



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1014056-5 B1



(22) Data do Depósito: 23/03/2010

(45) Data de Concessão: 07/04/2020

(54) Título: MICRO-ORGANISMOS DE CORYNEBACTERIUM COM MAIOR PRODUTIVIDADE DE ÁCIDO 5'-INOSÍNICO E MÉTODO PARA PRODUZIR ÁCIDOS NUCLEICOS COM ELES.

(51) Int.Cl.: C12N 1/21; C12N 15/52; C12P 19/26.

(30) Prioridade Unionista: 01/04/2011 KR 10-2009-0028145.

(73) Titular(es): CJ CHEILJEDANG CORPORATION.

(72) Inventor(es): JEONG HWAN KIM; TAE MIN AHN; SOO YOUN HWANG; MIN JI BAEK; NA RA KWON; NAN YOUNG YOON; JU JEONG KIM; JUNG GUN KWON.

(86) Pedido PCT: PCT KR2010001760 de 23/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/114245 de 07/10/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 30/09/2011

(57) Resumo: MICRO-ORGANISMOS DE CORYNEBACTERIUM COM MAIOR PRODUTIVIDADE DE ÁCIDO 5'-INOSÍNICO E MÉTODO PARA PRODUZIR ÁCIDOS NUCLEICOS COM ELES A presente invenção refere-se a um micro-organismo pertencente ao gênero *Corynebacterium* que produz ácido 5'-inosínico cuja expressão de genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese da purina é aumentada além da expressão intrínseca. Além disso, a presente invenção também se refere a um método para produzir ácido 5'-inosínico que compreende cultivar o microorganismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “**MICRO-ORGANISMOS DE CORYNEBACTERIUM COM MAIOR PRODUTIVIDADE DE ÁCIDO 5'-INOSÍNICO E MÉTODO PARA PRODUZIR ÁCIDOS NUCLEICOS COM ELES**”.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

1. – Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um micro-organismo pertencente ao gênero *Corynebacterium* que produz ácido 5'-inosínico cuja expressão de genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese da purina é aumentada além da expressão intrínseca. Além disso, a presente invenção também se refere a um método para produzir ácido 5'-inosínico que compreende cultivar o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico.

2. – Descrição do Estado da Técnica

Um dos compostos nucleotídeos, o ácido 5'-inosínico é um material intermediário do sistema metabólico da biossíntese dos nucleotídeos que é usado em vários campos, como em alimentos, remédios e em várias outras áreas e funções médicas para exercer um importante papel na fisiologia de animais e plantas. Em especial, o ácido 5'-inosínico é um condimento de nucleotídeos que chamou muita atenção por ser um condimento saboroso, pois apresenta efeitos sinérgicos quando utilizado com o glutamato de monossódio (MSG).

Até hoje, os processos conhecidos para produzir ácido 5'-inosínico incluem um processo para decompor enzimaticamente o ácido ribonucleico extraído de células de levedura (pedido de patente japonês examinado e publicado nº 1614/1957 etc.), um processo para fosforilar quimicamente a inosina produzida por fermentação (Agric. Biol. Chem., 36, 1.511(1972) etc.) e um processo para cultivar um micro-organismo capaz de produzir ácido 5'-inosínico e recuperar o monofosfato de inosina (IMP) acumulado no meio. Hoje em dia, os processos para produzir ácido 5'-inosínico utilizando micro-organismos são os mais usados. As linhagens do gênero *Corynebacterium* são amplamente utilizadas como um micro-organismo para a produção de ácido 5'-inosínico e, por exemplo, um método para produzir ácido 5'-inosínico cultivando-se o *Corynebacterium ammoniagenes* é revelado (publicação de patente coreana nº 2003-0042972).

A fim de aumentar a produção de ácido 5'-inosínico por um micro-organismo, realizaram-se estudos para desenvolver linhagens aumentando-se ou diminuindo-se a atividade ou a expressão das enzimas envolvidas na via biossintética ou degradativa do ácido 5'-inosínico. A patente coreana nº 785248 revela

um micro-organismo em que um gene *purC* que codifica a fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintetase é superexpresso na via biossintética da purina e um método para produzir ácido 5'-inosínico com ele. Além disso, a patente coreana nº 857379 revela uma linhagem de *Corynebacterium ammoniagenes* em que a fosforibosilaminoimidazol carboxilase codificada com *purKE* é superexpressa e um método para produzir altas concentrações de IMP com alto rendimento com ela.

No entanto, ainda há a necessidade de se desenvolver uma linhagem capaz de produzir ácido 5'-inosínico com alto rendimento e um método para produzir ácido 5'-inosínico com ela.

Sendo assim, os presentes inventores conduziram estudos para desenvolver uma linhagem capaz de produzir ácido 5'-inosínico com alta produtividade. Como resultado, eles descobriram que a produtividade do ácido 5'-inosínico pode ser ampliada aumentando-se, ao mesmo tempo, as atividades das principais enzimas envolvidas na via de biossíntese da purina além da atividade intrínseca, levando assim à presente invenção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um objetivo da presente invenção é o de propor um micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico.

Outro objetivo da presente invenção é o de propor um método para produzir ácido 5'-inosínico utilizando o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 ilustra um vetor pDZ para a introdução cromossômica no micro-organismo do gênero *Corynebacterium*;

a figura 2 ilustra um vetor pDZ-2purFM para a introdução cromossômica no micro-organismo do gênero *Corynebacterium*;

a figura 3 ilustra um vetor pDZ-2purNH para a introdução cromossômica no micro-organismo do gênero *Corynebacterium*;

a figura 4 ilustra um vetor pDZ-2purSL para a introdução cromossômica no micro-organismo do gênero *Corynebacterium*;

a figura 5 ilustra um vetor pDZ-2purKE para a introdução cromossômica no micro-organismo do gênero *Corynebacterium*;

a figura 6 ilustra um vetor pDZ-2purC para a introdução cromossômica no micro-organismo do gênero *Corynebacterium*; e

a figura 7 ilustra um vetor pDZ-2prs para a introdução cromossômica no micro-organismo do gênero *Corynebacterium*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

A fim de atingir os objetivos acima, a presente invenção propõe um micro-organismo pertencente ao gênero *Corynebacterium*, que produz ácido 5'-inosínico, em que a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese da purina é aumentada além da expressão intrínseca.

O micro-organismo do gênero *Corynebacterium* da presente invenção apresenta maior produtividade de ácido 5'-inosínico do que uma linhagem parental, pois a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese da purina é aumentada além da expressão intrínseca.

Conforme usado no presente documento, o termo "enzima relacionada à biossíntese da purina" significa uma enzima que catalisa a reação envolvida na via de biossíntese da purina para produzir uma base de purina como produto final e inclui fosforibosilpirofosfato amidotransferase, fosforibosilglicinamida formiltransferase, fosforibosilformilglicinamidina sintetase, fosforibosilformilglicinamidina sintetase II, fosforibosilaminoimidazol sintetase, fosforibosilaminoimidazol carboxilase, fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetase, ácido inosínico ciclodrolase, ribosefosfato pirofosfoquinase ou seus semelhantes.

Em uma concretização específica da presente invenção, as enzimas relacionadas à biossíntese da purina podem ser uma combinação de uma ou mais enzimas escolhidas dentre o grupo composto por fosforibosilpirofosfato amidotransferase, fosforibosilglicinamida formiltransferase, fosforibosilformilglicinamidina sintetase, fosforibosilformilglicinamidina sintetase II, fosforibosilaminoimidazol sintetase, fosforibosilaminoimidazol carboxilase, fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetase, ácido inosínico ciclodrolase e ribosefosfato pirofosfoquinase.

Em uma concretização específica da presente invenção, o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina, cuja expressão é aumentada além da expressão intrínseca, é uma combinação de um gene purN de SEQ ID Nº 36, que codifica a fosforibosilglicinamida formiltransferase, um gene purS de SEQ ID Nº 37, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase, um gene purL de SEQ ID Nº 38, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase II, um gene purKE de SEQ ID Nº 40, que codifica a fosforibosilaminoimidazol carboxilase, um gene purC de SEQ ID Nº 41, que codifica a fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetase, um gene purH de SEQ ID Nº 42, que codifica a ácido inosínico

ciclohidrolase, e um gene prs de SEQ ID Nº 43, que codifica a ribosefosfato pirofosfoquinase.

Em uma concretização específica da presente invenção, o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina, cuja expressão é aumentada além da expressão intrínseca, é uma combinação de um gene purF de SEQ ID Nº 35, que codifica a fosforibosilpirofosfato amidotransferase, um gene purN de SEQ ID Nº 36, que codifica a fosforibosilglicinamida formiltransferase, um gene purS de SEQ ID Nº 37, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase, um gene purL de SEQ ID Nº 38, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase II, um gene purM de SEQ ID Nº 39, que codifica a fosforibosilaminoimidazol sintetase, um gene purKE de SEQ ID Nº 40, que codifica a fosforibosilaminoimidazol carboxilase, um gene purC de SEQ ID Nº 41, que codifica a fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetase, um gene purH de SEQ ID Nº 42, que codifica a ácido inosínico ciclohidrolase, e um gene prs de SEQ ID Nº 43, que codifica a ribosefosfato pirofosfoquinase.

Conforme usado no presente documento, o termo “aumentado além da expressão intrínseca” significa que o nível de expressão do gene é superior ao expresso naturalmente em um micro-organismo ou superior ao expresso em uma linhagem parental e inclui um aumento no número (número de cópias) dos genes que codificam enzimas correspondentes e no nível de expressão aumentado dessa forma ou um aumento no nível de expressão por mutação ou um aumento no nível de expressão de ambas as formas.

Em uma concretização específica da presente invenção, o aumento no nível de expressão do gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina inclui o aumento no número de cópia do gene introduzindo-se adicionalmente o gene externo correspondente em uma linhagem ou amplificando-se o gene intrínseco, ou o aumento na eficiência de transcrição ou na eficiência de tradução por mutação na sequência reguladora de transcrição ou tradução, mas não se limita a isso. A amplificação do gene intrínseco pode ser consumada com facilidade por meio de um método conhecido na técnica, por exemplo, por cultivo sob uma pressão selecionada adequada.

Em uma concretização específica da presente invenção, o nível de expressão do gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina pode ser aumentado introduzindo-se adicionalmente o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina em uma célula ou amplificando-se o gene intrínseco que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina.

Em uma concretização específica da presente invenção, o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina, cujo nível de expressão é aumentado além da expressão intrínseca, pode existir como duas ou mais cópias no micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico introduzindo-se uma ou mais cópias em uma célula, além do gene intrínseco correspondente.

Em uma concretização específica da presente invenção, o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina é introduzido no micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico por transformação usando-se um vetor recombinante que contém duas cópias do gene correspondente que são ordenadas consecutivamente.

Em uma concretização da presente invenção, o vetor recombinante para preparar o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico pode ser escolhido dentre o grupo composto pelos vetores recombinantes pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC e pDZ-2prs, que apresentam os mapas de clivagem ilustrados nas figuras de 2 a 7, respectivamente, dependendo dos genes introduzidos.

Em uma concretização específica da presente invenção, o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico pode ser derivado de micro-organismos *Corynebacteria* capazes de produzir ácido 5'-inosínico. Por exemplo, o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico de acordo com a presente invenção pode ser derivado do *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC6872, do *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, do *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, do *Brevibacterium flavum* ATCC14067, do *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 e de linhagens preparadas a partir deles.

Em uma concretização específica da presente invenção, o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico pode incluir duas ou mais cópias do gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina.

Em uma concretização específica da presente invenção, o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico pode ser o *Corynebacterium ammoniagenes*, de preferência, um *Corynebacterium ammoniagenes* transformado cuja atividade de uma combinação do gene prs e um ou mais genes escolhidos dentre o grupo composto por purF, purN,

purS, purL, purM, purKE, purC e purH é aumentada para produzir uma alta concentração de ácido 5'-inosínico.

Em uma concretização específica da presente invenção, o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico pode ser uma linhagem, em que a linhagem de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610) que produz ácido 5'-inosínico recebe cada um dos vetores recombinantes pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC e pDZ-2prs com os mapas de clivagem das figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 em ordem ou em combinação, e uma de duas cópias dos genes introduzidos purF, purN, purS, purL, purM, purKE, purC, purH e prs é substituída pelos genes intrínsecos correspondentes por recombinação homóloga e, portanto, cada duas cópias dos genes purF, purN, purS, purL, purM, purKE, purC, purH e prs são introduzidas na linhagem.

Em uma concretização específica da presente invenção, o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico pode ser o *Corynebacterium ammoniagenes* contendo duas cópias dos genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese da purina que são uma combinação do gene purN de SEQ ID Nº 36, que codifica a fosforibosilglicinamida formiltransferase, do gene purS de SEQ ID Nº 37, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase, do gene purL de SEQ ID Nº 38, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase II, do gene purKE de SEQ ID Nº 40, que codifica a fosforibosilaminoimidazol carboxilase, do gene purC de SEQ ID Nº 41, que codifica a fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetase, do gene purH de SEQ ID Nº 42, que codifica a ácido inosínico ciclodrolase, e do gene prs de SEQ ID Nº 43, que codifica a ribosefosfato pirofosfoquinase, e, de preferência, o *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120.

Em uma concretização específica da presente invenção, o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* com maior produtividade de ácido 5'-inosínico pode ser o *Corynebacterium ammoniagenes* contendo duas cópias dos genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese de purina que são uma combinação do purF de SEQ ID Nº 35, que codifica a fosforibosilpirofosfato amidotransferase, do gene purN de SEQ ID Nº 36, que codifica a fosforibosilglicinamida formiltransferase, do gene purS de SEQ ID Nº 37, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase, do gene purL de SEQ ID Nº 38, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase II, do gene purM de SEQ ID Nº 39, que codifica a fosforibosilaminoimidazol sintetase, do gene purKE de SEQ ID Nº 40, que codifica a

fosforibosilaminoimidazol carboxilase, do gene purC de SEQ ID Nº 41, que codifica a fosforibosil aminoimidazol succinocarboxamida sintetase, do gene purH de SEQ ID Nº 42, que codifica a ácido inosínico ciclohidrolase, e do gene prs de SEQ ID Nº 43, que codifica a ribosefosfato pirofosfoquinase, e, de preferência, *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (KCCM 10992P).

Ademais, a presente invenção propõe um método para produzir ácido 5'-inosínico que compreende as etapas de cultivar o micro-organismo pertencente ao gênero *Corynebacterium*, que produz ácido 5'-inosínico, cuja expressão de um gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina é aumentada além da expressão intrínseca, e recuperar o ácido 5'-inosínico do meio de cultura.

No método da presente invenção para produzir ácido 5'-inosínico, o meio e outras condições de culturas adotadas para o cultivo do micro-organismo do gênero *Corynebacterium* podem ser iguais aos adotados tipicamente no cultivo de micro-organismos do gênero *Corynebacterium* e facilmente selecionados e adaptados pelos versados na técnica. Além disso, o cultivo pode ser realizado por meio de qualquer método de cultivo conhecido pelos versados na técnica, por exemplo, cultura em lote, contínua e em lote alimentado, mas sem se restringir a esses.

Em uma concretização específica da presente invenção, o micro-organismo pertencente ao gênero *Corynebacterium* que produz ácido 5'-inosínico pode ser o *Corynebacterium ammoniagenes*.

Em uma concretização específica da presente invenção, o micro-organismo pertencente ao gênero *Corynebacterium* que produz ácido 5'-inosínico pode ser o *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 ou o *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (KCCM 10992P).

Em uma concretização específica da presente invenção, o cultivo do micro-organismo do gênero *Corynebacterium* é realizado cultivando-se a linhagem em um meio convencional que contenha fontes de carbono, fontes de nitrogênio, aminoácidos, vitaminas e seus semelhantes compatíveis em condições aeróbicas ajustando-se a temperatura, o pH ou algo do gênero.

Como fonte de carbono, é possível utilizar carboidratos como a glicose e a frutose. Como fonte de nitrogênio, é possível utilizar várias fontes inorgânicas de nitrogênio, como amônia, cloreto de amônio e sulfato de amônio, e fontes orgânicas de nitrogênio, como peptona, NZ-amina, extrato de bife, extrato de levedura, água de maceração de milho, hidrolisado de caseína, peixe, farinha de peixe

e massa ou farinha de soja sem gordura. Exemplos de compostos inorgânicos incluem fosfato monohidrogenado de potássio, fosfato dihidrogenado de potássio, sulfato de magnésio, sulfato ferroso, sulfato de manganês e carbonato de cálcio. Quando necessário, é possível utilizar vitaminas e bases auxotróficas.

5 O cultivo é realizado em condições aeróbicas, por exemplo, batendo-se ou agitando-se a cultura, de preferência, a uma temperatura de 28° a 36° C. Durante o cultivo, de preferência, o pH é mantido na faixa de 6 a 8. O cultivo pode ser realizado por 4 a 6 dias.

10 Doravante, descreveremos a presente invenção em mais detalhes com referência aos exemplos. No entanto, os exemplos servem apenas para fins ilustrativos, não havendo a intenção de limitar a invenção a eles.

Exemplo 1 – Introdução de genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese da purina usando-se um vetor (pDZ) para a introdução cromossômica e desenvolvimento de uma linhagem com alto rendimento de produção do ácido 5'-inosínico dessa maneira

15

A fim de inserir um gene externo no cromossomo da linhagem de *Corynebacterium ammoniagenes*, utilizamos um vetor recombinante à base de pDZ contendo duas cópias consecutivas do gene correspondente. O vetor pDZ é um vetor para a introdução cromossômica no micro-organismo do gênero *Corynebacterium* e foi preparado pelo método revelado na publicação de patente coreana nº 2008-0025355, anexada ao presente documento para fins de referência. A figura 1 é um diagrama esquemático que ilustra a estrutura do vetor pDZ.

20

Nos itens de (1) a (6) a seguir, preparamos vetores recombinantes que servem para inserir o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina no cromossomo do micro-organismo do gênero *Corynebacterium* a fim de obter duas cópias de cada gene. A transformação por cada vetor recombinante e a seleção de transformantes foram realizadas conforme o seguinte.

25

A linhagem de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 (KCCM-10610) que produz ácido 5'-inosínico foi transformada com o vetor recombinante pDZ contendo o gene desejado que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina por eletroporação e, então, linhagens, em que o gene transportado pelo vetor é inserido em seus cromossomos por recombinação homóloga, foram selecionadas em um meio de seleção contendo 25 mg/l de canamicina. A introdução cromossômica bem-sucedida do vetor foi confirmada pela coloração das colônias em um meio sólido (1% de extrato de bife, 1% de extrato de

30

35

levedura, 1% de peptona, 0,25% de cloreto de sódio, 1% de adenina, 1% de guanina, 1,5% de agarose) contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido). Ou seja, as colônias azuis foram selecionadas como transformantes, em que o vetor foi inserido no cromossomo. A linhagem, em que o vetor foi inserido em seu cromossomo por meio de um primeiro cruzamento, foi cultivada sob agitação (30° C, 8 horas) em um meio nutriente (1% de glicose, 1% de extrato de bife, 1% de extrato de levedura, 1% de peptona, 0,25% de cloreto de sódio, 1% de adenina, 1% de guanina). Em seguida, a linhagem cultivada foi diluída em série de 10^{-4} a 10^{-10} , e a cultura diluída foi folheada em um meio sólido contendo X-gal. A maioria das colônias apresentou coloração azul, mas também houve colônias brancas em menor quantidade. Selecionando-se as colônias brancas, foram selecionadas linhagens cuja sequência do vetor foi removida do cromossomo por meio de um segundo cruzamento. A linhagem selecionada foi identificada como uma linhagem final por um teste de suscetibilidade para a canamicina e uma análise de sequência genética por PCR.

(1) Clonagem do gene purFM e construção do vetor recombinante (pDZ-2purFM)

Os genes purF e purM encontram-se próximos um do outro no cromossomo do micro-organismo do gênero *Corynebacterium* e, portanto, um vetor purFM contendo ambos os genes e a região promotora foi construído a fim de expressar ambos os genes ao mesmo tempo.

O cromossomo foi isolado do *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada usando-se o cromossomo como modelo a fim de obter o purFM, a saber, um fragmento contendo purF e purM ordenados consecutivamente. A DNA polimerase de Alta Fidelidade *PfuUltra*TM (Stratagene) foi usada como a polimerase e a reação em cadeia da polimerase foi realizada com 30 ciclos de desnaturalização a 96° C por 30 s, anelando a 53° C por 30 s, e polimerização a 72° C por 2 min. Como resultado, obtivemos dois genes purFM contendo a região promotora (purFM-A, purFM-B). O purFM-A foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID Nº 1 e 2, e o purFM-B foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID Nº 3 e 4. Os produtos da amplificação foram clonados em um vetor pCR2.1 da *E.coli* usando-se um *kit* de clonagem TOPO (Invitrogen) a fim de obter os vetores pCR-purFM-A e pCR-purFM-B, respectivamente. Os vetores pCR foram tratados com enzimas de restrição contidas em cada extremidade do purFM-A e do purFM-B (purFM-A: EcoRI+XbaI, purFM-B: XbaI+HindIII) e cada gene purFM foi separado dos vetores pCR. Depois disso, o vetor pDZ tratado com enzimas de restrição *EcoRI* e

HindIII foi clonado por ligação em 3 partes a fim de construir um vetor recombinante pDZ-2purFM em que dois genes purFM são clonados consecutivamente. A figura 2 ilustra um vetor pDZ-2purFM para a introdução cromossômica no *Corynebacterium*.

A linhagem que produz ácido 5'-inosínico *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 foi transformada com o vetor pDZ-2purFM por eletroporação, e um gene purFM é adicionalmente inserido próximo ao gene intrínseco purFM no cromossomo por meio de um segundo cruzamento, a fim de obter uma linhagem com duas cópias ao todo. Os genes purFM inseridos consecutivamente foram identificados por PCR usando-se os oligonucleotídeos-iniciadores de SEQ ID N^o 5 e 6, que são capazes de ampliar as regiões de conexão de dois genes purFM.

(2) Clonagem do gene purFM e construção do vetor recombinante (pDZ-2purNH), preparo da linhagem com purNH inserido

Os genes purN e purH encontram-se próximos um do outro no cromossomo do micro-organismo do gênero *Corynebacterium* e, portanto, um vetor purNH contendo a região promotora foi construído a fim de expressar ambos os genes ao mesmo tempo.

O cromossomo foi isolado do *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico, e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada usando-se o cromossomo como modelo a fim de obter purNH, a saber, um fragmento contendo purN e purH ordenados consecutivamente. A DNA polimerase de Alta Fidelidade *PfuUltra*TM (Stratagene) foi usada como a polimerase e a reação em cadeia da polimerase foi realizada com 30 ciclos de desnaturalização a 96° C por 30 s, anelando a 53° C por 30 s, e polimerização a 72° C por 2 min. Como resultado, obtivemos dois genes purNH contendo a região promotora (purNH-A, purNH-B). O purNH-A foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID N^o 7 e 8, e o purNH-B foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID N^o 8 e 9. Os produtos da amplificação foram clonados em um vetor pCR2.1 da *E.coli* usando-se um *kit* de clonagem TOPO (Invitrogen) a fim de obter os vetores pCR-purNH-A e pCR-purNH-B, respectivamente. Os vetores pCR foram tratados com enzimas de restrição contidas em cada extremidade do purNH-A e do purNH-B (purNH-A: *BamHI*+*Sall*, purNH-B: *Sall*) e cada gene purNH foi separado dos vetores pCR. Depois disso, o vetor pDZ tratado com enzimas de restrição *BamHI* e *Sall* foi clonado por ligação em 3 partes a fim de construir um vetor recombinante pDZ-2purNH em que os dois genes purNH são clonados consecutivamente. A figura 3 ilustra um vetor pDZ-2purNH para a introdução cromossômica no *Corynebacterium*.

A linhagem de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico foi transformada com o vetor pDZ-2purNH por eletroporação, e um gene purNH é adicionalmente inserido próximo ao gene intrínseco purNH no cromossomo por meio de um segundo cruzamento, a fim de obter uma linhagem com duas cópias ao todo. Os genes purNH inseridos consecutivamente foram identificados por PCR usando-se os oligonucleotídeos-iniciadores de SEQ ID Nº 10 e 11, que são capazes de ampliar as regiões de conexão de dois genes purNH.

(3) Clonagem do gene purSL e construção do vetor recombinante (pDZ-2purSL), preparo da linhagem com purSL inserido

Os genes purS e purL encontram-se próximos um do outro no cromossomo do micro-organismo do gênero *Corynebacterium* e, portanto, um vetor purSL contendo a região promotora foi construído a fim de expressar ambos os genes ao mesmo tempo.

O cromossomo foi isolado do *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico, e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada usando-se o cromossomo como modelo a fim de obter purSL, a saber, um fragmento contendo purS e purL ordenados consecutivamente. A DNA polimerase de Alta Fidelidade *PfuUltra*TM (Stratagene) foi usada como a polimerase e a reação em cadeia da polimerase foi realizada com 30 ciclos de desnaturalização a 96° C por 30 s, anelando a 53° C por 30 s, e polimerização a 72° C por 2 min. Como resultado, obtivemos dois genes purSL contendo a região promotora (purSL-A, purSL-B). O purSL-A foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID Nº 12 e 13, e o purSL-B foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID Nº 14 e 15. Os produtos da amplificação foram clonados em um vetor pCR2.1 da *E.coli* usando-se um *kit* de clonagem TOPO (Invitrogen) a fim de obter os vetores pCR-purSL-A e pCR-purSL-B, respectivamente. Os vetores pCR foram tratados com enzimas de restrição contidas em cada extremidade do purSL-A e do purSL-B (purSL-A: BamHI+Sall, purSL-B: Sall+BamHI) e cada gene purSL foi separado dos vetores pCR. Depois disso, o vetor pDZ tratado com a enzima de restrição BamHI foi clonado por ligação em 3 partes a fim de construir um vetor recombinante pDZ-2purSL em que dois genes purSL são clonados consecutivamente. A figura 4 ilustra um vetor pDZ-2purSL para a introdução cromossômica no *Corynebacterium*.

A linhagem *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico foi transformada com o vetor pDZ-2purSL por eletroporação, e um gene purSL é adicionalmente inserido próximo ao gene intrínseco purSL no cromossomo por meio de um segundo cruzamento, a fim de obter uma linhagem com

duas cópias ao todo. Os genes *purSL* inseridos consecutivamente foram identificados por PCR usando-se os oligonucleotídeos-iniciadores de SEQ ID Nº 16 e 17, que são capazes de ampliar as regiões de conexão de dois genes *purSL*.

(4) Clonagem do gene *purKE* e construção do vetor recombinante (pDZ-2*purKE*), preparo da linhagem com *purKE* inserido

Os genes *purK* e *purE* encontram-se próximos um do outro no cromossomo do micro-organismo do gênero *Corynebacterium* e, portanto, um vetor *purKE* contendo a região promotora foi construído a fim de expressar ambos os genes ao mesmo tempo.

O cromossomo foi isolado do *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico, e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada usando-se o cromossomo como modelo a fim de obter *purKE*, a saber, um fragmento contendo *purK* e *purE* ordenados consecutivamente. A DNA polimerase de Alta Fidelidade *PfuUltra*TM (Stratagene) foi usada como a polimerase e a reação em cadeia da polimerase foi realizada com 30 ciclos de desnaturalização a 96° C por 30 s, anelando a 53° C por 30 s, e polimerização a 72° C por 2 min. Como resultado, obtivemos dois genes *purKE* contendo a região promotora (*purKE*-A, *purKE*-B). O *purKE*-A foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID Nº 18 e 19, e o *purKE*-B foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID Nº 20 e 21. Os produtos da amplificação foram clonados em um vetor pCR2.1 da *E.coli* usando-se um *kit* de clonagem TOPO (Invitrogen) a fim de obter os vetores pCR-*purKE*-A e pCR-*purKE*-B, respectivamente. Os vetores pCR foram tratados com enzimas de restrição contidas em cada extremidade do *purKE*-A e do *purKE*-B (*purKE*-A: BamHI+KpnI, *purKE*-B: KpnI+XbaI) e cada gene *purKE* foi separado dos vetores pCR. Depois disso, o vetor pDZ tratado com enzimas de restrição BamHI e XbaI foi clonado por ligação em 3 partes a fim de construir um vetor recombinante pDZ-2*purKE* em que os dois genes *purKE* são clonados consecutivamente. A figura 5 ilustra um vetor pDZ-2*purKE* para a introdução cromossômica no *Corynebacterium*.

A linhagem *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico foi transformada com o vetor pDZ-2*purKE* por eletroporação, e um gene *purKE* é adicionalmente inserido próximo ao gene intrínseco *purKE* no cromossomo por meio de um segundo cruzamento, a fim de obter uma linhagem com duas cópias ao todo. Os genes *purKE* inseridos consecutivamente foram identificados por PCR usando-se os oligonucleotídeos-iniciadores de SEQ ID Nº 22 e 23, que são capazes de ampliar as regiões de conexão de dois genes *purKE*.

(5) Clonagem do gene purC e construção do vetor recombinante (pDZ-2purC), preparo da linhagem com purC inserido

O cromossomo foi isolado do *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 e a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada usando o cromossomo como modelo a fim de obter o purC. A DNA polimerase de Alta Fidelidade *PfuUltra*TM foi usada como a polimerase e a reação em cadeia da polimerase foi realizada com 30 ciclos de desnaturalização a 96° C por 30 s, anelando a 53° C por 30 s, e polimerização a 72° C por 2 min. Como resultado, obtivemos dois genes purC contendo a região promotora (purC-A, purC-B). O purC-A foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID N° 24 e 25, e o purC-B foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID N° 25 e 26. Os produtos da amplificação foram clonados em um vetor pCR2.1 da *E.coli* usando-se um kit de clonagem TOPO a fim de obter os vetores pCR-purC-A e pCR-purC-B, respectivamente. Os vetores pCR foram tratados com enzimas de restrição contidas em cada extremidade do purC-A e do purC-B (purC-A: BamHI+Sall, purC-B: Sall) e cada gene purC foi separado dos vetores pCR. Depois disso, o vetor pDZ tratado com enzimas de restrição *BamHI* e *Sall* foi clonado por ligação em 3 partes a fim de construir um vetor recombinante pDZ-2purC em que os dois genes purC são clonados consecutivamente. A figura 6 ilustra um vetor pDZ-2purC para a introdução cromossômica no *Corynebacterium*.

A linhagem *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico foi transformada com o vetor pDZ-2purC por eletroporação, e um gene purC é adicionalmente inserido próximo ao gene intrínseco purC no cromossomo por meio de um segundo cruzamento, a fim de obter uma linhagem com duas cópias ao todo. Os genes purC inseridos consecutivamente foram identificados por PCR usando-se os oligonucleotídeos-iniciadores de SEQ ID N° 27 e 28, que são capazes de ampliar as regiões de conexão de dois genes purC.

(6) Clonagem do gene prs e construção do vetor recombinante (pDZ-2prs), preparo da linhagem com prs inserido

O cromossomo foi isolado do *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 e a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada usando o cromossomo como modelo a fim de obter o prs. A DNA polimerase de Alta Fidelidade *PfuUltra*TM foi usada como a polimerase e a reação em cadeia da polimerase foi realizada com 30 ciclos de desnaturalização a 96° C por 30 s, anelando a 53° C por 30 s, e polimerização a 72° C por 2 min. Como resultado, obtivemos dois genes prs contendo a região promotora (prs-A, prs-B). O prs-A foi amplificado usando-se os

oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID N° 29 e 30, e o prs-B foi amplificado usando-se os oligonucleotídeo-iniciadores de SEQ ID N° 31 e 32. Os produtos da amplificação foram clonados em um vetor pCR2.1 da *E.coli* usando-se um *kit* de clonagem TOPO a fim de obter os vetores pCR-prs-A e pCR-prs-B, respectivamente. Os vetores pCR foram tratados com enzimas de restrição contidas em cada extremidade do prs-A e do prs-B (prs-A: BamHI+SpeI, prs-B: SpeI+PstI) e cada gene prs foi separado dos vetores pCR. Depois disso, o vetor pDZ tratado com enzimas de restrição BamHI e PstI foi clonado por ligação em 3 partes a fim de construir um vetor recombinante pDZ-2prs em que os dois genes purC são clonados consecutivamente. A figura 7 ilustra um vetor pDZ-2prs para a introdução cromossômica no *Corynebacterium*.

A linhagem *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico foi transformada com o vetor pDZ-2prs por eletroporação, e um gene prs é adicionalmente inserido próximo ao gene intrínseco prs no cromossomo por meio de um segundo cruzamento, a fim de obter uma linhagem com duas cópias ao todo. Os genes prs inseridos consecutivamente foram identificados por PCR usando-se os oligonucleotídeos-iniciadores de SEQ ID N° 33 e 34, que são capazes de ampliar as regiões de conexão de dois genes prs.

(7) Desenvolvimento de linhagens com alto rendimento na produção de ácido 5'-inosínico por intensificação da biossíntese da purina

Combinações dos vetores pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC e pDZ-2prs construídos nos itens de (1) a (6) foram introduzidas no *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 que produz ácido 5'-inosínico. A ordem de introdução dos vetores foi selecionada aleatoriamente e o método de introdução e identificação são os mesmos acima.

O *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 foi usado como uma linhagem parental e transformado com uma combinação de pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC e pDZ-2prs e uma combinação de pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC, pDZ-2purFM e pDZ-2prs para obter *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 (2purNH + 2purSL + 2purKE + 2purC + 2prs) e *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 (2purNH + 2purSL + 2purKE + 2purC + 2purFM + 2prs), que contêm duas cópias dos genes que codificam as principais enzimas envolvidas na via da biossíntese da purina.

Exemplo 2 – Teste de título de fermentação de *Corynebacterium ammoniagenes* recombinantes

Cada 3 ml do meio de semeadura com a composição a seguir foram distribuídos em tubos de ensaio com diâmetro de 18 mm e esterilizados sob

pressão. Em seguida, a linhagem parental *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401 e o *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 e o *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 preparados no exemplo 1 foram inoculados e cultivados sob agitação a 30° C por 24 horas para uso como cultura de semeadura. Cada 27 ml do meio de fermentação com a composição a seguir foram distribuídos em frascos de agitação Erlenmeyer de 500 ml e esterilizados sob pressão a 120° C por 10 minutos, e cada 3 ml da cultura de semeadura foram inoculados a ele e cultivados sob agitação por 5 a 6 dias. O cultivo foi realizado nas condições de 200 rpm, 32° C e pH de 7,2.

O meio de semeadura e o meio de fermentação tiveram as composições a seguir.

Meio de semeadura: 1% de glicose, 1% de peptona, 1% de extrato de bife, 1% de extrato de levedura, 0,25% de cloreto de sódio, 100 mg/l de adenina, 100 mg/l de guanina, pH de 7,2

Meio de fermentação no frasco: 0,1% de glutamato de sódio, 1% de cloreto de amônio, 1,2% de sulfato de magnésio, 0,01% de cloreto de cálcio, 20 mg/l de sulfato de ferro, 20 mg/l de sulfato de manganês, 20 mg/l de sulfato de zinco, 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 cloridrato de tiamina, 30 mg/l de adenina, 1,9% de ácido fosfórico (85%), 4,2% de glicose e 2,4% de açúcar bruto

Após a conclusão do cultivo, a produtividade de ácido 5'-inosínico foi medida por HPLC, e a quantidade acumulada de ácido 5'-inosínico no meio de cultura é apresentada na tabela a seguir

Tabela 1

Nome da linhagem	OD de células (5 dias após a cultura)	Produtividade (g/l/h) (5 dias após a cultura)
Grupo de controle (CJIP2401)	31,2	0,136
CN01-0120	31,8	0,155
CN01-0316	31,3	0,149

A quantidade acumulada de ácido 5'-inosínico no meio de cultura foi comparada à da linhagem parental *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401. Como resultado, no *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120 e no *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316, a produtividade de ácido 5'-inosínico por hora teve um aumento de 10,9% a 11,4% nas mesmas condições em comparação à linhagem parental *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401.

A *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316 com maior produtividade de ácido 5'-inosínico graças ao aumento da atividade de enzimas relacionadas à biossíntese da purina foi depositada no Centro de Cultura de Micro-

organismos da Coreia (KCCM), localizado em Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, sob o nº de acesso KCCM 10992P, no dia 19 de fevereiro de 2009, de acordo com o tratado de Budapeste.

Efeitos da Invenção

- 5 O micro-organismo pertencente ao gênero *corynebacterium* que produz ácido 5'-inosínico de acordo com a presente invenção, cuja expressão de enzimas relacionadas à biossíntese da purina é aumentada além da expressão intrínseca, pode ser usado para produzir ácido 5'-inosínico em altas concentração e com alto rendimento, diminuindo assim os custos de produção.

REIVINDICAÇÕES

1. Microrganismo pertencente ao gênero *Corynebacterium* que produz ácido 5'-inosínico, **caracterizado** pelo fato de que o nível de expressão de genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese da purina é aumentado além do nível de expressão natural correspondente por um aumento no número de cópias dos referidos genes, em que os genes que codificam as enzimas relacionadas à biossíntese da purina compreendem um gene purN da sequência da SEQ ID NO: 36, que codifica uma fosforibosilglicinamida formiltransferase, o gene purS com a sequência da SEQ ID NO: 37, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase, o gene purL com a sequência da SEQ ID NO: 38, que codifica a fosforibosilformilglicinamidina sintetase II, genes purKE com a sequência da SEQ ID NO: 40, que codifica a fosforibosilaminoimidazol carboxilase, o gene purC com a sequência da SEQ ID NO: 41, que codifica a fosforibosilaminoimidazol succinocarboxamida sintetase, o gene purH com a sequência da SEQ ID NO: 42, que codifica a ciclohidrolase do ácido inosínico e o gene prs com a sequência SEQ ID NO: 43, que codifica a ribosefosfato pirofosfoquinase..

2. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as enzimas relacionadas à biossíntese da purina compreendem ainda o gene purF com a sequência SEQ ID NO: 35, que codifica fosforibosil pirofosfato amidotransferase, e o gene purM com a sequência SEQ ID NO: 39, que codifica a fosforibosilaminoimidazol sintetase.

3. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina é superexpresso introduzindo-se adicionalmente os genes que codificam enzimas relacionadas à biossíntese da purina em uma célula ou amplificando-se o gene intrínseco que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina.

4. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina existe como duas ou mais cópias introduzindo-se uma ou mais cópias em uma célula, além do gene intrínseco correspondente.

5. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o gene que codifica enzimas relacionadas à biossíntese da purina é introduzido na célula pela transformação usando um vetor recombinante que contém duas cópias do gene correspondente que são ordenadas consecutivamente.

6. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o vetor recombinante para introdução no referido gene do microrganismo definido na reivindicação 1 é escolhido dentre o grupo composto por pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC e pDZ-2prs e o vetor recombinante para introdução no referido gene do microrganismo definido na reivindicação 2 é escolhido dentre o grupo composto por pDZ-2purFM, pDZ-2purNH, pDZ-2purSL, pDZ-2purKE, pDZ-2purC e pDZ-2prsncom os mapas de clivagem das figuras de 2 a 7, respectivamente.

7. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo do gênero *Corynebacterium* é o *Corynebacterium ammoniagenes*.

8. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo é o *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0120, 2purNH+2purSL+2purKE+2purC+2prs, obtido a partir de *Corynebacterium ammoniagenes* CJIP2401.

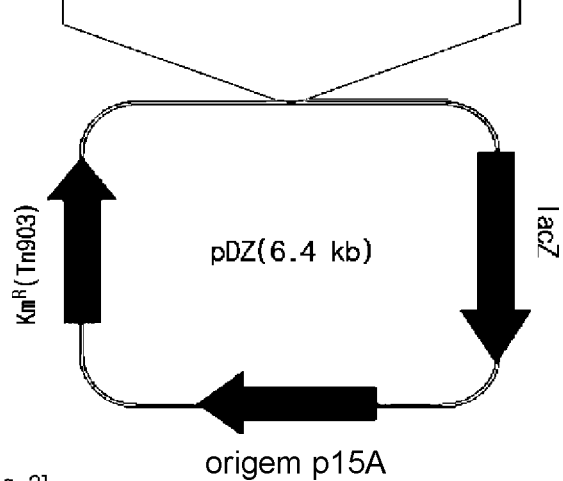
9. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo do gênero *Corynebacterium* é o *Corynebacterium ammoniagenes* CN01-0316, KCCM 10992P.

10. Método para produzir ácido 5'-inosínico envolvendo o cultivo de um microrganismo, **caracterizado** por compreender cultivar o

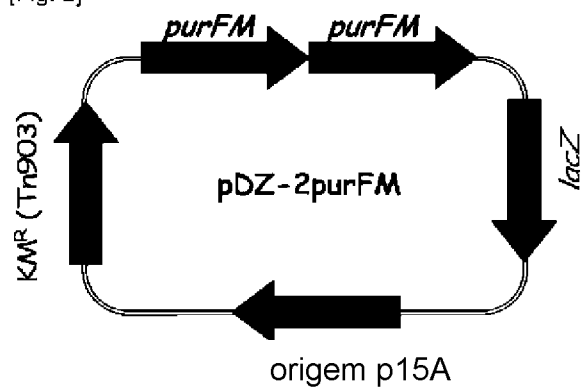
microrganismo pertencente ao gênero *Corynebacterium*, conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, e isolar o ácido 5'-inosínico do meio de cultura.

[Fig. 1]

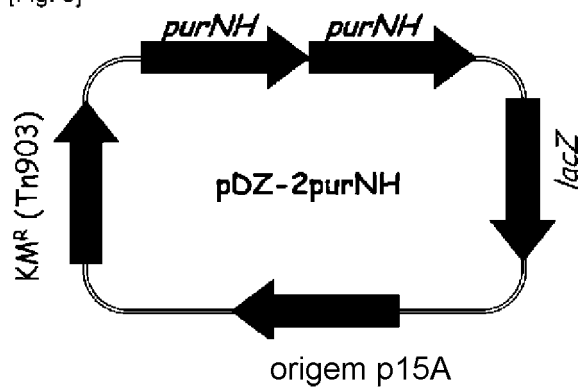
*Bam*H*I* *Eco*R*I* *Eco*R*V* *Kpn*I *Sac*I *Sal*I *Xba*I *Hind*I*III* *Nhe*I



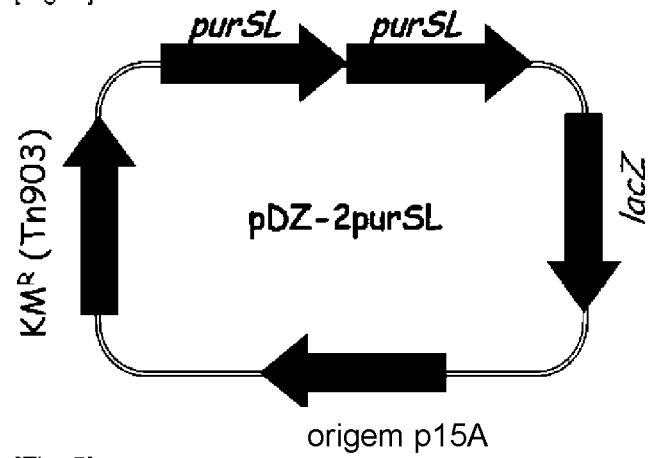
[Fig. 2]



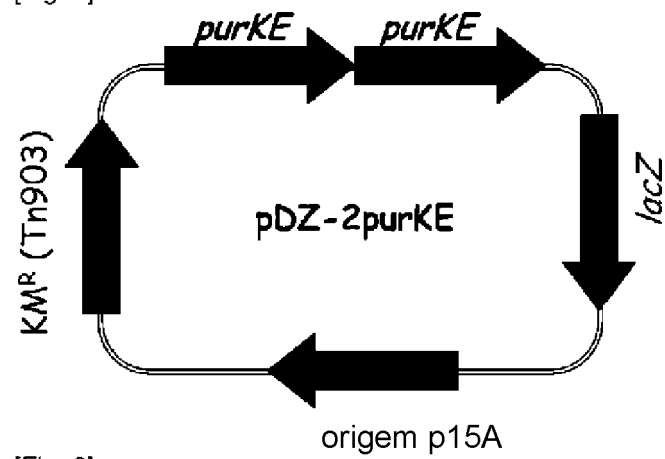
[Fig. 3]



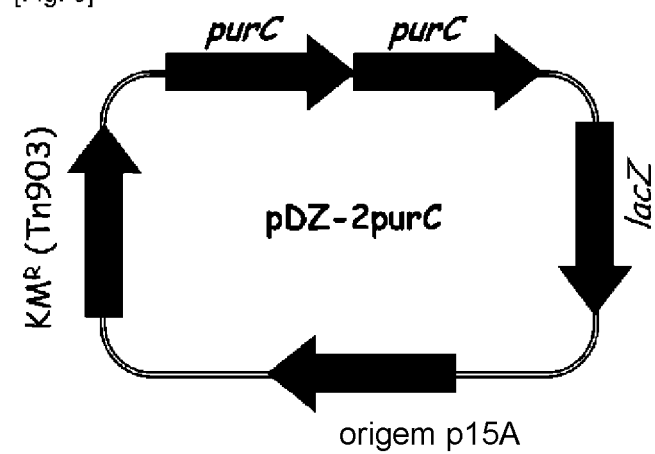
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]

