccgatggcc gccgcgaget actgccttat | 3360 |
| cttctcgagc aggcggtcac cgtgaccatg caccgcttcg gaattatccg ttcggtagct | 3420 |
| ggcattaagc gctaa | 3435 |

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo *Corynebacterium* para la producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato, que tiene actividad prolina deshidrogenasa aumentada, en el que la actividad aumentada es el resultado de un número de copias aumentado de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa o un reemplazo de un promotor de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa.
2. El microorganismo *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la actividad prolina deshidrogenasa se aumenta mediante la mejora del nivel de expresión de un gen putA de *Corynebacterium*.
- 10 3. El microorganismo *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el gen putA tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 7.
4. El microorganismo *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo se transforma mediante la introducción de un vector que comprende un gen putA.
5. El microorganismo *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo se transforma mediante la introducción de un vector recombinante que tiene el mapa de escisión de la FIG. 1.
- 15 6. El microorganismo *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo tiene una productividad de ATP mejorada.
7. El microorganismo *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo es *Corynebacterium ammoniagenes*.
- 20 8. El microorganismo *Corynebacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo se identifica por el N.º de referencia KCCM11068P.
9. Un procedimiento de producción de 5'-xantosina monofostato (XMP) o 5'-guanina monofostato (GMP) a partir de una solución de cultivo mediante el cultivo del microorganismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un procedimiento de producción de 5'-guanina monofostato, que comprende
 - 25 (a) cultivar un microorganismo *Corynebacterium* transformado con un vector que comprende un gen putA;
 - (b) añadir 5'-xantosina monofostato aminasa a la solución de cultivo del microorganismo *Corynebacterium* obtenido en la etapa (a); y
 - (c) obtener 5'-guanina monofostato de la solución de cultivo de la etapa (b).
11. Uso del microorganismo *Corynebacterium* de la reivindicación 1 para la producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato.
- 30 12. Un procedimiento para aumentar la actividad prolina deshidrogenasa en un microorganismo *Corynebacterium*, para aumentar la producción de 5'-xantosina monofostato o 5'-guanina monofostato, en el que la actividad aumentada es el resultado de
 - 35 (i) aumentar el número de copias de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa,
 - (ii) reemplazar o modificar un promotor de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa, o
 - (iii) aumentar la actividad enzimática mediante la mutación de un gen que codifica la prolina deshidrogenasa en un microorganismo *Corynebacterium* de tipo silvestre.

[FIG. 1]

