



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 324 899**

51 Int. Cl.:
C12P 19/32 (2006.01)
C12R 1/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01272379 .7**
96 Fecha de presentación : **26.12.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1346026**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2003**

54 Título: **Microorganismo productor de ácido 5'-inosínico y proceso para producir ácido 5'-inosínico usando el mismo.**

30 Prioridad: **26.12.2000 KR 10-2000-0081471**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.08.2009

73 Titular/es: **CJ Cheiljedang Corporation**
500, Namdaemunro 5-ga, Jung-gu
Seoul 100-749, KR

72 Inventor/es: **Kim, Hyun-Soo;**
Chung, Sung-Oh;
Lee, Jin-Ho;
Kang, Sung-Goo;
Kim, Jeong-Hwan;
Hwang, Soo-Youn;
Lee, Byung-Chon y
Lee, Jae-Chul

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 324 899 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismo productor de ácido 5'-inosínico y proceso para producir ácido 5'-inosínico usando el mismo.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo microorganismo que produce ácido 5'-inosínico y a un proceso para producir ácido 5'-inosínico usando el mismo.

10 **Técnica antecedente**

El ácido 5'-inosínico es un material intermedio del sistema metabólico de la biosíntesis de ácidos nucleicos que se usa en una diversidad de campos, como alimentos y medicinas, y en diversas clases de áreas médicas, y tiene un significado fisiológicamente importante en animales y plantas y, en particular, es uno de los condimentos de tipo ácido nucleico que se destacan como condimentos saborizantes que tienen un efecto sinérgico cuando se usan con glutamato sódico.

Se han conocido en este campo los procesos para producir ácido 5'-inosínico mediante una fermentación directa y la clave importante en los aspectos económicos era producir ácido 5'-inosínico en una alta concentración y rendimiento.

Tomita K *et al.* (1991, Agricultural and Biological Chemistry 55 (9): 2221-2225) describe el efecto de L-prolina sobre la producción de ácido 5'-inosínico a partir de una cepa mutante de *Corynebacterium ammoniagenesis*, KY10895.

El documento EP-A-0 816 491 describe una proteína que tiene actividad inosina-guanosina quinasa. El documento D2 describe adicionalmente un método para producir ácido 5'-inosínico o ácido 5'-guanílico empleando un microorganismo capaz de reproducir ATP y transformado con un gen que codifica la inosina-guanosina quinasa.

El documento JP-A-2 312 595 describe cepas mutantes de *Corynebacterium ammoniagenes* y su uso en la producción de ácido 5'-inosínico.

Descripción de la invención

Los presentes inventores realizaron estudios exhaustivos para desarrollar una nueva cepa capaz de lograr los propósitos mencionados anteriormente y, como resultado, descubrieron un nuevo microorganismo que producía ácido 5'-inosínico mediante una fermentación directa en una alta concentración y rendimiento.

La presente invención proporciona un *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP009 (KCCM-10226) caracterizado por que acumula ácido 5'-inosínico en una alta concentración y rendimiento mediante una fermentación directa y por que tiene resistencia a análogos de L-glutamina seleccionados de azaserina o 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) y resistencia a análogos de L-prolina seleccionados de 3,4-deshidroprolina, ácido L-azetidín-2-carboxílico, ácido L-tiazolidín-4-carboxílico, ácido (S)-2,2-dimetil-4-oxazolidocarboxílico, ácido (S)-5,5-dimetil-4-tiazolidocarboxílico, ácido (4S,2RS)-2-etil-4-tiazolin-carboxílico, ácido (2S,4S)-4-hidroxi-2-pirrolin-carboxílico, ácido 2-piperidincarboxílico o 2,5-pirrolidindiona.

La presente invención también proporciona un proceso para producir ácido 5'-inosínico caracterizado por el cultivo de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP009 (KCCM-10226) seguido de recogida de las sustancias cultivadas.

De acuerdo con la presente invención, un microorganismo, un mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC-6872), requiere adenina pero no requiere xantina o guanina, aunque se facilita el crecimiento por adición de los mismos, en comparación con un mutante parcial de adenina convencional que produce ácido 5'-inosínico [Agr. Bio. Chem., Vol 47 (5), págs. 1035~1041, 1983, (KY13102, KY13171, KY13184, etc.)], o el microorganismo que requiere simultáneamente adenina y xantina o guanina.

Además, el microorganismo de la presente invención carece de ureasa para asimilar urea y tiene una alta sensibilidad a lisozima, una enzima de degradación de la pared celular, considerándose que su capacidad de síntesis de pared celular está parcialmente perdida, de modo que se secretan fácilmente fuera de la célula grandes cantidades de ácido 5'-inosínico producido intracelularmente.

Balabushevich, M. I. y Kazarinova, L. A., *et al* (Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 19 (5), 590~598, 1983), Rusia, han descubierto que la adición de estreptomina y kanamicina al medio mejora la permeabilidad y contribuye a la acumulación de ácido 5'-inosínico en el medio. Considerando esto, se contempló que se habría descubierto un mutante capaz de producir ácido 5'-inosínico en una alta concentración y rendimiento por introducción de la resistencia a estreptomina en una cepa conocida para aumentar la permeabilidad de membrana del microorganismo. Después, se contempló que podía evitarse la contaminación que se produce con frecuencia en la fermentación usando el mutante anterior y añadiendo la estreptomina al medio. Por lo tanto, los presentes inventores obtuvieron una cepa que tiene resistencia a una alta concentración de estreptomina y estudiaron las propiedades de la cepa. En la práctica, se identificó que la

introducción de la resistencia a estreptomycin en una alta concentración en la cepa evita eficazmente la contaminación que se produce durante la fermentación.

En la mayoría de las bacterias se acumulan ión calcio y solutos orgánicos, es decir, osmolitos, mediante el método de mejora de la presión osmótica intracelular de bacterias para evitar la deshidratación osmótica bajo presión osmótica extracelular de bacterias. Como dichos osmolitos, se han conocido L-prolina, L-glutamato, azúcar, derivados de aminoácidos N-metilados, etc. Entre ellos, se ha sabido que la L-prolina es un factor importante de osmorregulación y se ha descrito que en *Brevibacterium typhimurium* [Agr. Bio. Chem., Vol 53 (9), págs. 2475-2479, 1989] se acumulaba intracelularmente L-prolina al aumentar la actividad de la pirrolin-5-carboxilato reductasa, que es la enzima importante de la ruta de biosíntesis de la prolina, en la condición osmótica de ácido 5'-inosínico extracelular aumentado. Aparte, se describió [J. Bacteriol., Vol 163, pág. 296, 1985] que se acumulaba intracelularmente L-prolina en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, etc. y se regulaba por la presión osmótica extracelular.

Por consiguiente, se contempla que para un microorganismo capaz de producir ácido 5'-inosínico en una alta concentración y rendimiento, es importante prevenir la inhibición del crecimiento y de procesos metabólicos bioquímicos por aumento de la síntesis intracelular de L-prolina, y que es importante reforzar las características de resistencia a presión osmótica aumentando la capacidad sintética de L-prolina.

Además, para producir ácido 5'-inosínico a partir de 5-fosforribosil- α -1 -pirofosfato (PRPP), es decir, un material precursor de ácidos nucleicos de tipo purina, son necesarias 2 moléculas de glutamina. La glutamina sintetasa, que es la enzima que produce glutamina a partir de glutamato sódico, está muy minuciosamente regulada por aminoácidos tales como glicina, alanina, histidina, etc., y CTP, AMP, etc. [Reitzer LJ y Magasanik B, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 1987, págs. 362~320]. Por lo tanto, es necesario un suministro armonioso de la glutamina para la síntesis de ácido 5'-inosínico. Además, la glutamina producida se usa ampliamente como precursor de diversas reacciones. En la síntesis de ácido 5'-inosínico, dos enzimas que son la PRPP amidotransferasa y la 5-fosforribosil-N-formilglicinamida (FGAR) amidotransferasa, emplean glutamina como sustrato [Neuhard J y Nygaard P, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, 1987, págs. 445~473]. Por lo tanto, para lograr más eficazmente la síntesis de ácido 5'-inosínico, se considera que la síntesis armoniosa de la glutamina es importante para aumentar la afinidad de la PRPP amidotransferasa y de la FGAR amidotransferasa, relacionadas con la síntesis de ácido 5'-inosínico, con la glutamina más que con otras enzimas entre diversas reacciones que requieren glutamina.

Por consiguiente, los presentes inventores ensayaron cómo afectarían diversos aminoácidos a la síntesis del ácido 5'-inosínico mediante una fermentación directa. Como resultado, cuando se añadió L-glutamina al medio de ácido 5'-inosínico, los inventores identificaron que la concentración de fermentación de ácido 5'-inosínico se aumentaba y que el suministro apropiado de L-glutamina a la presente cepa es una etapa limitante de velocidad en la síntesis del ácido 5'-inosínico.

Los inventores identificaron que los microorganismos a los que se introducía resistencia a análogos de L-glutamina, tales como azaserina o 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) y resistencia a diversos análogos de L-prolina, tales como 3,4-deshidroprolina, ácido L-azetidín-2-carboxílico, ácido L-tiazolidín-4-carboxílico, ácido (S)-2,2-dimetil-4-oxazolidocarboxílico, ácido (S)-5,5-dimetil-4-tiazolidocarboxílico, ácido (4S,2RS)-2-etil-4-tiazolin-carboxílico, ácido (2S,4S)-4-hidroxi-2-pirrolin-2-carboxílico, ácido 2-piperidincarboxílico o 2,5-pirrolidindiona pueden producir ácido 5'-inosínico mediante un método de fermentación directa en una concentración y rendimiento superiores a los de cepas conocidas. La presente invención se basa en dicho descubrimiento.

A continuación en este documento, la presente invención se explicará más específicamente.

En primer lugar, el microorganismo de la presente invención, un mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* (ATCC-6872), requiere adenina pero no requiere xantina o guanina, aunque se facilita el crecimiento por adición de los mismos, y el microorganismo carece de ureasa para asimilar urea y tiene una alta sensibilidad a lisozima, una enzima de degradación de la pared celular, considerándose que su capacidad de síntesis de pared celular está parcialmente perdida, de modo que se secretan fácilmente fuera de la célula grandes cantidades de ácido 5'-inosínico producido intracelularmente, y tiene resistencia a estreptomycin para corresponder eficazmente a una contaminación que se produzca durante la fermentación.

Una alta concentración de glucosa, otras fuentes de carbono añadidas durante el periodo de cultivo y el ácido 5'-inosínico acumulado durante el último periodo de cultivo conducen a un aumento en la presión osmótica extracelular de microorganismos productores de ácido 5'-inosínico, inhibiendo de este modo sus actividades fisiológicas normales y su crecimiento celular. Por lo tanto, es deseable mejorar la resistencia osmótica para evitar la reducción de la producción de ácido 5'-inosínico.

Para aumentar la concentración intracelular de prolina, que desempeña un papel importante en la osmorregulación a una alta acumulación de solutos en el entorno extracelular, el microorganismo de la presente invención tiene resistencia a análogos de L-prolina, tales como 3,4-deshidroprolina, ácido L-azetidín-2-carboxílico, ácido L-tiazolidín-4-carboxílico, ácido (S)-2,2-dimetil-4-oxazolidocarboxílico, ácido (S)-5,5-dimetil-4-tiazolidocarboxílico, ácido (4S,2RS)-2-etil-4-tiazolino-carboxílico, ácido (2S,4S)-4-hidroxi-2-pirrolin-carboxílico, ácido 2-piperidincarboxílico o 2,5-pirrolidindiona, excluyendo por lo tanto más eficazmente el efecto de la presión osmótica.

ES 2 324 899 T3

Además, el microorganismo de la presente invención tiene resistencia a análogos de L-glutamina, tales como azaserina o 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), esencialmente necesarios en el sistema de síntesis de tipo purina logrando el suministro armonioso de glutamina para la síntesis de ácido 5'-inosínico, dando como resultado una acumulación directa de ácido 5'-inosínico en un alto rendimiento y concentración.

El mutante de la presente invención obtuvo una colonia del microorganismo (CJ112), que requiere adenina pero no requiere xantina ni guanina, aunque se facilita su crecimiento por adición de los mismos, y que carece de ureasa para asimilar urea, como una cepa parenteral, tratándose con rayos X, rayos ultravioleta y un mutágeno orgánico químico tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), sulfato de dietilo, etilamina, etc., y suspendiéndose y extendiéndose convenientemente en un medio mínimo (Medio 2) que contiene agar al 1,7% y cada concentración de variantes. Después, cada colonia se cultivó en un medio de nutrición (Medio 1) y después se cultivó en un medio de siembra (Medio 3) durante 24 horas, y después se cultivó en un medio de fermentación (Medio 4) durante 5-6 días para seleccionar de este modo un microorganismo que pueda producir ácido 5'-inosínico acumulado en el medio de cultivo en las mayores cantidades, etapa por etapa. Después, los presentes inventores seleccionaron una cepa que puede producir ácido 5'-inosínico acumulado en el medio de cultivo a las mayores cantidades entre los microorganismos en la etapa final. La cepa anterior se denominó CJIP009. Se depositó el *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP009 bajo el Tratado de Budapest en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos, cuya dirección es Hongje-dong, Seodaemun-gu, Seúl, el 20 de noviembre de 2000 con el N° de Acceso KCCM-10226.

En concreto, la presente invención proporciona un proceso para producir ácido 5'-inosínico caracterizado por que un mutante de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP009 (KCCM-10226) de acuerdo con la reivindicación 1 se cultiva en un medio de siembra a 30°C durante 24 horas, se cultiva y se activa en un medio de siembra fermentador a 28-34°C, 900 rpm y pH 7,2 durante 1-2 días, se cultiva en un medio principal fermentador a 30°C, 900 rpm y pH 7,2 durante 5-6 días y después, cuando el azúcar reductor es del 2% en la solución de cultivo, el primer, segundo, tercer y cuarto azúcares adicionales se mezclan con fructosa, glucosa y melazas y los azúcares finales respectivos se añaden y se cultivan para que sean el 32%.

Los medios de cultivo empleados en la presente invención tienen las siguientes composiciones:

Medio 1

Medio de nutrición

Peptona al 1%, extracto de ternera al 1%, cloruro sódico (NaCl) al 0,25%, extracto de levadura al 1%, agar al 2%, pH 7,2.

Medio 2

Medio mínimo

Glucosa al 2,0%, sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 0,3%, dihidrogenofosfato potásico (KH₂PO₄) al 0,1%, monohidrogenofosfato potásico (K₂HPO₄) al 0,3%, sulfato de magnesio (MgSO₄·7H₂O) al 0,3%, cloruro de calcio (CaCl₂) 10 mg/l, sulfato férrico (FeSO₄·7H₂O) 10 mg/l, sulfato de cinc (ZnSO₄·7H₂O) 1,0 mg/l, cloruro de manganeso (MnCl₂·H₂O) 3,6 mg/l, L-cisteína 20 mg/l, pantotenato de calcio 10 mg/l, tiamina HCl 5,0 mg/l, biotina 30 µg/l, adenina 20 mg/l, guanina 20 mg/l, pH 7,3.

Medio 3

Medio de siembra

Glucosa al 5%, peptona al 0,5%, extracto de ternera al 0,5%, extracto de levadura al 1%, cloruro sódico (NaCl) al 0,25%, adenina 100 mg/l, guanina 100 mg/l, pH 7,2.

Medio 4

Medio de fermentación en matraz

Glutamato sódico al 0,1%, cloruro de amonio (NH₄Cl) al 1,0%, sulfato de magnesio (MgSO₄·7H₂O) al 1,2%, cloruro de calcio (CaCl₂) al 0,01%, sulfato férrico (FeSO₄·7H₂O) 20 mg/l, sulfato de manganeso (MnSO₄·H₂O) 20 mg/l, sulfato de cinc (ZnSO₄·7H₂O) 20 mg/l, sulfato cúprico (CuSO₄·7H₂O) 5,0 mg/l, L-cisteína 23 mg/l, alanina 24 mg/l, ácido nicotínico 8,0 mg/l, biotina 45 µg/l, tiamina-HCl 5,0 mg/l, adenina 30 mg/l, ácido fosfórico (H₃PO₄) (85%) al 1,9%, la mezcla de fructosa, glucosa y melazas al 8% como azúcar reductor (pH 7,2).

ES 2 324 899 T3

Medio 5

Medio de siembra fermentador

5 Glucosa al 5,4%, peptona al 1,0%, extracto de levadura al 2,0%, dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4) al 0,1%, monohidrogenofosfato potásico (K_2HPO_4) al 0,1%, sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 0,1%, sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) al 0,5%, sulfato férrico ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 80 mg/l, sulfato de cinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 40 mg/l, sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 40 mg/l, L-cisteína 80 mg/l, pantotenato de calcio 60 mg/l, tiamina-HCl 20 mg/l, biotina 240 $\mu\text{g/l}$, adenina 1200 mg/l, guanina 1200 mg/l (pH 7,2).

10

Medio 6

Medio principal fermentador

15

Cloruro de calcio (CaCl_2) 120 mg/l, sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8,0 mg/l, sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 1,5%, sulfato férrico ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 24 mg/l, sulfato de cinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 24 mg/l, sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 24 mg/l, L-cisteína 26,4 mg/l, glutamato sódico al 0,12%, tiamina-HCl 6,0 mg/l, biotina 40 $\mu\text{g/l}$, ácido nicotínico 50 mg/l, alanina 145 mg/l, adenina 200 mg/l, ácido fosfórico (H_3PO_4) (85%) al 4,3%, la mezcla de fructosa, glucosa y melazas al 32% como azúcar reductor (pH 7,2).

20

Las propiedades bioquímicas de variantes representativas de un nuevo mutante CJIP009 de acuerdo con la presente invención se muestran en la siguiente Tabla 1. (Esta invención no se limita a las siguientes propiedades).

25

TABLA 1

30

Propiedad	ATCC6872	CJIP009 (KCCM-10226)
Adenina	No requiere	Requiere
Guanina (xantina)	No requiere	Parcial
Sensibilidad de lisozima (concentración mínima de inhibición del crecimiento)	80 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$
Resistencia a 3,4-deshidroprolina	1.000 $\mu\text{g/ml}$	3.500 $\mu\text{g/ml}$
Estreptomicina	500 $\mu\text{g/ml}$	2.000 $\mu\text{g/ml}$
Ácido L-azetidin-2-carboxílico	5 mg/ml	30 mg/ml
Ácido L-tiazolidin-4-carboxílico	10 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
Azaserina	25 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$

50

El proceso de cultivo de ácido 5'-inosínico usado en la invención era el siguiente.

Los microorganismos, que pertenecen al género *Corynebacterium* y capaces de producir ácido 5'-inosínico, se cultivaron en el medio convencional que contiene fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, aminoácidos, vitaminas, etc., en condiciones aerobias con temperatura, pH, etc. regulados.

55

Se usarían como fuente de carbono glucosa, fructosa, melazas pretratadas esterilizadas (melazas revertidas a azúcar reductor) y similares. Entre las fuentes de nitrógeno inorgánico tales como amoniaco, cloruro de amonio, sulfato de amonio y fuentes de nitrógeno orgánico tales como, peptona, NZ-amina, extracto de carne, extracto de levadura, solución de digestión del maíz, hidrolizado de caseína, pescados o productos de degradación de los mismos, torta de soja desgrasada o productos de degradación de la misma y similares, cada una se usaría como una fuente de nitrógeno orgánico. Se usarían dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4), monohidrogenofosfato potásico (K_2HPO_4), sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), sulfato férrico ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), carbonato de calcio (CaCO_3), etc., como los compuestos inorgánicos. Si es necesario, se añadirían vitaminas y bases, etc. El cultivo se realiza, por ejemplo, al tiempo que se agita o se airea y se agita en condiciones aerobias, preferiblemente a 20~40°C durante 5-6 días. El pH del medio permanece preferiblemente alrededor de la neutralidad. El ácido 5'-inosínico acumulado mediante una fermentación directa se analiza mediante el método convencional.

65

Mejor modo de realizar la invención

Esta invención se entenderá mejor a partir de los siguientes ejemplos. Sin embargo, un especialista en la técnica apreciará fácilmente que los materiales específicos y los resultados descritos a continuación son simplemente ilustrativos de, y que no pretenden ni deberían pretender limitar la invención que se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen a partir de entonces.

Ejemplo 1

Selección de microorganismo sensible a lisozima (LY002)

El mutante del Ejemplo 1 se preparó a partir del microorganismo (CJ112) de *Brevibacterium ammoniagenes* (ATCC-6872), que requiere adenina, pero no requiere xantina o guanina, aunque se facilita el crecimiento por adición de los mismos, y que carece de ureasa para similar urea, como la cepa parental. La cepa se suspendió a $10^7 \sim 10^8$ células/ml en el tampón fosfato (pH 7,0) o tampón citrato (pH 5,5) y se indujo mutación por adición de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) a la concentración final de 10-50 $\mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente o 32°C durante 20-40 minutos, y se lavó dos veces con solución salina al 0,85%. Se obtuvieron colonias que estaban convenientemente suspendidas y extendidas en un medio mínimo (Medio 2) que contenía agar al 1,7%. Después, cada colonia se cogió con un palillo en el medio mínimo (Medio 2) que contenía agar al 1,7% y en el medio mínimo (Medio 2) que contenía agar al 1,7% y 40 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima. En primer lugar, se seleccionó el microorganismo que crecía en el medio mínimo que contenía agar al 1,7% y no en el medio mínimo que contenía 40 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima. El microorganismo iba a ser una cepa parental e iba a inducirse continuamente la mutación anterior. En segundo lugar, se seleccionó el microorganismo sensible que no crecía en el medio mínimo que contenía 16 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima. Por último, de acuerdo con el método anterior, se seleccionó el microorganismo altamente sensible que no crecía en el medio mínimo que contenía 8 $\mu\text{g/ml}$ de lisozima. La colonia del microorganismo altamente sensible se cultivó en un medio de nutrición (Medio 1), después se cultivó durante 24 horas en un medio de siembra (Medio 3), y se cultivó durante 3-4 días en un medio de cultivo (Medio 4) para seleccionar de este modo LY002, que puede producir ácido 5'-inosínico acumulado en el medio de cultivo a las mayores cantidades. La concentración de lisozima a la que el microorganismo demuestra sensibilidad se enumera en la siguiente Tabla 2.

TABLA 2

	CJ112	LY002
Concentración de lisozima	80 $\mu\text{g/ml}$	8 $\mu\text{g/ml}$

Ejemplo 2

Selección de una cepa resistente a estreptomicina (CISM10)

En un mutante del ejemplo 2, se usó LY002 del Ejemplo 1 como cepa parental. La cepa se suspendió a $10^7 \sim 10^8$ células/ml en el tampón fosfato (pH 7,0) o tampón citrato (pH 5,5) y se indujo mutación por adición de NTG a la concentración final de 10-50 $\mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente o 32°C durante 20-40 minutos, y se lavó dos veces con solución salina al 0,85%. Se obtuvieron colonias que estaban convenientemente suspendidas y extendidas en 3 medios mínimos (Medio 2), conteniendo cada uno de ellos agar al 1,7% y 1.000 $\mu\text{g/ml}$, 1.500 $\mu\text{g/ml}$ o 2.000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, respectivamente. Después, cada colonia se cultivó en el medio de nutrición (Medio 1), después se cultivó durante 24 horas en un medio de siembra (Medio 3), y se cultivó durante 3-4 días en un medio de cultivo (Medio 4) para seleccionar de este modo CISM10, que puede producir ácido 5'-inosínico acumulado en el medio de cultivo a las mayores cantidades. La concentración de estreptomicina a la que el microorganismo demuestra resistencia se enumera en la siguiente Tabla 3.

TABLA 3

	LY002	CISM10
Concentración de estreptomicina	500 $\mu\text{g/ml}$	2.000 $\mu\text{g/ml}$

ES 2 324 899 T3

Ejemplo 3

Selección de una cepa resistente a 3,4-deshidroprolina (CS101)

5 En un mutante del Ejemplo 3, se usó CISM10 del Ejemplo 2 como cepa parental. La cepa se suspendió a $10^7 \sim 10^8$ células/ml en el tampón fosfato (pH 7,0) o tampón citrato (pH 5,5) y se indujo mutación por adición de NTG a la concentración final de 10-50 $\mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente o 32°C durante 20-40 minutos, y se lavó dos veces con solución salina al 0,85%. Se obtuvieron colonias suspendiendo y extendiendo convenientemente en 3 medios mínimos (Medio 2), conteniendo cada uno agar al 1,7% y 1.500 $\mu\text{g/ml}$, 2.500 $\mu\text{g/ml}$ o 3.500 $\mu\text{g/ml}$ de 3,4-deshidroprolina, respectivamente. Después, cada colonia se cultivó en el medio de nutrición (Medio 1), después se cultivó durante 24 horas en un medio de siembra (Medio 3) y se cultivó durante 3-4 días en un medio de cultivo (Medio 4) para seleccionar de este modo CIS104, que puede producir ácido 5'-inosínico acumulado en el medio de cultivo a las mayores cantidades. La concentración de 3,4-deshidroprolina a la que el microorganismo demuestra resistencia se enumera en la siguiente Tabla 4.

TABLA 4

	CISM10	CS101
Concentración de 3,4-deshidroprolina	1.000 $\mu\text{g/ml}$	3.500 $\mu\text{g/ml}$

Ejemplo 4

Selección de una cepa resistente a ácido L-azetidin-2-carboxílico (CIAC 12)

10 En un mutante del Ejemplo 4, el CS101 del Ejemplo 3 iba a ser una cepa parental. La cepa se suspendió a $10^7 \sim 10^8$ células/ml en el tampón fosfato (pH 7,0) o tampón citrato (pH 5,5) y se indujo mutación por adición de NTG a la concentración final de 10-50 $\mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente o 32°C durante 20-40 minutos y se lavó dos veces con solución salina al 0,85%. Se obtuvieron colonias que estaban convenientemente suspendidas y extendidas en 3 medios mínimos (Medio 2), conteniendo cada uno de ellos agar al 1,7% y 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ o 30 $\mu\text{g/ml}$ de ácido L-azetidin-2-carboxílico, respectivamente. Después, cada colonia se cultivó en el medio de nutrición (Medio 1), después se cultivó durante 24 horas en un medio de siembra (Medio 3) y se cultivó durante 3-4 días en un medio de cultivo (Medio 4), para seleccionar de este modo CIAC12, que puede producir ácido 5'-inosínico acumulado en el medio de cultivo a las mayores cantidades. La concentración de ácido L-azetidin-2-carboxílico a la que el microorganismo muestra resistencia se enumeró en la siguiente Tabla 5.

TABLA 5

Propiedad	CISM10	CIAC12
Concentración de ácido L-azetidin-2-carboxílico	5 mg/ml	30 mg/ml

Ejemplo 5

Selección de una cepa resistente a ácido L-tiazolidin-4-carboxílico (CITP13)

15 En un mutante del Ejemplo 5, el CIAC12 del Ejemplo 4 iba a ser una cepa parental. La cepa se suspendió a $10^7 \sim 10^8$ células/ml en el tampón fosfato (pH 7,0) o tampón citrato (pH 5,5) y se indujo mutación por adición de NTG a la concentración final de 10-50 $\mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente o 32°C durante 20-40 minutos y se lavó dos veces con solución salina al 0,85%. Se obtuvieron colonias que estaban convenientemente suspendidas y extendidas en 3 medios mínimos (Medio 2), conteniendo cada uno de ellos agar al 1,7% y 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ o 100 $\mu\text{g/ml}$ de ácido L-tiazolidin-4-carboxílico, respectivamente. Después, cada colonia se cultivó en el medio de nutrición (Medio 1), después se cultivó durante 24 horas en un medio de siembra (Medio 3) y se cultivó durante 3-4 días en un medio de cultivo (Medio 4), para seleccionar de este modo CITP13, que puede producir ácido 5'-inosínico acumulado en el medio de cultivo a las mayores cantidades. La concentración de ácido L-tiazolidin-4-carboxílico a la que el microorganismo muestra resistencia se enumeró en la siguiente Tabla 6.

TABLA 6

	CIAC12	CITP13
Concentración de ácido L-tiazolidin-4-carboxílico	10 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$

ES 2 324 899 T3

Ejemplo 6

Selección de una cepa resistente a azaserina CJIP009 (KCCM-10226)

5 En un mutante del Ejemplo 6, CIP13 del Ejemplo 5 iba a ser una cepa parental. La cepa se suspendió a 10^7 - 10^8 células/ml en el tampón fosfato (pH 7,0) o tampón citrato (pH 5,5) y se indujo mutación por adición de NTG a la concentración final de 10-50 $\mu\text{g/ml}$ a temperatura ambiente o 32°C durante 20-40 minutos y se lavó dos veces con solución salina al 0,85%. Se obtuvieron colonias que estaban convenientemente suspendidas y extendidas en 3 medios mínimos (Medio 2), conteniendo cada uno de ellos agar al 1,7% y 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$ o 100 $\mu\text{g/ml}$ de azaserina, respectivamente. Después, cada colonia se cultivó en el medio de nutrición (Medio 1), después se cultivó durante 24 horas en un medio de siembra (Medio 3) y se cultivó durante 3-4 días en un medio de cultivo (Medio 4) para seleccionar de este modo CJIP009 (KCCM-10226), que puede producir ácido 5'-inosínico acumulado en el medio de cultivo a las mayores cantidades. La concentración de azaserina a la que el microorganismo muestra resistencia se enumeró en la siguiente Tabla 7.

TABLA 7

	CIP13	CJIP009(KCCM-10226)
Concentración de azaserina	25 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$

Ejemplo 7

Medición de la cantidad de acumulación de ácido 5'-inosínico en un matraz Erlenmeyer

Cepa

CJIP009 (KCCM-10226).

Medio de siembra

35 Glucosa al 5%, peptona al 0,5%, extracto de ternera al 0,5%, extracto de levadura al 1%, cloruro sódico (NaCl) al 0,25%, adenina 100 mg/l, guanina 100 mg/l, pH 7,2.

Medio de fermentación en matraz

40 Glutamato sódico al 0,1%, cloruro de amonio (NH_4Cl) al 1,0%, sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 1,2%, cloruro cálcico (CaCl_2) al 0,01%, sulfato férrico ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 20 mg/l, sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 20 mg/l, sulfato de cinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 20 mg/l, sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 5,0 mg/l, L-cisteína 23 mg/l, alanina 24 mg/l, ácido nicotínico 8,0 mg/l, biotina 45 $\mu\text{g/l}$, tiamina-HCl 5,0 mg/l, adenina 30 mg/l, ácido fosfórico (H_3PO_4) (85%) al 1,9%, la mezcla de fructosa, glucosa y melazas al 8% como azúcar reductor (pH 7,2).

Procedimiento de fermentación

50 Se introdujeron 3 ml del medio de siembra en un tubo de ensayo de 18 mm de diámetro y se esterilizaron a presión elevada por el método general. En el mismo se inoculó la cepa y se cultivó al tiempo que se agitaba a 30°C durante 24 horas para usarla como el medio de siembra. Se introdujeron 27 ml de medio de fermentación en 500 ml de matraz Erlenmeyer para agitación y se esterilizaron a presión elevada a 120°C durante 10 minutos. En el mismo se inocularon 3 ml de cultivo de siembra y se cultivaron durante 5-6 días. El matraz se agitó a 200 rpm a la temperatura de 30°C y un pH de 7,2. La cantidad acumulada de ácido 5'-inosínico era de 19,1 g/l.

Ejemplo 8

Medición de la cantidad de acumulación de ácido 5'-inosínico en 5 l de fermentador

Cepa

CJIP009 (KCCM-10226).

Medio de siembra

65 El mismo que en el Ejemplo 7.

ES 2 324 899 T3

Medio de siembra fermentador

Glucosa al 5,4%, peptona al 1,0%, extracto de levadura al 2,0%, dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4) al 0,1%, monohidrogenofosfato potásico (K_2HPO_4) al 0,1%, sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 0,1%, sulfato de amonio (NH_4)₂ SO_4) al 0,5%, sulfato férrico ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 80 mg/l, sulfato de cinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 40 mg/l, sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 40 mg/l, L-cisteína 80 mg/l, pantotenato de calcio 60 mg/l, tiamina-HCl 20 mg/l, biotina 240 $\mu\text{g/l}$, adenina 1200 mg/l, guanina 1200 mg/l (pH 7,2).

Medio principal fermentador

Cloruro de calcio (CaCl_2) 120 mg/l, sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8,0 mg/l, sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 1,5%, sulfato férrico ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 24 mg/l, sulfato de cinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 24 mg/l, sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 24 mg/l, L-cisteína 26,4 mg/l, glutamato sódico al 0,12%, tiamina-HCl 6,0 mg/l, biotina 40 $\mu\text{g/l}$, ácido nicotínico 50 mg/l, alanina 145 mg/l, adenina 200 mg/l, ácido fosfórico (H_3PO_4) (85%) al 4,3%, la mezcla de fructosa, glucosa y melazas al 32% como azúcar reductor (pH 7,2).

Procedimiento de fermentación

Se introdujeron 50 ml del medio de siembra en 500 ml de matraz Erlenmeyer para agitación y esterilizado a presión elevada por el método general. En el mismo se inoculó la cepa, y se cultivó mientras se agitaba a 30°C durante 24 horas para usarlo como el medio de siembra. Se añadieron 1000 ml del medio de siembra fermentador a 2,5 l de fermentador esterilizado a presión elevada a 120°C durante 15 minutos. En el mismo se inocularon 50 ml de cultivo de siembra y después se cultivaron durante 1-2 días. El matraz se agitó a 900 rpm a la temperatura de 28-34°C y pH de 7,2. Además, se añadieron 1.250 ml de medio principal fermentador a 5 l de fermentador esterilizado a presión elevada a 120°C durante 15 minutos. En el mismo se inocularon 250 ml de cultivo de siembra y después se cultivó durante 1-2 días. Cuando el azúcar reductor en el cultivo era del 2% durante el cultivo, se añadieron el 1°, 2°, 3° y 4° azúcares adicionales, es decir, la mezcla de fructosa, glucosa y melazas, de modo que cada azúcar del azúcar reductor final se volviera el 32%. Después, la mezcla se cultivó durante 5-6 días. El matraz se agitó a 900 rpm a la temperatura de 30°C y pH de 7,2. La cantidad acumulada de ácido 5'-inosínico en el medio era de 70,3 g/l.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, puede obtenerse ácido 5'-inosínico en una mayor concentración y rendimiento que en la técnica anterior. De acuerdo con la presente invención, puede obtenerse ácido 5'-inosínico más económicamente que en la técnica anterior.

REIVINDICACIONES

5 1. Un *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP009 que tiene el número de acceso KCCM-10226, **caracterizado** por que acumula ácido 5'-inosínico en una alta concentración y rendimiento mediante una fermentación directa y tiene resistencia a análogos de L-glutamina seleccionados de azaserina o 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON) y resistencia a análogos de L-prolina seleccionados de 3,4-deshidroprolina, ácido L-azetidín-2-carboxílico, ácido L-tiazolidín-4-carboxílico, ácido (S)2,2-dimetil-4-oxazolidocarboxílico, ácido (S)-5,5-dimetil-4-tiazolidocarboxílico, ácido (4S, 2RS)-2-etil-4-tiazolin-carboxílico, ácido (2S, 4S)-4-hidroxi-2-pirrolin-carboxílico, ácido 2-piperidincarboxílico o 2,5-pirrolidindiona.

10 2. El *Corynebacterium ammoniagenes* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el *Corynebacterium ammoniagenes* es un tipo mutante parcial de guanina o xantina o el microorganismo que requiere adenina.

15 3. El *Corynebacterium ammoniagenes* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que la concentración de inhibición de crecimiento mínima de lisozima, una enzima de degradación de la pared celular, es de 8 µg/ml.

20 4. El *Corynebacterium ammoniagenes* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que tiene una resistencia a estreptomycin para evitar la contaminación que se produce durante la fermentación.

25 5. Un proceso para producir ácido 5'-inosínico, **caracterizado** por el cultivo del *Corynebacterium ammoniagenes* de acuerdo con la reivindicación 1, seguido de la recogida de las sustancias cultivadas.

30 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado** por que el *Corynebacterium ammoniagenes* de acuerdo con la reivindicación 1, se cultiva en un medio de siembra a 30°C durante 24 horas, se cultiva y se activa en un miembro de siembra fermentador a 28-34°C, 900 rpm y pH 7,2 durante 1-2 días, se cultiva en un medio principal fermentador a 30°C, 900 rpm y pH 7,2 durante 5-6 días y después, cuando el azúcar reductor es del 2% en la solución de cultivo, el primer, segundo, tercer y cuarto azúcares adicionales se mezclan con fructosa, glucosa y melazas y los azúcares finales respectivos se añaden y se cultivan para que sean el 32%.

35

40

45

50

55

60

65