

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 837**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.03.2010 PCT/KR2010/001760**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10114245**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.03.2010 E 10758970 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2415861**

54 Título: **Microorganismos de Corynebacterium con productividad mejorada de ácido 5'-inosínico, y procedimiento de producción de ácidos nucleicos usando los mismos**

30 Prioridad:

01.04.2009 KR 20090028145

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

07.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, JEONG HWAN;
KWON, JUNG GUN;
AHN, TAE MIN;
HWANG, SOO YOUN;
BAEK, MIN JI;
KWON, NA RA;
YOON, NAN YOUNG y
KIM, JU JEONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 657 837 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 de *Corynebacterium* con productividad mejorada de ácido 5'-inosínico, y procedimiento de producción de ácidos nucleicos usando los mismos

Antecedentes de la invención

5 **1. Campo de la invención**

El presente documento describe un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* y que produce ácido 5'-inosínico, en el cual la expresión de genes codificadores de enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina se incrementa más que la expresión intrínseca, y un procedimiento para producir ácido 5'-inosínico, que comprende cultivar el microorganismo del género *Corynebacterium* con productividad mejorada de ácido 5'-inosínico.

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

Uno de los compuestos de nucleótidos, el ácido 5'-inosínico es un material intermedio del sistema metabólico de la biosíntesis de nucleótidos, el cual se usa en una diversidad de campos tales como alimentos, medicinas y otras diversas áreas médicas y sirve para jugar un importante papel en la fisiología animal y vegetal. En particular, el ácido 5'-inosínico es un condimento de nucleótido, el cual ha despertado mucha atención como condimento sabroso, debido a que tiene efectos sinérgicos cuando se usa con glutamato monosódico (GMS).

15 Por ahora, los procesos bien conocidos para producir ácido 5'-inosínico incluyen un proceso de descomposición de manera enzimática de ácido ribonucleico extraído de células de levadura (Solicitud de Patente Examinada Publicada Japonesa N° 1614/1957, etc.), un proceso de fosforilación de manera química de inosina producido por fermentación (*Agric. Biol. Chem.*, 36, 1.511(1972), etc.) y un proceso de cultivo de un microorganismo capaz de producir ácido 5'-inosínico y recuperación de monofosfato de inosina (MFI) acumulado en el medio. Actualmente, los procesos de producción del ácido 5'-inosínico usando microorganismos son los más usados. Las cepas del género *Corynebacterium* se usan mucho como microorganismos para la producción del ácido 5'-inosínico y, por ejemplo, se ha descrito un procedimiento para producir ácido 5'-inosínico cultivando *Corynebacterium ammoniagenes* (Publicación de Patente Coreana N° 2003-0042972).

25 Para mejorar el rendimiento de producción del ácido 5'-inosínico por un microorganismo, se han realizado estudios para desarrollar cepas incrementando o disminuyendo la actividad o la expresión de las enzimas implicadas en la ruta biosintética o degradativa del ácido 5'-inosínico. La Patente Coreana N° 785248 describe un microorganismo en el que un gen *purC* codificador de fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintetasa se sobreexpresa en la ruta biosintética de purina y un procedimiento para producir ácido 5'-inosínico usando el mismo. Además, el documento de la Patente Coreana N° 857379 describe una cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* en la que la fosforibosilaminoimidazol carboxilasa codificada por *purKE* se sobreexpresa y un procedimiento para producir alta concentración de MFI en un alto rendimiento usando la misma.

30 Sin embargo, todavía hay una necesidad de desarrollar una cepa capaz de producir ácido 5'-inosínico en un rendimiento mayor y un procedimiento para producir ácido 5'-inosínico usando la misma.

35 Por lo tanto, los presentes inventores han dirigido estudios para desarrollar una cepa capaz de producir ácido 5'-inosínico con alta productividad. Como resultado, encontraron que la productividad del ácido 5'-inosínico se puede mejorar incrementando simultáneamente las actividades de las enzimas fundamentales implicadas en la ruta de la biosíntesis de purina más que la actividad intrínseca.

Compendio de la invención

40 Un objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo *Corynebacterium ammoniagenes* transformado que produce ácido 5'-inosínico y depositado en el "Korean Culture Center of Microorganisms" el 19 de febrero de 2009 bajo el número de depósito KCCM 10992P.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para producir ácido 5'-inosínico que comprende cultivar dicho *Corynebacterium ammoniagenes* transformado, y recuperar el ácido 5'-inosínico del medio de cultivo.

45 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra un vector pDZ para la inserción cromosómica en el microorganismo del género *Corynebacterium*.

La Figura 2 muestra un vector pDZ-2purFM para la inserción cromosómica en el microorganismo del género *Corynebacterium*.

50 La Figura 3 muestra un vector pDZ-2purNH para la inserción cromosómica en el microorganismo del género *Corynebacterium*.

La Figura 4 muestra un vector pDZ-2purSL para la inserción cromosómica en el microorganismo del género *Corynebacterium*.

La Figura 5 muestra un vector pDZ-2purKE para la inserción cromosómica en el microorganismo del género

Corynebacterium.

La Figura 6 muestra un vector pDZ-2purC para la inserción cromosómica en el microorganismo del género *Corynebacterium*.

5 La Figura 7 muestra un vector pDZ-2prs para la inserción cromosómica en el microorganismo del género *Corynebacterium*.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En el presente documento se describe un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* y que produce ácido 5'-inosínico, en el cual la expresión de los genes codificadores de enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina se incrementa más que la expresión intrínseca.

10 El microorganismo del género *Corynebacterium* descrito en el presente documento ha mejorado la productividad del ácido 5'-inosínico en comparación con la cepa parental, debido a que la expresión de los genes codificadores de enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina se incrementa más que la expresión intrínseca.

15 Como se usa en el presente documento, el término "enzima relacionada con la biosíntesis de purina" significa una enzima que cataliza la reacción implicada en la ruta de la biosíntesis de purina que produce una base de purina como producto final, e incluye fosforibosilpirofosfato amidotransferasa, fosforibosilglicinamida formiltransferasa, fosforibosilformilglicinamida sintetasa, fosforibosilformilglicinamida sintetasa II, fosforibosilaminoimidazol sintetasa, fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa, ácido inosínico ciclohidrolasa, ribosafosfato pirofosfoquinasa o similares.

20 Las enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina pueden ser una combinación de una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en fosforibosilpirofosfato amidotransferasa, fosforibosilglicinamida formiltransferasa, fosforibosilformilglicinamida sintetasa, fosforibosilformilglicinamida sintetasa II, fosforibosilaminoimidazol sintetasa, fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa y ácido inosínico ciclohidrolasa, y ribosafosfato pirofosfoquinasa.

25 Los genes codificadores de enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina, cuya expresión se incrementa más que la expresión intrínseca, pueden ser una combinación de un gen purN de SEQ ID NO. 36, el cual codifica fosforibosilglicinamida formiltransferasa, un gen purS de SEQ ID NO. 37, el cual codifica fosforibosilformilglicinamida sintetasa, un gen purL de SEQ ID NO. 38, el cual codifica fosforibosilformilglicinamida sintetasa II, un gen purKE de SEQ ID NO. 40, el cual codifica fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, un gen purC de SEQ ID NO. 41, el cual codifica fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa, un gen purH de SEQ ID NO. 42, el cual codifica ácido inosínico ciclohidrolasa, y un gen prs de SEQ ID NO. 43, el cual codifica ribosafosfato pirofosfoquinasa.

35 Los genes codificadores de enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina, cuya expresión se incrementa más que la expresión intrínseca, pueden ser una combinación de un gen purF de SEQ ID NO. 35, el cual codifica fosforibosilpirofosfato amidotransferasa, un gen purN de SEQ ID NO. 36, el cual codifica fosforibosilglicinamida formiltransferasa, un gen purS de SEQ ID NO. 37, el cual codifica fosforibosilformilglicinamida sintetasa, un gen purL de SEQ ID NO. 38, el cual codifica fosforibosilformilglicinamida sintetasa II, un gen purM de SEQ ID NO. 39, el cual codifica fosforibosilaminoimidazol sintetasa, un gen purKE de SEQ ID NO. 40, el cual codifica fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, un gen purC de SEQ ID NO. 41, el cual codifica fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa, un gen purH de SEQ ID NO. 42, el cual codifica ácido inosínico ciclohidrolasa, y un gen prs de SEQ ID NO. 43, el cual codifica ribosafosfato pirofosfoquinasa.

45 Como se usa en el presente documento, el término "incrementada más que la expresión intrínseca" significa que el nivel de expresión del gen es mayor que el expresado de manera natural en un microorganismo o mayor que el expresado en una cepa parental, e incluye un incremento en el número (número de copia) de los genes codificadores de la correspondiente enzima y de ese modo el nivel de expresión incrementado o un incremento en el nivel de expresión mediante mutación o un incremento en el nivel de expresión por ambos.

50 Un incremento en el nivel de expresión de un gen codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina incluye, pero no se limita a, un incremento en el número de copia del gen introduciendo además el correspondiente gen ajeno en una cepa o amplificando el gen intrínseco, o un incremento en la eficacia de transcripción o la eficacia de traducción mediante mutación en la secuencia reguladora de la transcripción o traducción. La amplificación del gen intrínseco se puede realizar fácilmente mediante un procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante cultivo bajo una presión de selección adecuada.

El nivel de expresión del gen codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina se puede incrementar introduciendo además el gen codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina en una célula o amplificando el gen intrínseco codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina.

55 El gen codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina, cuyo nivel de expresión se incrementa más que la expresión intrínseca, puede existir como dos o más copias en un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico al introducir una o más copias en una

célula, además del correspondiente gen intrínseco.

El gen codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina se introduce en un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico mediante transformación usando un vector recombinante que contiene dos copias del correspondiente gen que se colocan consecutivamente.

5 El vector recombinante usado para la preparación de un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico se puede seleccionar del grupo que consiste en los vectores recombinantes pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, y pDZ-2prs, que tienen los mapas de escisión de las Figuras 2 a 7 respectivamente, dependiendo de los genes introducidos.

10 Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico puede ser derivado de los microorganismos *Corynebacterium* capaces de producir ácido 5'-inosínico. Por ejemplo, se puede derivar un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico a partir de *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869, y cepas preparadas a partir de los mismos.

15 Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico puede incluir dos o más copias del gen codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina.

20 Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico puede ser *Corynebacterium ammoniagenes*, y más preferiblemente un *Corynebacterium ammoniagenes* transformado, en el cual la actividad de una combinación del gen prs y uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en purF, purN, purS, purL, purM, purKE, purC, y purH se incrementa para producir alta concentración de ácido 5'-inosínico.

25 Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico puede ser una cepa, en la cual la cepa de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610) productora de ácido 5'-inosínico es sometida a introducción de cada uno de los vectores recombinantes pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, y pDZ-2prs que tienen los mapas de escisión de las Figuras 2, 3, 4, 5, 6 y 7 en orden o en combinación, y una de dos copias de los genes purF, purN, purS, purL, purM, purKE, purC, purH y prs introducidos se sustituyen por los correspondientes genes intrínsecos por recombinación homóloga y, por tanto, cada dos copias de los genes purF, purN, purS, purL, purM, purKE, purC, purH, y prs se insertan en la cepa.

30 Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico puede ser *Corynebacterium ammoniagenes* que contiene dos copias de los genes codificadores de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina que son una combinación del gen purN de SEQ ID NO. 36, el cual codifica fosforibosilglicinamida formiltransferasa, el gen purS de SEQ ID NO. 37, el cual codifica fosforibosilformilglicinamidina sintetasa, el gen purL de SEQ ID NO. 38, el cual codifica fosforibosilformilglicinamidina sintetasa II, el gen purKE de SEQ ID NO. 40, el cual codifica fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, el purC de SEQ ID NO. 41, el cual codifica fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa, el gen purH de SEQ ID NO. 42, el cual codifica ácido inosínico ciclohidrolasa, y el gen prs de SEQ ID NO. 43, el cual codifica ribosafosfato pirofosfoquinasa, y preferiblemente *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120.

35 Un microorganismo del género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico puede ser *Corynebacterium ammoniagenes* que contiene dos copias de los genes codificadores de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina que son una combinación del purF de SEQ ID NO. 35, el cual codifica fosforibosilpirofosfato amidotransferasa, el gen purN de SEQ ID NO. 36, el cual codifica fosforibosilglicinamida formiltransferasa, el gen purS de SEQ ID NO. 37, el cual codifica fosforibosilformilglicinamidina sintetasa, el gen purL de SEQ ID NO. 38, el cual codifica fosforibosilformilglicinamidina sintetasa II, el purM de SEQ ID NO. 39, el cual codifica fosforibosilaminoimidazol sintetasa, el gen purKE de SEQ ID NO. 40, el cual codifica fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, el purC de SEQ ID NO. 41, el cual codifica fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetasa, el gen purH de SEQ ID NO. 42, el cual codifica ácido inosínico ciclohidrolasa, y el gen prs de SEQ ID NO. 43, el cual codifica ribosafosfato pirofosfoquinasa. La presente invención proporciona dicho microorganismo que es *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (KCCM 10992P).

40 El presente documento también describe un procedimiento para producir ácido 5'-inosínico, que comprende las etapas de cultivar un microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* y que produce ácido 5'-inosínico, en el cual la expresión de un gen codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina se incrementa más que la expresión intrínseca, y recuperar el ácido 5'-inosínico del medio de cultivo.

45 En el procedimiento para producir ácido 5'-inosínico, el medio y otras condiciones de cultivo usadas para el cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium* que produce ácido 5'-inosínico pueden ser los mismos que los usados normalmente en el cultivo de un microorganismo del género *Corynebacterium*, y fácilmente seleccionados y ajustados por los expertos en la técnica. Además, el cultivo se puede realizar usando cualquier procedimiento de cultivo conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, cultivo en lote, continuo y semicontinuo, pero no se limita a los mismos.

El microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* que produce ácido 5'-inosínico puede ser *Corynebacterium ammoniagenes*.

5 El microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* y que produce ácido 5'-inosínico puede ser *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 o *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (KCCM 10992P). En el procedimiento para producir ácido 5'-inosínico según la presente invención, el microorganismo es *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (KCCM 10992P).

El cultivo del microorganismo del género *Corynebacterium* se realiza cultivando la cepa en un medio convencional que contiene adecuadas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, aminoácidos, vitaminas o similares bajo condiciones aeróbicas ajustando la temperatura, el pH o similares.

10 Como fuentes de carbono, se pueden usar carbohidratos tales como glucosa y fructosa. Como fuente de nitrógeno, se pueden usar diversas fuentes de nitrógeno inorgánico tales como amoníaco, cloruro de amonio y sulfato de amonio, y se pueden usar fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, NZ-amina, extracto de carne de vaca, extracto de levadura, agua de macerado de maíz, hidrolisato de caseína, pescado o harina de pescado, y torta de soja desgrasada o harina. Ejemplos de los compuestos inorgánicos incluyen monohidrógeno fosfato de potasio, dihidrógeno fosfato de potasio, sulfato de magnesio, sulfato ferroso, sulfato de manganeso y carbonato de calcio. Cuando se necesita, se pueden usar vitaminas y bases auxótrofas.

El cultivo se realiza bajo condiciones aeróbicas, por ejemplo, sacudiendo el cultivo o agitando el cultivo, preferiblemente a una temperatura de 28 a 36 °C. Durante el cultivo, el pH preferiblemente se mantiene dentro del intervalo de pH 6 a 8. El cultivo se puede realizar durante 4 a 6 días.

20 A continuación, la presente invención se describirá a más detalles en referencia a los Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son solamente con propósitos ilustrativos, y la invención no pretende estar limitada por estos Ejemplos.

Ejemplo 1. Inserción de genes codificadores de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina usando el vector (pDZ) para la inserción cromosómica y de ese modo desarrollo de la cepa que produce alto rendimiento de ácido 5'-inosínico

25 Para insertar un gen ajeno en el cromosoma de la cepa de *Corynebacterium ammoniagenes*, se usó un vector recombinante basado en pDZ que contenía dos copias consecutivas del gen correspondiente. El vector pDZ es un vector para la inserción cromosómica en el microorganismo del género *Corynebacterium*, y se preparó por el procedimiento descrito en la Publicación de Patente Coreana N° 2008-0025355. La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra la estructura del vector pDZ.

30 Como se describe en las siguientes secciones (1) a (6), se prepararon vectores recombinantes, en los que los vectores recombinantes sirven para insertar el gen codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina en el cromosoma del microorganismo del género *Corynebacterium* para obtener dos copias de cada gen. La transformación por cada vector recombinante y la selección de los transformantes se realizó como sigue.

35 La cepa productora de ácido 5'-inosínico, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610), se transformó con el vector recombinante pDZ que contenía el gen deseado codificador de la enzima relacionada con la biosíntesis de purina por electroporación y, a continuación, se seleccionaron las cepas, en las cuales el gen portado por el vector está insertado en su cromosoma por recombinación homóloga, en un medio de selección que contenía 25 mg/l de kanamicina. La inserción cromosómica con éxito del vector se confirmó por el color de las colonias en un medio sólido (extracto de carne de vaca al 1 %, extracto de levadura al 1 %, peptona al 1 %, cloruro de sodio al 0,25 %, adenina al 1 %, guanina al 1 %, agarosa al 1, 5%) que contenía X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido). Es decir, se seleccionaron las colonias azules como un transformante, en el cual el vector estaba insertado en el cromosoma. La cepa, en la cual se insertó el vector en su cromosoma por un primer cruce, se cultivó con agitación (30 °C, 8 horas) en un medio nutriente (glucosa al 1 %, extracto de carne de vaca al 1 %, extracto de levadura al 1 %, peptona al 1 %, cloruro de sodio al 0,25 %, adenina al 1 %, guanina al 1 %). A continuación, la cepa cultivada se diluyó en serie desde 10^{-4} a 10^{-10} y el cultivo diluido se sembró en placas con un medio sólido que contenía x-gal. La mayoría de las colonias presentaron color azul, pero las colonias blancas también existieron a un nivel bajo. Seleccionando las colonias blancas, se seleccionaron las cepas en las que la secuencia del vector se separó del cromosoma por un segundo cruce. La cepa seleccionada se identificó como una cepa final por un ensayo de susceptibilidad para kanamicina y un análisis de secuencia de gen por PCR.

50 (1) Clonación del gen purFM y construcción del vector recombinante (pDZ-2purFM)

Los genes purF y purM están localizados cerca uno de otro en el cromosoma del microorganismo del género *Corynebacterium* y, por tanto, se construyó un vector purFM que contenía ambos genes y la región promotora para expresar ambos genes al mismo tiempo.

55 El cromosoma se aisló de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produce ácido 5'-inosínico, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el cromosoma como molde para obtener purFM, concretamente, un fragmento que contenía purF y purM consecutivamente colocados. Se usó ADN Polimerasa de alta fidelidad

PfuUltra[™] (Stratagene) como polimerasa, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s, emparejamiento a 53 °C durante 30 s, y polimerización a 72 °C durante 2 min. Como resultado, se obtuvieron dos genes purFM que contenían la región promotora (purFM-A, purFM-B). El purFM-A se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO. 1 y 2, y el purFM-B se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO 3 y 4. Los productos de amplificación se clonaron en un vector de *E. coli* pCR2.1 usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener los vectores pCR-purFM-A y pCR-purFM-B, respectivamente. Los vectores pCR se trataron con enzimas de restricción contenidas en cada extremo del purFM-A y purFM-B (purFM-A: EcoRI+XbaI, purFM-B: XbaI+HindIII), y cada gen purFM se separó de los vectores pCR. Después de eso, el vector pDZ tratado con enzimas de restricción, *EcoRI* y *HindIII* se clonó por ligación de 3 trozos para construir un vector recombinante pDZ-2purFM en el que los dos genes purFM se clonan consecutivamente. La Figura 2 muestra un vector pDZ-2purFM para la inserción cromosómica en *Corynebacterium*.

La cepa productora de ácido 5'-inosínico, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 se transformó con el vector pDZ-2purFM por electroporación, y un gen purFM se insertó además cerca del gen purFM intrínseco en el cromosoma por un segundo cruce, para obtener una cepa que tenía total dos copias. Los genes purFM consecutivamente insertados se identificaron por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO 5 y 6 que son capaces de amplificar las regiones de conexión de dos genes purFM.

(2) Clonación del gen purNH y construcción del vector recombinante (pDZ-2purNH), preparación de la cepa insertada con purNH

Los genes purN y purH están localizados cerca uno de otro en el cromosoma del microorganismo del género *Corynebacterium* y, por tanto, se construyó un vector purNH que contenía la región promotora para expresar ambos genes al mismo tiempo.

El cromosoma se aisló de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produce ácido 5'-inosínico, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el cromosoma como molde para obtener purNH, concretamente, un fragmento que contenía purN y purH consecutivamente colocados. Se usó ADN Polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra*[™] (Stratagene) como polimerasa, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s, emparejamiento a 53 °C durante 30 s, y polimerización a 72 °C durante 2 min. Como resultado, se obtuvieron dos genes purNH que contenían la región promotora (purNH-A, purNH-B). El purNH-A se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO. 7 y 8, y el purNH-B se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO 8 y 9. Los productos de amplificación se clonaron en un vector de *E. coli* pCR2.1 usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener los vectores pCR-purNH-A y pCR-purNH-B, respectivamente. Los vectores pCR se trataron con enzimas de restricción contenidas en cada extremo del purNH-A y purNH-B (purNH-A: BamHI+Sall, purNH-B: Sall), y cada gen purNH se separó de los vectores pCR. Después de eso, el vector pDZ tratado con enzimas de restricción, *BamHI* y *Sall* se clonó por ligación de 3 trozos para construir un vector recombinante pDZ-2purNH en el que los genes purNH se clonan consecutivamente. La Figura 3 muestra un vector pDZ-2purNH para la inserción cromosómica en *Corynebacterium*.

La cepa productora de ácido 5'-inosínico, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 se transformó con el vector pDZ-2purNH por electroporación, y un gen purNH se insertó además cerca del gen purNH intrínseco en el cromosoma por un segundo cruce, para obtener una cepa que tiene total dos copias. Los genes purNH consecutivamente insertados se identificaron por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO 10 y 11 que son capaces de amplificar las regiones de conexión de dos genes purNH.

(3) Clonación del gen purSL y construcción del vector recombinante (pDZ-2purSL), preparación de la cepa insertada con purSL

Los genes purS y purL están localizados cerca uno de otro en el cromosoma del microorganismo del género *Corynebacterium* y, por tanto, se construyó un vector purSL que contenía la región promotora para expresar ambos genes al mismo tiempo.

El cromosoma se aisló de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produce ácido 5'-inosínico, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el cromosoma como modelo para obtener purSL, concretamente, un fragmento que contenía purS y purL consecutivamente colocados. Se usó ADN Polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra*[™] (Stratagene) como polimerasa, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s, emparejamiento a 53 °C durante 30 s, y polimerización a 72 °C durante 2 min. Como resultado, se obtuvieron dos genes purSL que contenían la región promotora (purSL-A, purSL-B). El purSL-A se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO. 12 y 13, y el purSL-B se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO 14 y 15. Los productos de amplificación se clonaron en un vector de *E. coli* pCR2.1 usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener los vectores pCR-purSL-A y pCR-purSL-B, respectivamente. Los vectores pCR se trataron con enzimas de restricción contenidas en cada extremo del purSL-A y purSL-B (purSL-A: BamHI+Sall, purSL-B: Sall+BamHI), y cada gen purSL se separó de los vectores pCR. Después de eso, el vector pDZ tratado con enzima de restricción, *BamHI* se clonó por ligación de 3 trozos para construir un vector recombinante pDZ-2purSL en el que los genes purSL se clonan consecutivamente. La Figura 4 muestra un vector pDZ-2purSL para la inserción cromosómica en *Corynebacterium*.

La cepa productora de ácido 5'-inosínico, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 se transformó con el vector pDZ-2purSL por electroporación, y un gen purSL se insertó además cerca del gen purSL intrínseco en el cromosoma por un segundo cruce, para obtener una cepa que tiene total dos copias. Los genes purSL consecutivamente insertados se identificaron por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO 16 y 17 que son capaces de amplificar las regiones de conexión de dos genes purSL.

(4) Clonación del gen purKE y construcción del vector recombinante (pDZ-2purKE), preparación de la cepa insertada con purKE

Los genes purK y purE están localizados cerca uno de otro en el cromosoma del microorganismo del género *Corynebacterium* y, por tanto, se construyó un vector purKE que contenía la región promotora para expresar ambos genes al mismo tiempo.

El cromosoma se aisló de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produce ácido 5'-inosínico, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el cromosoma como molde para obtener purKE, concretamente, un fragmento que contenía purK y purE consecutivamente colocados. Se usó ADN Polimerasa *PfuUltra*TM de alta fidelidad (Stratagene) como polimerasa, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s, emparejamiento a 53 °C durante 30 s, y polimerización a 72 °C durante 2 min. Como resultado, se obtuvieron dos genes purKE que contenían la región promotora (purKE-A, purKE-B). El purKE-A se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO. 18 y 19, y el purKE-B se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO 20 y 21. Los productos de amplificación se clonaron en un vector de *E. coli* pCR2.1 usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener los vectores pCR-purKE-A y pCR-purKE-B, respectivamente. Los vectores pCR se trataron con enzimas de restricción contenidas en cada extremo del purKE-A y purKE-B (purKE-A: BamHI+KpnI, purKE-B: KpnI+XbaI), y cada gen purKE se separó de los vectores pCR. Después de eso, el vector pDZ tratado con enzimas de restricción, *BamHI* y *XbaI* se clonó por ligación de 3 trozos para construir un vector recombinante pDZ-2purKE en el que los genes purKE se clonan consecutivamente. La Figura 5 muestra un vector pDZ-2purKE para la inserción cromosómica en *Corynebacterium*.

La cepa productora de ácido 5'-inosínico, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 se transformó con el vector pDZ-2purKE por electroporación, y un gen purKE se insertó además cerca del gen purKE intrínseco en el cromosoma por un segundo cruce, para obtener una cepa que tiene total dos copias. Los genes purKE consecutivamente insertados se identificaron por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO 22 y 23 que son capaces de amplificar las regiones de conexión de dos genes purKE.

(5) Clonación del gen purC y construcción del vector recombinante (pDZ-2purC), preparación de la cepa insertada con purC

El cromosoma se aisló de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el cromosoma como molde para obtener purC. Se usó ADN Polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra*TM (Stratagene) como polimerasa, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s, emparejamiento a 53 °C durante 30 s, y polimerización a 72 °C durante 2 min. Como resultado, se obtuvieron dos genes purC que contenían la región promotora (purC-A, purC-B). El purC-A se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO. 24 y 25, y el purC-B se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO 25 y 26. Los productos de amplificación se clonaron en un vector de *E. coli* pCR2.1 usando un kit de clonación TOPO (Invitrogen) para obtener los vectores pCR-purC-A y pCR-purC-B, respectivamente. Los vectores pCR se trataron con enzimas de restricción contenidas en cada extremo del purC-A y purC-B (purC-A: BamHI+Sall, purC-B: Sall), y cada gen purC se separó de los vectores pCR. Después de eso, el vector pDZ tratado con enzimas de restricción, *BamHI* y *Sall* se clonó por ligación de 3 trozos para construir un vector recombinante pDZ-2purC en el que los genes purC se clonan consecutivamente. La Figura 6 muestra un vector pDZ-2purC para la inserción cromosómica en *Corynebacterium*.

La cepa productora de ácido 5'-inosínico, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 se transformó con el vector pDZ-2purC por electroporación, y un gen purC se insertó además cerca del gen purC intrínseco en el cromosoma por un segundo cruce, para obtener una cepa que tiene total dos copias. Los genes purC consecutivamente insertados se identificaron por PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO 27 y 28 que son capaces de amplificar las regiones de conexión de dos genes purC.

(6) Clonación del gen prs y construcción del vector recombinante (pDZ-2prs), preparación de la cepa insertada con prs

El cromosoma se aisló de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el cromosoma como molde para obtener prs. Se usó ADN Polimerasa de alta fidelidad *PfuUltra*TM (Stratagene) como polimerasa, y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa con 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 30 s, emparejamiento a 53 °C durante 30 s, y polimerización a 72 °C durante 2 min. Como resultado, se obtuvieron dos genes prs que contenían la región promotora (prs-A, prs-B). El prs-A se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO. 29 y 30, y el prs-B se amplificó usando los cebadores de SEQ ID NO 31 y 32. Los productos de amplificación se clonaron en un vector de *E. coli* pCR2.1 usando un kit de clonación

TOPO para obtener los vectores pCR-prs-A y pCR-prs-B, respectivamente. Los vectores pCR se trataron con enzimas de restricción contenidas en cada extremo del prs-A y prs-B (prs-A: BamHI+SpeI, prs-B: SpeI+PstI), y cada gen prs se separó de los vectores pCR. Después de eso, el vector pDZ tratado con enzimas de restricción, *BamHI* y *PstI* se clonó por ligación de 3 trozos para construir un vector recombinante pDZ-2prs en el que los genes prs se clonan consecutivamente. La Figura 7 muestra un vector pDZ-2prs para la inserción cromosómica en *Corynebacterium*.

La cepa productora de ácido 5'-inosínico, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 se transformó con el vector pDZ-2prs por electroporación, y un gen prs se insertó además cerca del gen prs intrínseco en el cromosoma por un segundo cruce, para obtener una cepa que tiene total dos copias. Los genes prs consecutivamente insertados se identificaron por PCR usando los cebadores de SEQ ID NO 33 y 34 que son capaces de amplificar las regiones de conexión de dos genes prs.

(7) Desarrollo de la cepa productora de alto rendimiento de ácido 5'-ionísico por aumento de la biosíntesis de purina

Se introdujeron combinaciones de los vectores pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, y pDZ-2prs construidos en (1) a (6) en el *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produce ácido 5'-inosínico. El orden de introducción de los vectores se seleccionó al azar, y los procedimientos de introducción e identificación usados eran los mismos que los anteriores.

Se usó el *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 como cepa parental, y se transformó con una combinación de pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, y pDZ-2prs, y una combinación de pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, pDZ-2purFM y pDZ-2prs para obtener *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 (2purNH + 2purSL + 2purKE + 2purC + 2prs) y *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (2purNH + 2purSL + 2purKE + 2purC + 2purFM + 2prs), que contenía dos copias de los genes codificadores de las enzimas fundamentales implicadas en la ruta biosintética de purina.

Ejemplo 2. Titulación de fermentación de *Corynebacterium ammoniagenes* recombinante

Se distribuyeron alícuotas de 3 ml del medio de siembra con la siguiente composición en tubos de ensayo que tenían un diámetro de 18 mm, y se esterilizaron bajo presión. A continuación, se inocularon la cepa parental de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401, y el *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 y *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 preparados en el Ejemplo 1, y se cultivaron con agitación a 30 °C durante 24 horas para usarse como cultivo de siembra. Alícuotas de 27 ml del medio de fermentación con la siguiente composición se distribuyeron en matraces de agitación Erlenmeyer de 500 ml y se esterilizaron bajo presión a 120 °C durante 10 minutos, y se inocularon alícuotas de 3 ml del cultivo de siembra en los mismos y se cultivaron con agitación durante 5 a 6 días. El cultivo se llevó a cabo bajo las condiciones de 200 rpm, 32 °C y pH 7,2.

El medio de siembra y el medio de fermentación usados tienen las siguientes composiciones.

Medio de siembra: glucosa al 1 %, peptona al 1 %, extracto de carne de vaca al 1 %, extracto de levadura al 1 %, cloruro de sodio al 0,25 %, 100 mg/l de adenina, 100 mg/l de guanina, pH 7,2.

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 %, 200 mg/l de sulfato de hierro, 20 mg/l de sulfato de manganeso, 20 mg/l de sulfato de zinc, 5 mg/l de sulfato de cobre, 23 mg/l de L-cisteína, 24 mg/l de alanina, 8 mg/l de ácido nicotínico, 45 µg/l de biotina, 5 mg/l de hidrocloreto de tiamina, 30 mg/l de adenina, ácido fosfórico al 1,9 % (85 %), glucosa al 4,2 % y azúcar puro al 2,4 %.

Después del término del cultivo, se midió la productividad de ácido 5'-inosínico por HPLC, y la cantidad de acumulación de ácido 5'-inosínico en el medio de cultivo se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla 1

Nombre cepa	DO celular (5 días después del cultivo)	Productividad (g/l/h) (5 días después del cultivo)
Grupo control (CJIP2401)	31,2	0,136
CN01-0120	31,8	0,155
CN01-0316	31,3	0,149

La cantidad de acumulación de ácido 5'-inosínico en el medio de cultivo se comparó con la de la cepa parental, *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401. Como resultado, en *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 y *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316, su productividad de ácido 5'-inosínico por hora se encontró que se incrementó a 10,9 a 11,4 % bajo las mismas condiciones, en comparación con la cepa parental, *Corynebacterium*

ammoniogenes CJIP2401.

El *Corynebacterium ammoniogenes* CN01-0316 que tenía productividad mejorada de ácido 5'-inosínico mediante el incremento de la actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina se depositó en el "Korean Culture Center of Microorganisms" (KCCM) localizado en Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, N° de referencia KCCM 10992P el 19 de febrero de 2009 bajo el tratado de Budapest.

Efecto de la invención

El microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* que produce ácido 5'-inosínico según la presente invención, en el cual se incrementa la expresión del gen codificador de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de purina más que la expresión intrínseca, se puede usar para producir ácido 5'-inosínico en una alta concentración y un alto rendimiento, reduciendo de ese modo los costes de producción.

<110> CJ CheilJedang Corporation

<120> Microorganismo perteneciente al género *Corynebacterium* que tiene productividad mejorada de ácido 5'-inosínico y método para producir ácido 5'-inosínico usando el mismo
<160> 43

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para purFM

<400> 1
cgacgagaat tccccgaccc gcatgagatg 30

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

<220>
<223> Cebador para purFM

<400> 2
gtatcgctca gagcggtagc ggtggcttcg 30

<210> 3
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para purFM

<400> 3
cgacgatcta gacccgaccc gcatgagatg 30

<210> 4
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador para purFM

<400> 4
gtatcgaagc ttgcggtagc ggtggcttcg 30

<210> 5

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

5

<220>
 <223> Cebador para 2purFM

<400> 5
 gctatcgttt cccctgaa 18

10

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador para 2purFM

<400> 6
 tgattctact aagttgac 18

20

<210> 7
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cebador para purNH

<400> 7
 cgggatcccg aggcgaagac gatattgagg acag 34

30

<210> 8
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Cebador para purNH

<400> 8
 acgcgtcgac gtgggaaacg cagacgagaa ca 32

40

<210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador para purNH

<400> 9
 acgcgtcgac gaggcgaaga cgatattgag gacag 35

50

<210> 10
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Cebador para 2purNH

<400> 10
 tcgatgcctg catcttgg 18

60

<210> 11

65

ES 2 657 837 T3

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador para 2purNH
 <400> 11
 ggcgataagg cttcgagt 18
 10 <210> 12
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador para purSL
 <400> 12
 20 gctcgatcc gcgatactca gccccagcaa cagcagaaaa tgaagc 46
 <210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para purSL
 30 <400> 13
 cagcgtcgac gcagccgtcg caggcaccaat cgcagcagt 39
 <210> 14
 <211> 46
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para purSL
 40 <400> 14
 cagcgtcgac gcgatactca gccccagcaa cagcagaaaa tgaagc 46
 <210> 15
 <211> 39
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador para purSL
 <400> 15
 gctcgatcc gcagccgtcg caggcaccaat cgcagcagt 39
 55 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador para 2purSL
 <400> 16
 65 acttgacctc cagcccta 18
 <210> 17

ES 2 657 837 T3

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador para 2purSL
 <400> 17
 aagaacaacg tcggcgtc 18
 10 <210> 18
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador para purKE
 <400> 18
 20 acgtcaggat ccctatcgt gctttgctgt 30
 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para purKE
 30 <400> 19
 ctctaaggta ccattgtac tagtagccgc 30
 <210> 20
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para purKE
 40 <400> 20
 acgtcaggta ccctatcgt gctttgctgt 30
 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para purKE
 50 <400> 21
 ctctaacta gaattgtac tagtagccgc 30
 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador para 2purKE
 <400> 22
 65 ccagctgggg ttccggtt 18
 <210> 23

ES 2 657 837 T3

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

5

<220>
 <223> Cebador para 2purKE

<400> 23
 ttctgatgcg cttcgttt 18

10

<210> 24
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Cebador para purC

<400> 24
 gctcggatcc cgcagtggt gttgcgctga acatgcg 37

20

<210> 25
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Cebador para purC

<400> 25
 gcaggtcgac cacggacata tcggttgct tcacgcggg 39

30

<210> 26
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Cebador para purC

<400> 26
 gcaggtcgac cgcagtggt gttgcgctga acatgcg 37

40

<210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cebador para 2purC

50

<400> 27
 gagcgctgt ccggcaagcg tttc 24

55

<210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Cebador para 2purC

<400> 28
 ggtggtgcg gtaagaacct ggcc 24

65

<210> 29

ES 2 657 837 T3

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador para prs
 <400> 29
 gctcgatcc ggattcccaa gcttgctcc ggg 33
 10 <210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador para prs
 <400> 30
 20 cagcactagt ggcagctacc acctccgcg ctgctg 36
 <210> 31
 <211> 33
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para prs
 30 <400> 31
 cagcactagt ggattcccaa gcttgctcc ggg 33
 <210> 32
 <211> 37
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador para prs
 40 <400> 32
 caattctgca ggcagctac cacctccgcg gctgctg 37
 <210> 33
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador para 2prs
 50 <400> 33
 cgtacgattc atgagatctt cga 23
 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Cebador para 2prs
 60 <400> 34
 65 caaagtcacg ggcggtggta g 21
 <210> 35

ES 2 657 837 T3

<211> 1500
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*

5 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1500)
 <223> purF

10 <400> 35

```

gtggtgaaca ctactttccc cagcgacgtg aatttagatg accaaggcga gcaagaaccc      60
cgcgaagagt ggggtgtctt tggcgtctgg gctcctggtg aagatggtgc gacactgacc      120
tactttggtc tgttcgcatt gcagcatcgt gggcaggaag ctgcaggatc cggcgtcggc      180
gatggagacc gcctcgttgt cttcaaagac atgggcttgg tctcgaatat tttcgatgag      240
tccattttaa attccctcca tggetccgtg ggcgtggggc atacgcgcta ctcgactgcc      300
ggtggcaaag agtggtcgaa tgtccagccg atgtttaata ccacctcaa tggggtagac      360
atcgctttgt gccacaacgg caacttggtg aactaccaag aactgcgcga tgaagcagta      420
gctctgggac ttaccgaga gaatgaaaaa tcctgtcgg attccatgat catgacagct      480
ttgctggcgc acggagtcgg ggaaggcaac tctgtctttg acgcccgtaa gcaactgctg      540
ccaagcatca aaggcgtttt ttgcttgacc ttaccgatg gcaagacctt gtacgccggc      600
cgtgacccgc acggtgtacg ccccttggtc attggccgct tggcgcaagg ctgggttgtt      660
gcttccgaaa cctgtgcgct ggatatcgtg ggcgcacagt ttatccgtga ggtagagccc      720
ggtgaactta tctctgtcaa tgaggcagga atccacagcg aaaaattcgc tgagccgaag      780
cgccagggct gcgtcttga atacgtctac ttggcaogtc cagacaccgt gatcaaaggc      840
cgcaacgctc acgcgacgcg cgtggatatt ggtcgcgcac ttgcgaaatc tcacctgcg      900
ccagaagctg acatggtcat ccccggtcca gaatccggaa acccggcagc tgttggctac      960
gcccgggaat cgggcctgac atttgcgcac ggcttggcga aaaacgccta cgtgggtcga     1020
accttcattc agcccacca gaccttgcgc cagctgggta ttcgcctcaa gctcaacccc     1080
ctgcgcgagg tcatcgaggg caagtcactc gttgtttag atgactctat tgtccgcggc     1140
aacacccaac gcgcgctggt gcgcatgctg cgtgaagcag gcgctgctga agtgcacgtg     1200
cgcattgctt caccgccagt caaatggcct tgtttctacg gcattgactt cgctcgcct     1260
ggtgaattga ttgctaatat caagccttct gatgatcctc aggtagtaac cgatgcagtg     1320
tgcgaagcta tcggagcaga ctctttaggg tttgtatctg tagatgagat ggttgaggca     1380
acgcaccaac ctatcaattc cttgtgtacc gcttgccttg atggcaacta cgaactcgga     1440
cttccgaccg ctaaccccaa tgetgacgct gtgcgaactt tgetcagcca aaagaactga     1500

```

15 <210> 36
 <211> 606
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*

ES 2 657 837 T3

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(606)
 <223> purN
 5
 <400> 36
 gtgactgaat cgccttcgca agttttgaaa gcacaagacc cgcttcaagt agtgggtgctg 60
 gtatctggca ccggatcttt gctgcaaaat attatcgaca accaagatga ctcctatcgg 120
 gttatcaagg tagtcgcgga taagccctgc ccggggatta accgagccca agatgcaggc 180
 atcgacaccg aagtctgtgct tttaggetca gaccgcgcgc agtggaaaca agaccttgtc 240
 gcagcggttg gtaccgccga tgttgtggtg tccgctggat ttatgaaaat cctggggcct 300
 gaattcttgg ccagctttga aggccgcaca ataaatacgc atcccgcact cctgccttcc 360
 tttccggggc cgcatggagt acgggatgcg ttggcttatg gcgtgaaagt caccggctct 420
 actgtccatt ttgtggacgc gggagtcgat actggccgca tcatcgaca acgcgcagta 480
 gagattgagg cagaagatga tgaggcaagc ttgcatgagc gcatcaaaag cgtcgaacgt 540
 gagcttatcg tgcaggtctt acgcgacgcg aatgttcaag accagcagct tattattgag 600
 atttaa 606
 <210> 37
 <211> 243
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*
 10
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(243)
 <223> purS
 15
 <400> 37
 20
 atggctcgtg ttgttgtcaa tgtcatgcc c aaggctgaaa tcctcgacc gcagggacaa 60
 gctgttgtcc gtgcacttgg acgcctgggt gtaaaccggag taagcgatgt ccgtcagggc 120
 aagcgctttg aaatcgaagt cgatgattca gtcagcgcgtg aagatctaga caaggtcgca 180
 gcaagcttgc tgccaacac cgtcatcgag gactacgaag ttgtagggt ggaggtcaag 240
 taa 243
 <210> 38
 <211> 2277
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*
 25
 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(2277)
 <223> purL
 30
 <400> 38

ES 2 657 837 T3

atgactgttt ccaatgacac agtagataat gcaaaggcca ctcccagact agaccagccg	60
tgggaagaac toggcttaaa gcaagacgaa taegacaaga ttgtaggcat ettgggcccg	120
cgcccaaccg atgctgagct gacggtttac tccgtgatgt ggtcggagca ctgctcttac	180
aagtcttcca agaccacact acgctacttt ggcgagacca ccaactgagga aatggcgctg	240
aagattcttg ccggtatcgg tgagaacgct ggtgtcgttg acatcggcga cggtgacgca	300
gtgaccttcc gcgtcgaatc ccacaaccac ccatccttcg togagcctta ccagggtgcc	360
gcgaccggtg ttggggcat cgtccgcgac atcatggcga tgggtgcacg tccaatcgca	420
gtgatggatc agctgcgctt cggcccagct gatgccccg ataccgcacg tgttctgccg	480
ggcgttgttt ccggcatcgg cggttacggc aactccctcg gcctgccgaa catcggcggc	540
gagaccgtct ttgatgagtc ttatgcggc aaccactgg tcaacgcact gtgcgtgggt	600
accttgccg tggaagacct gaagctggct tttgcttccg gtactggcaa caagtgatg	660
ctctttggct cccgcacggg cctcgacggc atcggcggcg tatccgtttt gggttctgct	720
tccttcgaag aaggcgaaga gcgcaagctt cctgcagtcc aggtcggcga ccattcgcg	780
gaaaaagtcc tcatogaatg ctgcctggag ctctacgctg cgggcgtcgt tgcgggtatt	840
caggaccttg gtggcgggtg cctcgcatgt gcgaacctg agctggcagc agctggcgac	900
ggcggcatgg tggccaacct ggataatggt ccactgcgtg cagagaacat gtccgccgca	960
gaaatcctgg cttccgaatc ccaggagcgc atgtgtgctg ttgtctccc agataacgtg	1020
gagaagtcc gcgagatctg tgaaaagtgg gacgtaacgt gtgctgaaat cggtgaaagt	1080
accgataaga aagacaccta cctcgtgtac cacaacggtg agctggtagt agacgctccg	1140
ccatcaacta tcgatgaagg ccctgtctac gagcggccat acgcacgcc tcagtggcag	1200
gatgagatcc agcaggctcc ggaaattgca cgtccggaat cottggtaca ggcattcaag	1260
gacatggtgt cctcccagc tctgtcatcg cgtgcattta tcaactgagca gtatgaccgc	1320
taagtgcgcg gtaacaccgt caaggcgaag cagtctgact cgggcgttct gcgtatcaat	1380
gaggaaactt ctgcgggtgt cgcaatttct gccgatgcct ccggtcgcta caccaagctg	1440
gaccaaaca tgggtgcacg tttggcgtg gctgaggcat accgcaactg tgcgtgacc	1500
ggcgcacgac catatcgggt gaccaactgc ttgaacttcg gttctccaga aaacaccgac	1560
gtgatgtggc aattccgcga ggccgttcac ggtctggctg acggttctaa ggaactgaat	1620
atcccagtct ccggcggtaa cgtctccttc tacaaccaga ctggtgatga gccaatctg	1680
ccgaccccag ttgttggcgt gctcgggtgc attgatgatg ttcacaaggc actggccat	1740
gacttgggcg gcattgatga gcctgaaacc ctgattctgc ttggtgagac caaggaagaa	1800
ttcggcggct ccatctggca gcaggtctcc ggcggcggcc tgcagggtct gccaccacag	1860
gtggatctgg cgaatgaggc aaagctggcg gacttcttcg tcggcaaac ctccgttgca	1920

ES 2 657 837 T3

gcctcccacg acctctctga gggcggctctg gctatcgccg cgtttgagat ggcgcaaaag 1980
 aacaacgctg gcgctgacct tgatttgagc gttgtacacg aggatgcact gaccgcactg 2040
 tttagtgagt ccgcatcgcg tgttctgatt tccaccgctg ctgaccacct cgatggaatc 2100
 ttgcagcgtg cttccgagct gggcattcca gctgtcgtgg taggaaccac caatgattcc 2160
 ggcaacatca ccttcgctgg tgaagaagtt gctaccgctg agctgcgcca ggcattggtct 2220
 gcaaccttgc caaacctggt tggccacgct gttggcgcta attccgtagt cgaataa 2277

<210> 39
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1056)
 <223> purM

<400> 39

atgtctgaaa atacttacgc cgcggcagge gtcaacattg aagaaggcga ccgocccggt 60
 gagcttttcg ctccactgge taagcgcgct acccgtccag aggtaatggg tggactcggg 120
 ggcttcgccc gactgtttaa gctcggcgaa tacaagagc caatccttgc agctggctcc 180
 gacggcgtgg gcaccaagct cgcctgtgcc caggcaatgg ataagcacga caccatcggc 240
 attgacctgg ttgcaatgtg cgtcgatgac ttggctcgtg gtgggtgctga gccactattt 300
 ctccaggact acatcgcagt aggcaaggtt gttccggaaa aggttgcgca gattggtgcc 360
 ggtattgctg agggctcgtg gcaggcagge tgtgcacttc ttgggtggcga gaccgctgag 420
 caccocggcg taatgaatga aaaggactac gatgtttccg ccaccgctgt cggcgttgctc 480
 gaagcagacg agcttctcgg accagacaag gttcgcgacg gcgatgtttt gattgccatg 540
 ggctcatccg gactgcactc caatggttac tccttggcgc gccacgtctt gttagagcag 600
 gcaggattgc cgtcogatgg ctacatogat gaccttggcc gcacgcttgg tgaagagctc 660
 ctggagocga cccgcatcta cccaaggac tgcctggcgc tagtttctga gtgtgacggt 720
 getactttct gccacgtcac cggcgggtggc ttggcaggca acctcgagcg cgtgctacct 780
 gaaggccttg tcgagaggt taaccgcgca tcgtggaccc cagcagcgat tttccgcacc 840
 atcgcgtctt tcggcaaggt cagcctggaa gagatggaaa agaccttcaa catgggcggt 900
 ggcattgatc ctatcgttcc ccctgaagac cgtgaccgcg ccttggcgat gctaactgcg 960
 cggcacgctg atgcatggga gctgggctcg gttcgcacca agaaggaaga cgacaccgca 1020
 ggtgttgtca tgcaaggtga gcactctaac ttctaa 1056

<210> 40
 <211> 1779
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*

<220>

ES 2 657 837 T3

<221> gen
 <222> (1)..(1779)
 <223> purKE

5 <400> 40

atgaaacgcg tgagtgaaca agcaggaaac ccagacggaa accctcaagc acatgttccc	60
ggcatgccgg ttatcgccgt tattggtgat ggccagctag ctcgcatgat gcaaaccgcc	120
gccattgagc tcggccaatc gctgcgccctt cttgccggcg cacgcgatgc ctctgoggca	180
caagtatgcg cggatgtagt gcttgggtgat tacaccaact acgacgactt getcaaagcc	240
gtcgacggtg ccaccgctgt cacttttgac catgagcacg tgcctaata gcaacctcacc	300
gcgttgatcg atgcaggcta taacgtgcag ccacaacctg ctgcgctgat taacgcccaa	360
gacaaattgg ttatgcgcga gcgcctcgcc gagctgggcg caccctgcc gcgctttgcg	420
ccgattgaat ctgcccaga tgcgtacgat ttttgacct tgacgtccgg gcaggtctgt	480
ctgaaggcgc gccggggtgg ctacgacggc aaaggcgtgt ggtttccgaa taatgaatct	540
gagctgactg ctttggcttc tgaccttcg cgcgcggcg tggccttgat ggtgaagag	600
aaggttgcgc tgggtccgga gctttccgtg ctggtcgcgc ggactccctc gggcgagggtt	660
gctacttggc cgctgactga gtctgtgcag cgcaacggtg tgtgcgctga agctgtcgcg	720
ccagccccgg gagttgacct gcagctgcag caacgcgctg agacactggg tgaagagatt	780
gccaccgagt tgggtgtaac tgggtgtctc gcggtagagc tttttgcatt tgcgaatgag	840
tccggtgagg aagatatgc ggttaatgaa ctggcaatgc gcccgacaaa taccggccac	900
tggaccctag atggttctgt gacctcccaa tttgagcagc acctgcgcgc ggtgatggat	960
gagccactgg gggatacatc cacgcttgc ccagtcaccg tgatggcaa cgtcttaggc	1020
gctgacgaag acccaaagat gccaatgggc gagcgtgcc gagaagtggc gcgcgcttc	1080
ccgcgagcca aagtccatct ctacggcaag gggcatcgcc caggccgtaa gattggccac	1140
gtgaacctca ccggtgagga cgtagaggca acccgtcgcg atgctcgtt ggtgcggat	1200
ttcctcgtga acgccgcgtg gtctgataac tgggtccgta aatagcaaga tgtatcaaga	1260
tatataagga aagaaatgac tgcaccgcta gttgggctca tcatgggctc tgattctgat	1320
tggccaaccg ttgaaccagc agctgagggt ctgccgaat tcggtgttcc ttttgagggtg	1380
ggcgtggtct ctgcgcaccg cacgcgggaa aagatgctgg attacgcaa gcaagcccac	1440
actcgcggca tcaaggtgat tgttgcctgt gccggtgggg cagcgcacct accaggcatg	1500
gtggctgcag caactccttt gccagttatt ggtattccac gtgccttgaa agatttgaa	1560
ggtctggact ctttgcgtc tategtgcag atgccagctg gggttccggt tgcgaccgtg	1620
tctatcggcg gcgctaagaa tgctggcttg ctogccatcc gtaccctggg cgtgcagtac	1680
tcagaattgg ttgaacgcat ggccgattac caagaaaata tggccaagga agttgagcaa	1740
aaagacgcca atcttcgcgc caagctcatg ggggactag	1779

<210> 41

ES 2 657 837 T3

<211> 888
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*

5 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(888)
 <223> purC

10 <400> 41

```

atgcgcccac agctttctga ttatcagcac gtatcctccg gcaaagtccg cgatatctac      60
gaagtagatg acaaacacttt gctcatggtg gtcaccgacc gcatactccg ctagacttc      120
gcactagagc cagccatccc cgataaaggc egggttctta ccgcaaccac catgttcttc      180
ttcgacgcca tcgatttccc gaaccatttg gcaggaccca tcgatgatgc gcggattcca      240
gaagaagtat tgggcccagc gatcatcggt aagaagctca acatgctgcc ctttgagtgc      300
gttgcccgcg gttacctcac cggttccggc ttgaaggaat acaacgctaa cggcacccgtg      360
tgccgcatcg agctgccaga aggcttggtt gaggcgtcgc gtctgccaga gccaattttc      420
accccagcca ccaaggcaga gcagggcgac cacgatgaaa acgtcagctt cgagcgcgtg      480
gtgcaggacc ttggccaaga gcgcgcagag cagcttcgcg atgaaacct gcgcatctac      540
tccgcccgcg ccaagattgc cgaagaaaag ggcatcatct tggctgatac gaagtttgaa      600
ttcggccttg attccgaagg caatctggtc ttgggggatg aagtacttac gcctgattcc      660
tcccggctact ggccagcaga cacctacgcg gaaggcattg tgcagcccag ctttgacaag      720
cagtacgtgc gcaactgggt gacctcggag gaatccggct gggatgtgga gtcggaacc      780
cagccgccag tgcttcccga tgacatcgtc gccgccacc gcctgcgcta catcgaggct      840
tatgagcgct tgtccggcaa gcgtttcacc gacttcattg gcggttaa      888
  
```

15 <210> 42
 <211> 1551
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*

20 <220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1551)
 <223> purH

25 <400> 42

```

atgagtgatg accgcaagca gatcaagcgt gcactaatta gcgtttatga caagacaggg      60
ctcgaagagc tcgctcgcac gcttgacagc gcaggcgtag agattgtgtc caccggtcc      120
  
```

ES 2 657 837 T3

accgccgcca agattgctga tcttggtatt aacgtcactc cggttgaatc tctcaccgga 180
 tteccagagt gcctcgaagc cgcggttaag accttgcacc cacgcgtgca tgcgggcatt 240
 ttggctgata cccgcaagcc ggatcacctt aatcagctgg aagagcttga gattgagcca 300
 ttccagttgg togtgggtaa cctgtacceca tttaaagaga ctgtagcttc tggcgcagac 360
 ttcgatgggt gcgtcgagca gattgatata gccgggtccat ccatggtcog tgetgctgcc 420
 aagaaccacc catcgggtggc ggttgttgta gaccacagcc gttacggcga catcgtctgag 480
 gctgtcgtctc agggcggatt cgatctggcg cagcgtctgtc agctggccgc gactgcgttt 540
 aagcacacgg cagattatga tgttgacagt tctggctggg ttgccagca gcttgccgat 600
 gactctgttg cctctgtctga gcttgaaggc gacgcgtctgc gttatggtga gaacctcac 660
 cagcaggctt ccatcgttcg tgaaggcacg accgggtgtt ctaatgcgaa gcagctgcac 720
 ggtaaggaaa tgagctacaa caactaccag gacgcggatg ccgcatggcg cgcggcttgg 780
 gatcatgaac gtccatgtgt agcaattatt aagcacgcta acccttgcgg tatcgtctgtt 840
 tctgatgagt ccatcgcagc agcacacgca gcggcacacg cctgtgacct aatgtccgct 900
 ttcgggtggcg ttattgcggt caaccgcgaa gtcaccaagg aaatggcaac ccaggttgct 960
 gacatcttca ccgaggtcat catcgcaccg tcctacgaag atggagccgt cgagattttg 1020
 cagggcaaga agaattctc catccttgtt gctgagcatg aagtaccagc agtagaggtc 1080
 aaagaaatct ctggtggccg tctgctgcag gaagcagacg tttaccaggc tgagggcgat 1140
 aaggcttcga gttggacttt ggctgccggc gaagctgcat ccgaggaaaa gctcgcggag 1200
 ctggaattcg cttggcgcgc agtacgctcg gtaaagtcca acgcatctt gttggcgcac 1260
 gaaggtgcaa ccggtggcgt gggatggggc caggtcaacc gcgttgatc ggccaagtgt 1320
 gctggtgacc gcgcgaatac tttggctgat tccgcagagc gtgctcgcgg ttcgctgca 1380
 gcatcggatg cgttcttccc attcgcgat ggttgcagg tgcttatcga tgccggcgtt 1440
 tccgcccgtt tocagcccgg cggctccatc cgcgatgaag aagtattgc tgccgctgaa 1500
 gcagccggta tcaccatgta cttcactggc acccgcactc tcgocacta a 1551

<210> 43
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium ammoniagens*
 <400> 43

5

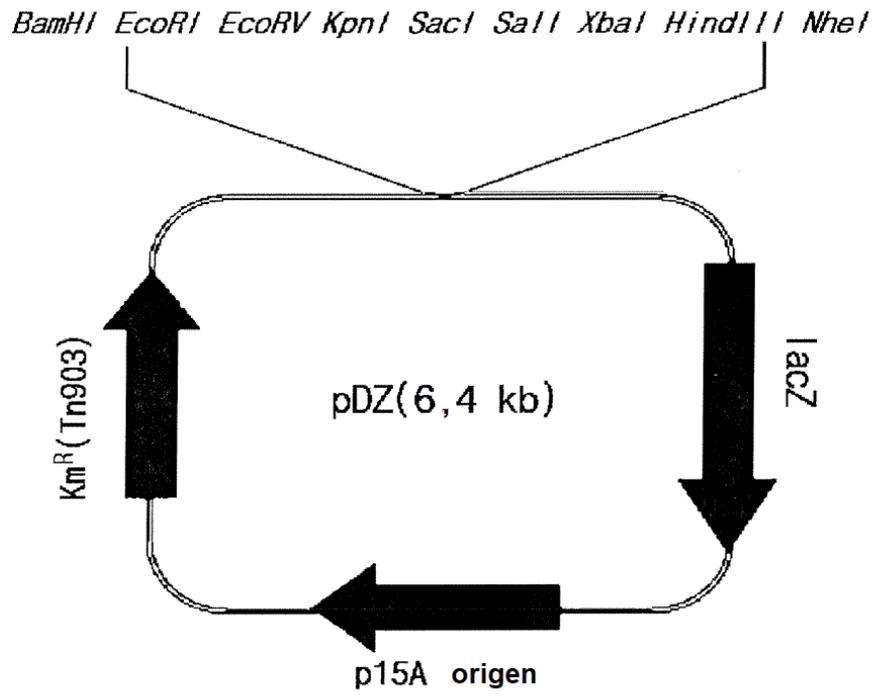
ES 2 657 837 T3

atgaccggca agatttctga tagccgcaag aatatgatgc tgttttcogg gcgcgcccac	60
ccagagttgg gtgaggctgt tgccaaggaa ttgggcactg acttggttcc taccaccgcc	120
cgtgactttg cgaatggcga aatcttcatt cgettogaag agtccgttcg tggcgcagat	180
tgctttgttt tgcagtccca caccagccg ttgaacaagt ggctcatgga gcagctcatc	240
atgattgatg cgctcaagcg tggttccgct aagcgcacca cggccatctt gccgttctac	300
ccatatgctc gccaggacaa gaagcacctc ggtcgcgagc ctatttcogg tcgcctagtg	360
gctgacctgc tggctaccgc aggtgctgac cgcattgtgt cggtggactt gcacaccgac	420
cagatccagg gtttcttcga cggccctgtc gatcacatgc acgccatgcc gattttgacc	480
gagtacatcc agtccaagta ctccatcgac aacattgttg tggctctccc agatgcaggc	540
cgcgtaaggt ttgcagaaaa gtgggcgcat gagcttggcg atgccccact ggcattcgtt	600
cacaagtctc gctccaacac tgaagcgaat aaaaccgtgt ccaaccgctt ggtcgggtgat	660
attgagggca aggactgcat cttgctcgat gacatgattg ataccggcgg caccatcgct	720
ggcgcggtcc gcgtactgcg tgaagctggc gcacgttccg tcgttatcgc atgtaccac	780
ggcgttttct ctgacccgc acgcgagcgt ctgtctgagt gcggtgctga ggaagttatc	840
accaccgaca ccttgccctca gtccaccgag ggctgggaca acctcaccgt gctgtcgatc	900
gcgccgctgt tggcacgtac gattcatgag atcttcgaaa atggttcggt aaccaccctc	960
ttcgagtccg cgtagaaaaa tctgagagat ttttctacag gataagacca aataggaccg	1020

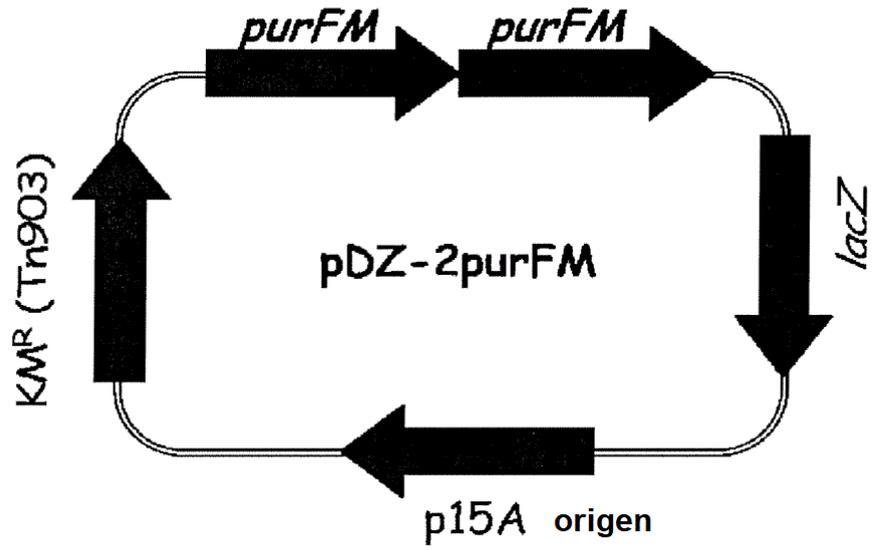
REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo *Corynebacterium ammoniagenes* transformado que produce ácido 5'-inosínico y depositado en el "Korean Culture Center of Microorganisms" el 19 de febrero de 2009 bajo el número de acceso de depósito KCCM 10992P.
- 5 2. Un procedimiento de producción de ácido 5'-inosínico que comprende cultivar el microorganismo *Corynebacterium ammoniagenes* según la reivindicación 1, y recuperar el ácido 5'-inosínico del medio de cultivo.

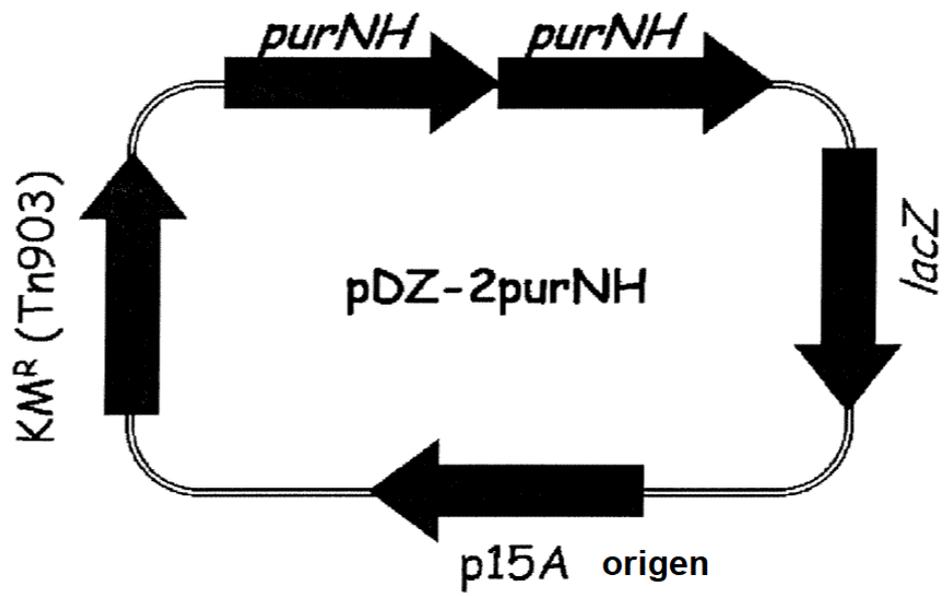
[FIG. 1]



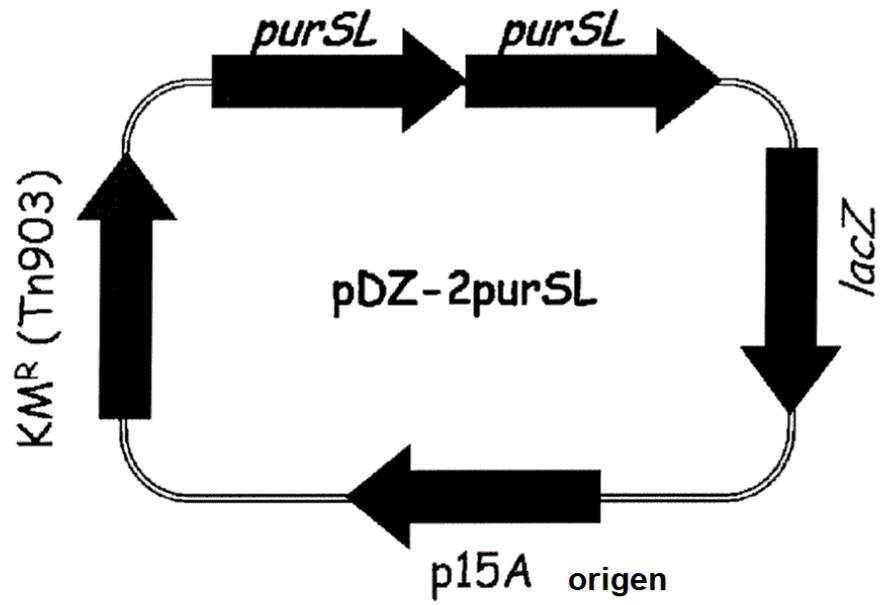
[FIG. 2]



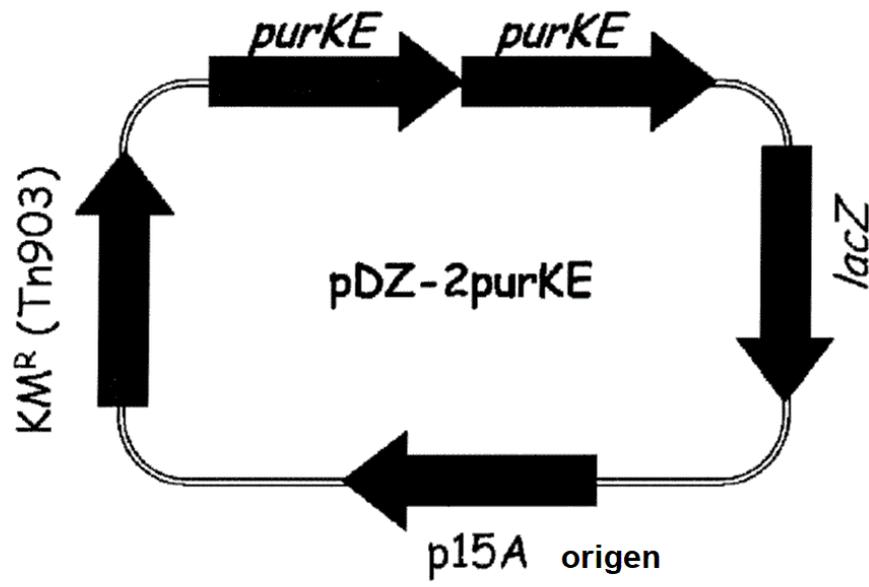
[FIG. 3]



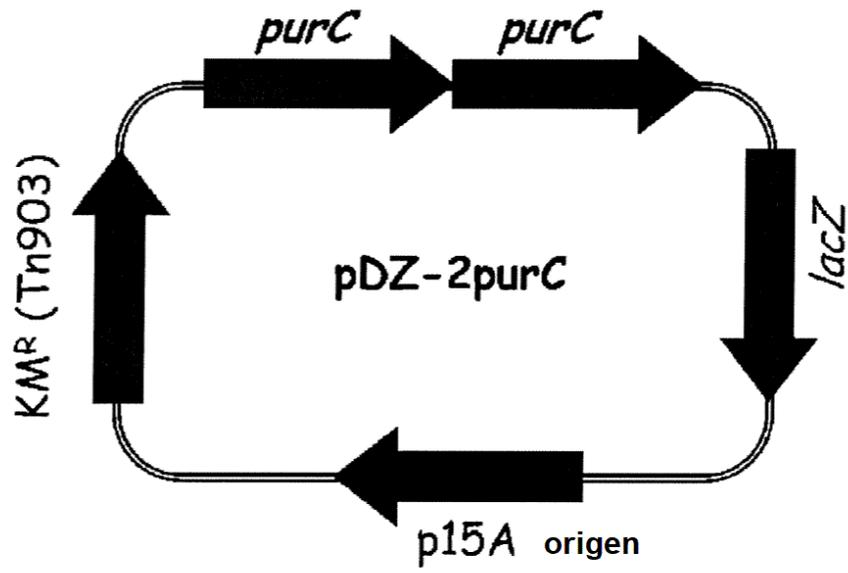
[FIG. 4]



[FIG. 5]



[FIG. 6]



[FIG. 7]

