



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 332**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

C12P 13/12 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02740582 .8**

96 Fecha de presentación : **10.05.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1390504**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

54 Título: **Secuencias nucleotídicas que codifican el gen METD.**

30 Prioridad: **30.05.2001 DE 101 26 164**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2011

73 Titular/es: **EVONIK DEGUSSA GmbH**
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es: **Rey, Daniel;**
Rückert, Christian;
Kalinowski, Jörn;
Pühler, Alfred;
Bathe, Brigitte;
Huthmacher, Klaus y
Pfefferle, Walter

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 363 332 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

Secuencias nucleotídicas que codifican el gen METD

Campo de la Invención

5 La invención proporciona secuencias nucleotídicas a partir de bacterias corineformes que codifican el gen metD, y un procedimiento para la preparación de aminoácidos usando bacterias en las que el gen metD está atenuado.

Técnica Anterior

Los L-aminoácidos, en particular la L-metionina, se usan en medicina humana y en la industria de fármacos, en la industria alimentaria, y muy particularmente en nutrición animal.

10 Se sabe que los aminoácidos se preparan mediante fermentación a partir de cepas de bacterias corineformes, en particular *Corynebacterium glutamicum*. Debido a su gran importancia, constantemente se está llevando a cabo un trabajo para mejorar los procesos de preparación. Las mejoras al proceso se pueden referir a medidas de fermentación, tales como, por ejemplo, agitación y suministro de oxígeno, o la composición de los medios nutrientes, tales como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación, o el tratamiento de la forma del producto mediante, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, o las propiedades de producción intrínsecas del propio microorganismo.

15 Los métodos de mutagénesis, selección y selección de mutantes se usan para mejorar las propiedades de producción de estos microorganismos. De esta manera se obtienen cepas que son resistentes a antimetabolitos, o son auxotróficas para metabolitos de importancia reguladora, y que producen aminoácidos.

20 Los métodos de la técnica de ADN recombinante también se han empleado durante algunos años para mejorar la cepa de cepas de *Corynebacterium* que producen L-aminoácido, amplificando genes individuales de la biosíntesis de aminoácidos e investigando el efecto sobre la producción de aminoácidos.

Objeto de la Invención

El objeto de la invención es proporcionar nuevas medidas para la preparación fermentativa mejorada de aminoácidos.

25 Descripción de la Invención

Cuando se mencionan en lo siguiente L-aminoácidos o aminoácidos, esto significa uno o más aminoácidos, incluyendo sus sales, escogidos del grupo que consiste en L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-iso-leucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano y L-arginina. Se prefiere particularmente L-metionina.

30 Cuando se menciona en lo siguiente L-metionina o metionina, también se quiere decir por esto las sales, tales como por ejemplo hidrocloreto de metionina o sulfato de metionina.

La invención proporciona un polinucleótido aislado a partir de bacterias corineformes, que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica el gen metD, escogido del grupo que consiste en

35 a) polinucleótido que es idéntico en un grado de al menos 70% a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 2,

b) polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un grado de al menos 70% a la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 2,

c) polinucleótido que es complementario a los polinucleótidos de a) o b),

40 d) polinucleótido que comprende al menos 15 nucleótidos sucesivos de la secuencia polinucleotídica de a), b) o c),

teniendo preferiblemente el polipéptido la actividad del regulador de la transcripción MetD.

45 Los reguladores transcripcionales son proteínas que son capaces de incrementar o disminuir el nivel de transcripción de genes específicos uniéndose a ciertas regiones de ADN. Se ha encontrado que los reguladores tienen una estructura específica, denominada motivo hélice-giro-hélice. La invención proporciona la función del regulador transcripcional metD como la represión de genes que están implicados en la biosíntesis de L-aminoácidos, en particular la biosíntesis de L-metionina. La atenuación del regulador transcripcional metD mejora la producción de L-metionina en bacterias corineformes.

La invención también proporciona el polinucleótido mencionado anteriormente, siendo éste preferiblemente un ADN que es capaz de replicarse, que comprende:

- (i) la secuencia nucleotídica mostrada en SEC ID No. 1, o
- 5 (ii) al menos una secuencia que corresponde a la secuencia (i) dentro de la degeneración del código genético, o
- (iii) al menos una secuencia que se hibrida con las secuencias complementarias a las secuencias (i) o (ii), y opcionalmente
- (iv) mutaciones sentido de función neutra en (i) que no modifican la actividad de la proteína/polipéptido.

Finalmente, la invención también proporciona nucleótidos escogidos del grupo que consiste en

- 10 a) polinucleótidos que comprenden al menos 15 nucleótidos sucesivos escogidos de la secuencia nucleotídica de SEC ID No. 1 entre las posiciones 1 y 313,
- b) polinucleótidos que comprenden al menos 15 nucleótidos sucesivos escogidos de la secuencia nucleotídica de SEC ID No. 1 entre las posiciones 314 y 1024,
- 15 c) polinucleótidos que comprenden al menos 15 nucleótidos sucesivos escogidos de la secuencia nucleotídica de SEC ID No. 1 entre las posiciones 1025 y 1322.

La invención también proporciona:

- un polinucleótido, en particular ADN, que es capaz de replicarse, y comprende la secuencia nucleotídica como se muestra en SEC ID No. 1;
- 20 un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID No. 2;
- un vector que contiene partes del polinucleótido según la invención, pero al menos 15 nucleótidos sucesivos de la secuencia reivindicada,
- y bacterias corineformes en las que el gen metD está atenuado, en particular mediante una inserción o supresión.

25 La invención también proporciona polinucleótidos, que comprenden sustancialmente una secuencia polinucleotídica, que son obtenibles mediante la identificación por medio de hibridación de una genoteca correspondiente de una bacteria corineforme, que comprende el gen completo o partes del mismo, con una sonda que comprende la secuencia del polinucleótido según la invención de acuerdo con SEC ID No. 1 o un fragmento de la misma, y del aislamiento de la secuencia polinucleotídica mencionada.

30 Los polinucleótidos que comprenden las secuencias según la invención son adecuados como sondas de hibridación para ARN, ADNc y ADN, a fin de aislar, en la longitud completa, ácidos nucleicos o polinucleótidos o genes que codifican el regulador de la transcripción MetD, o para aislar aquellos ácidos nucleicos o polinucleótidos o genes que tienen una elevada similitud con la secuencia del gen metD. También son adecuados para la incorporación en denominados "chips", "microchips" o "chips de ADN", a fin de detectar y determinar los polinucleótidos correspondientes.

35

Los polinucleótidos que comprenden las secuencias según la invención son adecuados además como cebadores, con cuya ayuda se puede preparar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ADN de genes que codifican el regulador de la transcripción MetD.

40 Tales oligonucleótidos que sirven como sondas o cebadores comprenden al menos 25, 26, 27, 28, 29 ó 30, preferiblemente al menos 20, 21, 22, 23 ó 24, de forma muy particularmente preferible al menos 15, 16, 17, 18 ó 19 nucleótidos sucesivos. También son adecuados los oligonucleótidos con una longitud de al menos 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40 o al menos 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 nucleótidos. Opcionalmente, también son adecuados los oligonucleótidos con una longitud de al menos 100, 150, 200, 250 ó 300 nucleótidos.

"Aislado" significa separado de su entorno natural.

45 "Polinucleótido" se refiere en general a polirribonucleótidos y polidesoxirribonucleótidos, siendo posible que estos sean ARN o ADN no modificado, o ARN o ADN modificado.

Los polinucleótidos según la invención incluyen un polinucleótido según SEC ID No. 1 o un fragmento preparado a partir del mismo, y también aquellos que son al menos 70% a 80%, preferiblemente al menos 81% a 85%,

particularmente de forma preferible al menos 86% a 90%, y de forma muy particularmente preferible al menos 91%, 93%, 95%, 97% o 99% idénticos al polinucleótido según SEC ID No. 1 o un fragmento preparado a partir del mismo.

“Polipéptidos” se entiende que significa péptidos o proteínas que comprenden dos o más aminoácidos enlazados vía enlaces peptídicos.

5 Los polipéptidos según la invención incluyen un polipéptido según SEC ID No. 2, en particular aquellos con la actividad biológica del regulador de la transcripción MetD, y también aquellos que son al menos 70% a 80%, preferiblemente al menos 81% a 85%, de forma particularmente preferible al menos 86% a 90%, y de forma muy particularmente preferible al menos 91%, 93%, 95%, 97% o 99% idénticos al polipéptido según SEC ID No. 2 y tienen la actividad mencionada.

10 La invención se refiere además a un procedimiento para la preparación de aminoácidos escogidos del grupo que consiste en L-asparagina, L-treonina, L-serina, L-glutamato, L-glicina, L-alanina, L-cisteína, L-valina, L-metionina, L-isoleucina, L-leucina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-histidina, L-lisina, L-triptófano y L-arginina, usando bacterias corineformes que en particular ya producen aminoácidos y en las que las secuencias nucleotídicas que codifican el gen metD están atenuadas, en particular eliminadas o expresadas en un nivel bajo.

15 El término “atenuación” describe a este respecto la reducción o eliminación de la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo que son codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo usando un promotor débil o usando un gen o alelo que codifica una enzima o proteína correspondiente con una baja actividad o inactiva el gen o enzima (proteína) correspondiente, y opcionalmente combinando estas medidas.

20 Mediante las medidas de atenuación, la actividad o concentración de la proteína correspondiente se reduce en general a 0 a 75%, 0 a 50%, 0 a 25%, 0 a 10% o 0 a 5% de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o la actividad del microorganismo de partida.

25 El incremento de la concentración de proteína se puede analizar mediante electroforesis en gel de proteína mono y bidimensional, seguido de la identificación óptica de la concentración de proteína mientras se usa un software de ordenador específico. Hermann et al. (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)) describen un método habitual para preparar geles de proteína usando bacterias corineformes, y para identificar las proteínas.

30 La concentración de la proteína también se puede analizar mediante técnicas de hibridación de transferencia Western mientras se usan anticuerpos específicos (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) y evaluación óptica subsiguiente con software de ordenador usado habitualmente para analizar concentraciones de proteína (Lohaus y Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich (1999) Angewandte Chemie 111:2630-2647). La actividad de las proteínas que se unen al ADN se puede medir mediante ensayos de desplazamiento de banda de ADN (también conocidos como retraso de gel (Wilson et al. (2001) Journal of Bacteriology 183:2151-2155). La influencia de las proteínas que se unen al ADN sobre la expresión génica se puede identificar mediante ensayos de genes informadores bien descritos (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

40 Los microorganismos proporcionados por la presente invención pueden preparar aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasas, almidón, celulosa, o a partir de glicerol y etanol. Pueden ser representativos de bacterias corineformes, en particular del género *Corynebacterium*. Del género *Corynebacterium*, se puede mencionar en particular la especie *Corynebacterium glutamicum*, que es conocida entre los expertos por su capacidad para producir L-aminoácidos.

Las cepas adecuadas del género *Corynebacterium*, en particular de la especie *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), son en particular las cepas de tipo salvaje conocidas

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

45 *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 y

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

o mutantes o cepas productoras de L-aminoácidos preparados a partir de ellas, como, por ejemplo, la cepa productora de metionina *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Se ha aislado el nuevo gen *metD* de *C. glutamicum* que codifica el regulador de la transcripción *MetD*.

- 5 Para aislar el gen *metD* o también otros genes de *C. glutamicum*, en primer lugar se establece en *Escherichia coli* (*E. coli*) una genoteca de este microorganismo. El establecimiento de genotecas se describe generalmente en libros de texto y manuales conocidos. Se pueden mencionar como ejemplo el libro de texto de Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie [Genes y Clones, Una Introducción a la Ingeniería Genética]* (Verlag Chemie, Weinheim, Alemania, 1990), o el manual de Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Una genoteca bien conocida es aquella de la cepa W3110 de *E. coli* K-12 establecida en vectores λ por Kohara et al. (*Cell* 50, 495-508 (1987)). Bathe et al. (*Molecular and General Genetics*, 252:255-265, 1996) describen una genoteca de *C. glutamicum* ATCC13032, que se estableció con la ayuda del vector cósmido SuperCos I (Wahl et al., 1987, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84:2160-2164) en la cepa NM554 de *E. coli* K-12 (Raleigh et al., 1988, *Nucleic Acids Research* 16: 1563-1575).
- 10
- 15 Börmann et al. (*Molecular Microbiology* 6(3), 317-326 (1992)) describen a su vez una genoteca de *C. glutamicum* ATCC13032 usando el cósmido pHc79 (Hohn y Collins, 1980, *Gene* 11, 291-298).

Para preparar una genoteca de *C. glutamicum* en *E. coli*, también es posible usar plásmidos tales como pBR322 (Bolivar, 1979, *Life Sciences*, 25, 807-818) o pUC9 (Vieira et al., 1982, *Gene*, 19:259-268). En particular, los hospedantes adecuados son aquellas cepas de *E. coli* que son defectuosas en cuanto a la restricción y a la recombinación, tales como, por ejemplo, la cepa DH5 α mcr, que ha sido descrita por Grant et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87 (1990) 4645-4649). Los fragmentos largos de ADN clonados con la ayuda de cósmidos u otros vectores λ se pueden subclonar entonces a su vez y se pueden secuenciar subsiguientemente en los vectores habituales que son adecuados para la secuenciación de ADN, tal como se describe, por ejemplo, por Sanger et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463-5467, 1977).

20

25

Las secuencias de ADN resultantes se pueden investigar entonces con algoritmos conocidos o programas de análisis de secuencias, tales como por ejemplo el de Staden (*Nucleic Acids Research* 14, 217-232(1986)), el de Marck (*Nucleic Acids Research* 16, 1829-1836 (1988)) o el programa GCG de Butler (*Methods of Biochemical Analysis* 39, 74-97 (1998)).

- 30 Se ha encontrado la nueva secuencia de ADN de *C. glutamicum* que codifica el gen *metD* y que, como SEC ID No. 1, es un constituyente de la presente invención. La secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente se ha derivado además a partir de la presente secuencia de ADN mediante los métodos descritos anteriormente. La secuencia de aminoácidos resultante del producto del gen *metD* se muestra en SEC ID No. 2. Se sabe que las enzimas endógenas en el hospedante pueden separar el aminoácido N-terminal metionina o formilmetionina de la proteína formada.
- 35

Las secuencias de ADN codificantes que resultan de SEC ID No. 1 mediante la degeneración del código genético también son un constituyente de la invención. De la misma manera, las secuencias de ADN que se hibridan con SEC ID No. 1 o partes de SEC ID No. 1 son un constituyente de la invención. Los intercambios de aminoácidos conservativos, tales como, por ejemplo, intercambio de glicina por alanina o de ácido aspártico por ácido glutámico en proteínas, son conocidos además entre los expertos como "mutaciones sentido", que no conducen a un cambio fundamental en la actividad de la proteína, es decir, son de función neutra. Tales mutaciones también son denominadas, entre otros, sustituciones neutras. Se sabe además que los cambios en los términos N y/o C de una proteína no pueden alterar sustancialmente o pueden incluso estabilizar la función de la misma. La información en este contexto puede ser encontrada por el experto, entre otros, en Ben-Bassat et al. (*Journal of Bacteriology* 169:751-757 (1987)), en O'Regan et al. (*Gene* 77:237-251 (1989)), en Sahin-Toth et al. (*Protein Sciences* 3:240-247 (1994)), en Hochuli et al. (*Bio/Technology* 6:1321-1325 (1988)) y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular. Las secuencias de aminoácidos que dan como resultado una manera correspondiente a partir de SEC ID No. 2 también son un constituyente de la invención.

40

45

De la misma manera, las secuencias de ADN que se hibridan con SEC ID No. 1 o partes de SEC ID No. 1 son un constituyente de la invención. Finalmente, las secuencias de ADN que se preparan mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que resultan de SEC ID No. 1 son un constituyente de la invención. Tales oligonucleótidos tienen típicamente una longitud de al menos 15 nucleótidos.

50

Las instrucciones para identificar secuencias de ADN por medio de hibridación pueden ser encontradas por el experto, entre otros, en el libro de texto "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993) y en Liebl et al. (*International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 255-260 (1991)). La hibridación tiene lugar en condiciones restrictivas, es decir, sólo se forman híbridos en los que la

55

sonda y la secuencia diana, es decir, los polinucleótidos tratados con la sonda, son al menos 70% idénticos. Se sabe que la restricción de la hibridación, incluyendo las etapas de lavado, está influida o determinada variando la composición del tampón, la temperatura y la concentración de sal. La reacción de hibridación se lleva a cabo preferiblemente en una restricción relativamente baja en comparación con las etapas de lavado (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Para la reacción de hibridación se puede emplear, por ejemplo, un tampón 5x SSC a una temperatura de aprox. 50°C-68°C. Las sondas también se pueden hibridar aquí con polinucleótidos que son menos de 70% idénticos a la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables, y se eliminan por lavado en condiciones restrictivas. Esto se puede lograr, por ejemplo, reduciendo la concentración de sal hasta 2x SSC, y opcionalmente de forma subsiguiente 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania, 1995), estableciéndose una temperatura de aprox. 50°C-68°C. Opcionalmente es posible reducir la concentración de sal hasta 0,1x SSC. Los fragmentos polinucleotídicos que son, por ejemplo, al menos 70%, o al menos 80%, o al menos 90% a 95%, o al menos 96% a 99% idénticos a la secuencia de la sonda empleada, se pueden aislar incrementando la temperatura de hibridación por etapas desde 50°C hasta 68°C en etapas de aprox. 1-2°C. También es posible aislar fragmentos polinucleotídicos que son completamente idénticos a la secuencia de la sonda empleada. Instrucciones adicionales sobre la hibridación se pueden obtener en el mercado en forma de los denominados kits (por ejemplo DIG Easy Hyb de Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Número de Catálogo 1603558).

Las instrucciones para la amplificación de secuencias de ADN con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden ser encontradas por el experto, entre otros, en el manual de Gait: Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) y en Newton y Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994).

Se ha encontrado que las bacterias corineformes producen aminoácidos de manera mejorada después de la atenuación del gen metD.

Para lograr una atenuación, se puede reducir o eliminar la expresión del gen metD o las propiedades reguladoras de la proteína enzimática. Opcionalmente, las dos medidas se pueden combinar.

La reducción en la expresión génica puede tener lugar mediante cultivo adecuado o mediante modificación genética (mutación) de las estructuras señales de la expresión génica. Las estructuras de las señales de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión a ribosoma, el codón de partida, y terminadores. El experto puede encontrar información sobre esto, por ejemplo, en la solicitud de patente WO 96/15246, en Boyd y Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), en Voskuil y Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), en Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), en Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)), Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999)), y en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik [Genética Molecular]", 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995) o el de Winnacker ("Gene und Klone [Genes y Clones]", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990).

Las mutaciones que conducen a un cambio o reducción en las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas son conocidas de la técnica anterior; los ejemplos que se pueden mencionar son los estudios de Qiu y Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) y Möckel ("Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms [Threonine dehydratase from Corynebacterium glutamicum: Canceling the allosteric regulation and structure of the enzyme]", Informes del Jülich Research Center, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Alemania, 1994). Se pueden encontrar descripciones de resumen en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, el de Hagemann ("Allgemeine Genetik [Genética General]", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Las mutaciones posibles son transiciones, transversiones, inserciones y supresiones. Dependiendo del efecto del intercambio de aminoácidos sobre la actividad enzimática, se hace referencia a "mutaciones de pérdida de sentido" o "mutaciones sin sentido". Las inserciones o supresiones de al menos un par de bases (pb) en un gen conducen a mutaciones de desplazamiento del marco, como resultado de lo cual se incorporan aminoácidos incorrectos o la traducción se interrumpe prematuramente. Las supresiones de varios codones conducen típicamente a una pérdida total de la actividad enzimática. Las instrucciones para generar tales mutaciones están en la técnica anterior, y se pueden encontrar en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tal como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik [Genética Molecular]", 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995) o el de Winnacker ("Gene und Klone [Genes y Clones]", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990), o el de Hagemann ("Allgemeine Genetik [Genética General]", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Un método habitual para mutar genes de *C. glutamicum* es el método de la "interrupción génica" y "sustitución génica", descrito por Schwarzer y Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)).

En el método de la interrupción génica, una parte central de la región codificante del gen de interés se clona en un vector plasmídico que se puede replicar en un hospedante (típicamente *E. coli*), pero no en *C. glutamicum*. Los posibles vectores son, por ejemplo, pSUP301 (Simon et al., *Bio/Technology* 1, 784-791 (1983)), pK18mob o pK19mob (Schäfer et al., *Gene* 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB o pK19mobsacB (Jäger et al., *Journal of Bacteriology* 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). *Journal of Biological Chemistry* 269:32678-84; patente US 5.487.993), pCR@Blunt (Invitrogen, Groningen, Holanda; Bernard et al., *Journal of Molecular Biology*, 234: 534-541 (1993)) o pEM1 (Schrumpf et al, 1991, *Journal of Bacteriology* 173:4510-4516). El vector plasmídico que contiene la parte central de la región codificante del gen se transfiere entonces a la cepa deseada de *C. glutamicum* mediante conjugación o transformación. El método de conjugación es descrito, por ejemplo, por Schafer et al. (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 756-759 (1994)). Los métodos para la transformación son descritos, por ejemplo, por Thierbach et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 29, 356-362 (1988)), Dunican y Shivnan (*Bio/Technology* 7, 1067-1070 (1989)) y Tauch et al. (*FEMS Microbiological Letters* 123, 343-347 (1994)). Tras la recombinación homóloga por medio de un suceso de "intercambio de material", la región codificante del gen en cuestión es interrumpida por la secuencia del vector, y se obtienen dos alelos incompletos, uno que carece del extremo 3' y uno que carece del extremo 5'. Este método se ha usado, por ejemplo, por Fitzpatrick et al. (*Applied Microbiology and Biotechnology* 42, 575-580 (1994)) para eliminar el gen *recA* de *C. glutamicum*.

En el método de "sustitución génica", se establece *in vitro* en el gen de interés una mutación, tal como, por ejemplo, una supresión, una inserción o un intercambio de bases. El alelo preparado se clona a su vez en un vector que no es replicativo para *C. glutamicum*, y éste se transfiere entonces al hospedante deseado de *C. glutamicum* mediante transformación o conjugación. Después de la recombinación homóloga por medio de un primer suceso de "intercambio de material", que efectúa la integración, y un segundo suceso de "intercambio de material" adecuado, que efectúa la escisión en el gen diana o en la secuencia diana, se logra la incorporación de la mutación o del alelo. Este método fue usado, por ejemplo, por Peters-Wendisch et al. (*Microbiology* 144, 915 – 927 (1998)) para eliminar el gen *pyc* de *C. glutamicum* mediante una supresión.

De esta manera, se puede incorporar en el gen *metD* una supresión, inserción o un intercambio de bases.

Además, puede ser ventajoso para la producción de L-aminoácidos potenciar, en particular sobreexpresar, una o más enzimas de la ruta de biosíntesis particular, de glucólisis, de anaplerosis, del ciclo de ácido cítrico, del ciclo de fosfato de pentosa, de la exportación de aminoácidos y opcionalmente proteínas reguladoras, además de la atenuación del gen *metD*.

El término "potenciación", a este respecto, describe el incremento en la actividad intracelular de una o más enzimas (proteínas) en un microorganismo que son codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo incrementando el número de copias del gen o de los genes o alelos, usando un promotor potente o usando un gen o alelo que codifica una enzima (proteína) correspondiente que tiene una actividad elevada, y opcionalmente combinando estas medidas.

Mediante las medidas de potenciación, en particular sobreexpresión, en general la actividad o concentración de la proteína correspondiente se incrementa en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, hasta un máximo de 1000% o 2000%, basado en la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o la actividad del microorganismo de partida.

En general se prefiere el uso de genes endógenos. La expresión "genes endógenos" o "secuencias nucleotídicas endógenas" se entiende que significan los genes o secuencias nucleotídicas presentes en la población de una especie.

De este modo, para la preparación de L-aminoácidos, además de la atenuación del gen *metD*, se pueden potenciar, en particular sobreexpresar, al mismo tiempo uno o más de los genes escogidos del grupo que consiste en

- 45 • el gen *gap*, que codifica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174:6076-6086),
- el gen *tpi*, que codifica triosa fosfato isomerasa (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174:6076-6086),
- el gen *pgk*, que codifica 3-fosfoglicerato cinasa (Eikmanns (1992), *Journal of Bacteriology* 174:6076-6086),
- el gen *zwf*, que codifica glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (documentos JP-A-09224661, WO 01/70995),
- 50 • el gen *pyc*, que codifica piruvato carboxilasa (documento EP-A-1083225),
- el gen *lysC*, que codifica una aspartato cinasa resistente a retroalimentación (Número de Acceso P26512; documentos EP-B-0387527; EPA-0699759; WO 00/63388),

- el gen hom, que codifica homoserina deshidrogenasa (documento EP-A 0131171),
 - el gen metA, que codifica homoserina O-acetiltransferasa (Número de ACCESO AF052652),
 - el gen metB, que codifica cistationina gamma-sintasa (Número de ACCESO AF126953),
 - el gen aecD, que codifica cistatinonina gamma-liasa (Número de ACCESO M89931),
- 5
- el gen metY, que codifica O-acetilhomoserina sulfhidrilasa (documento DE 10043334, DSM 13556),
 - el gen glyA, que codifica serina hidroximetiltransferasa (documento JP-A-08107788)

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de aminoácidos, además de la atenuación del gen metD, atenuar, en particular reducir su expresión, al mismo tiempo uno o más de los genes escogidos del grupo que consiste en

- 10
- el gen pck, que codifica fosfoenoil piruvato carboxicinas (documento EP-A-1094111),
 - el gen pgi, que codifica glucosa 6-fosfato isomerasa (documentos EP-A-1087015, WO 01/07626),
 - el gen poxB, que codifica piruvato oxidasa (documento EP-A-1096013),
 - el gen thrB, que codifica homoserina cinasa (Número de ACCESO P08210),
 - el gen thrC, que codifica treonina sintasa (Número de ACCESO P23669),
- 15
- el gen metK, que codifica metionina adenosiltransferasa (Número de ACCESO AJ290443),
 - el gen ddh, que codifica mesodiaminopimelato D-deshidrogenasa (Número de ACCESO Y00151).

Además de la atenuación del gen metD, adicionalmente puede ser ventajoso para la producción de aminoácidos eliminar reacciones secundarias indeseables (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", en: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, Londres, UK, 1982).

- 20
- La invención también proporciona los microorganismos preparados según la invención, y estos se pueden cultivar de forma continua o discontinua en el proceso por lotes (cultivo por lotes) o en el proceso de lote alimentado (proceso con alimentación), o proceso de lote alimentado repetido (proceso con alimentación repetitivo), con el fin de producir L-aminoácidos. En el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Bioprocess Technology 1. Introduction to Bioprocess Technology] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el
- 25
- libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Bioreactors and Peripheral Equipment] (Vieweg Verlag, Braunschweig/ Wiesbaden, 1994)) se describe un sumario de los métodos de cultivo conocidos.

El medio de cultivo a usar debe satisfacer de forma adecuada los requisitos de las cepas particulares. En el manual "Manual of Methods for General Bacteriology", publicado por la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) están contenidas las descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos.

- 30
- Como fuente de carbono, se pueden usar azúcares e hidratos de carbono, tales como, por ejemplo, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasas, almidón y celulosa, aceites y grasas, tales como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de nuez molida y aceite de coco, ácidos grasos tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como, por ejemplo, glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético. Estas sustancias se pueden usar individualmente o como mezclas.

- 35
- Como fuente de nitrógeno, se pueden usar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, licor de maíz fermentado, harina de haba de soja y urea, o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden usar individualmente o como mezclas.

- 40
- Como fuente de fósforo, se pueden usar ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico, o las sales correspondientes que contienen sodio. El medio de cultivo debe comprender además sales de metales, tales como, por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, se pueden emplear sustancias esenciales para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas, además de las sustancias mencionadas anteriormente. Además, se pueden añadir al medio de cultivo precursores adecuados. Las sustancias de partida mencionadas se pueden añadir al cultivo en forma de un solo lote, o se
- 45
- pueden alimentar de manera adecuada durante el cultivo.

Los compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico, se pueden emplear de manera adecuada para

controlar el pH del cultivo. Se pueden emplear antiespumantes, tales como, por ejemplo, ésteres poliglicólicos de ácidos grasos, para controlar la formación de espuma. Se pueden añadir al medio sustancias adecuadas que actúan selectivamente, tales como, por ejemplo, antibióticos, a fin de mantener la estabilidad de los plásmidos. A fin de mantener las condiciones aerobias, se hace pasar en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como, por ejemplo, aire. La temperatura del cultivo es normalmente 20°C a 45°C, y preferiblemente 25°C a 40°C. El cultivo se continúa hasta que se ha formado un máximo del producto deseado. Este objetivo se logra normalmente en 10 horas a 160 horas.

Los caldos de fermentación obtenidos de esta manera, en particular que contienen L-metionina, tienen habitualmente un peso seco de 7,5 a 25% en peso, y contienen L-metionina. Además, también es ventajoso si la fermentación se lleva a cabo en un procedimiento de azúcar limitada, al menos al final, pero en particular a lo largo de al menos 30% de la duración de la fermentación. Es decir, la concentración de azúcar utilizable en el medio de fermentación se reduce hasta ≥ 0 a 3 g/l durante este período.

El caldo de fermentación preparado de esta manera, en particular que contiene L-metionina, se procesa entonces posteriormente. Dependiendo de los requisitos, toda o parte de la biomasa se puede eliminar del caldo de fermentación por métodos de separación, tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación, o una combinación de los mismos, o se puede dejar completamente en aquél. Este caldo se espesa entonces o se concentra por métodos conocidos, tales como, por ejemplo, con la ayuda de un evaporador giratorio, un evaporador de película delgada, un evaporador de película descendente, mediante ósmosis inversa, o mediante nanofiltración. Este caldo de fermentación concentrado se puede tratar entonces mediante métodos de liofilización, secado por pulverización, granulación por pulverización, o mediante otros procedimientos, para dar un polvo finamente dividido, que fluye preferiblemente libre.

Este polvo finamente dividido, que fluye libre, se puede convertir entonces a su vez, mediante procesos de compactación o granulación adecuados, en un producto de grano grueso, que fluye fácilmente de manera libre, almacenable y mayoritariamente libre de polvo. En la granulación o compactación, es ventajoso emplear sustancias o vehículos auxiliares orgánicos o inorgánicos convencionales, tales como almidón, gelatina, derivados de celulosa, o sustancias similares, tales como los usados convencionalmente como aglutinantes, agentes gelificantes o espesantes en el procesamiento de alimentos o de piensos, u otras sustancias, tales como, por ejemplo, sílices, silicatos o estearatos.

“Que fluye libremente” quiere decir polvos que fluyen sin obstáculo fuera de la vasija con la abertura de 5 mm (milímetros) de una serie de vasijas de descarga de vidrio con aberturas de descarga de diversos tamaños (Klein, Seifen, Öle, Fette, Wachse 94, 12 (1968)).

Como se describe aquí, “finamente dividido” significa un polvo con un contenido predominante ($> 50\%$) con un tamaño de partículas de 20 a 200 μm de diámetro. “De grano grueso” significa productos con un contenido predominante ($> 50\%$) con un tamaño de partículas de 200 a 2000 μm de diámetro. En este contexto, “libre de polvo” significa que el producto contiene sólo pequeños contenidos ($< 5\%$) con tamaños de partículas menores que 20 μm de diámetro. La determinación del tamaño de partículas se puede llevar a cabo con métodos de espectrometría de difracción por láser. Los métodos correspondientes se describen en el libro de texto en “Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis” de R. H. Müller y R. Schuhmann, en el libro de texto “Introduction to Particle Technology” de M. Rhodes, Verlag Wiley & Sons (1998).

“Almacenable”, en el contexto de esta invención, significa un producto que se puede almacenar hasta 120 días, preferiblemente hasta 52 semanas, particularmente de forma preferible 60 meses, sin que se produzca una pérdida sustancial ($< 5\%$) de metionina.

Como alternativa, sin embargo, el producto se puede absorber sobre una sustancia soporte orgánica o inorgánica que es conocida y convencional en el procesamiento de piensos, tal como, por ejemplo, sílices, silicatos, sémolas, salvados, harinas, almidones, azúcares u otros, y/o se puede mezclar y estabilizar con espesantes o aglutinantes convencionales. En la bibliografía se describen ejemplos de uso y procesos en este contexto (Die Mühle + Mischfuttertechnik 132 (1995) 49, página 817).

Finalmente, el producto se puede llevar a un estado en el que es estable para la digestión por los estómagos de los animales, en particular el estómago de rumiantes, mediante procesos de revestimiento (“revestimiento”) que usan agentes formadores de películas, tales como, por ejemplo, carbonatos metálicos, sílices, silicatos, alginatos, estearatos, almidones, gomas y éteres de celulosa, como se describen en el documento DE-C-4100920.

Si la biomasa se separa durante el proceso, en general se eliminan otros sólidos inorgánicos, por ejemplo añadidos durante la fermentación. Además, el aditivo para piensos para animales según la invención comprende al menos la proporción predominante de las otras sustancias, en particular sustancias orgánicas, que se forman o se añaden y están presentes en disolución en el caldo de fermentación, en el que estos no se han separado mediante procesos adecuados.

En un aspecto de la invención, la biomasa se puede separar en un porcentaje hasta 70%, preferiblemente hasta 80%, preferiblemente hasta 90%, preferiblemente hasta 95%, y particularmente de forma preferible hasta 100%. En otro aspecto de la invención, se separa hasta 20% de la biomasa, preferiblemente hasta 15%, preferiblemente hasta 10%, preferiblemente hasta 5%, particularmente de forma preferible no se separa ninguna biomasa.

5 Estas sustancias orgánicas incluyen subproductos orgánicos que son producidos opcionalmente, además de la L-metionina, y descargados opcionalmente por los microorganismos empleados en la fermentación. Estos incluyen L-aminoácidos escogidos del grupo que consiste en L-valina, L-treonina, L-alanina o L-triptófano. Incluyen vitaminas escogidas del grupo que consiste en vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B5 (ácido pantoténico), vitamina B6 (piridoxina), vitamina B12 (cianocobalamina), ácido nicotínico/nicotinamida y vitamina E (tocoferol).
10 Además, incluyen ácidos orgánicos que pueden tener uno a tres grupos carboxilo, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico o ácido fumárico. Finalmente, también incluyen azúcares, tales como, por ejemplo, trehalosa. Estos compuestos se desean opcionalmente si mejoran el valor nutricional del producto.

15 Estas sustancias orgánicas, incluyendo L-metionina y/o D-metionina y/o la mezcla racémica D,L-metionina, también se pueden añadir, dependiendo de los requisitos, como un concentrado o sustancia pura en forma sólida o líquida durante una etapa del proceso adecuada. Estas sustancias orgánicas mencionadas se pueden añadir individualmente o como mezclas al caldo de fermentación resultante o concentrado, o también durante el proceso de secado o de granulación. Igualmente es posible añadir una sustancia orgánica o una mezcla de varias sustancias orgánicas al caldo de fermentación, y una sustancia orgánica adicional o una mezcla adicional de varias sustancias orgánicas durante una etapa posterior del proceso, por ejemplo la granulación.
20

El producto descrito anteriormente es adecuado como un aditivo para piensos, es decir, aditivo para piensos, para nutrición animal.

25 El contenido de L-metionina del aditivo para piensos para animales es convencionalmente 1% en peso a 80% en peso, preferiblemente 2% en peso a 80% en peso, particularmente de forma preferible 4% en peso a 80% en peso, y muy particularmente de forma preferible 8% en peso a 80% en peso, basado en el peso seco del aditivo para piensos para animales. Igualmente son posibles contenidos de 1% en peso a 60% en peso, 2% en peso a 60% en peso, 4% en peso a 60% en peso, 6% en peso a 60% en peso, 1% en peso a 40% en peso, 2% en peso a 40% en peso o 4% en peso a 40% en peso. El contenido de agua del aditivo para piensos es convencionalmente hasta 5% en peso, preferiblemente hasta 4% en peso, y particularmente de forma preferible menor que 2% en peso.

30 Un aditivo para piensos para animales según la presente invención puede comprender 1% en peso a 80% en peso de L-metionina, D-metionina, D,L-metionina, o una mezcla de los mismos, con 1 a 40% en peso de L-lisina, D-lisina o D,L-lisina, basado en el peso seco del aditivo para piensos para animales.

En consecuencia, la invención también proporciona un procedimiento para la preparación de un aditivo para piensos para animales que contiene L-metionina a partir de caldos de fermentación, que comprende las etapas de

35 a) cultivar y fermentar un microorganismo productor de L-metionina en un medio de fermentación;
b) eliminar agua del caldo de fermentación que contiene L-metionina (concentración);
c) eliminar una cantidad de 0 a 100% en peso de la biomasa formada durante la fermentación; y
d) secar el caldo de fermentación obtenido según a) y/o b), para obtener el aditivo para piensos para animales en la forma de polvo o gránulo deseada.

40 Si se desea, adicionalmente, en el procedimiento según la invención se pueden llevar a cabo una o más de las siguientes etapas:

e) añadir una o más sustancias orgánicas, incluyendo L-metionina y/o D-metionina y/o la mezcla racémica D,L-metionina, a los productos obtenidos según a), b) y/o c);
45 f) añadir sustancias auxiliares escogidas del grupo que consiste en sílices, silicatos, estearatos, sémolas y salvado, a las sustancias obtenidas según a) a d) para la estabilización y para incrementar la capacidad de almacenamiento; o
g) convertir las sustancias obtenidas según a) a e) en una forma estable para el estómago del animal, en particular el rumen, revistiéndolas con agentes formadores de películas.

50 El análisis de L-metionina se puede llevar a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico con derivatización subsiguiente con ninhidrina, como se describe por Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190).

Los métodos para la determinación de L-aminoácidos son conocidos de la técnica anterior. De este modo, el análisis

se puede llevar a cabo, por ejemplo, como se describe por Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) mediante cromatografía de intercambio aniónico con derivatización subsiguiente con ninhidrina, o se puede llevar a cabo mediante HPLC de fase inversa, por ejemplo como se describe por Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

- 5 El procedimiento según la invención se usa para la preparación fermentativa de aminoácidos.

La presente invención se explica con más detalle en lo siguiente con la ayuda de ejemplos de realizaciones.

10 El aislamiento de ADN plasmídico a partir de Escherichia coli, y todas las técnicas de restricción, tratamiento con fosfatasa alcalina y Klenow se llevaron a cabo mediante el método de Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA). En este manual también se describen los métodos para la transformación de Escherichia coli.

La composición de los medios nutrientes habituales, tales como el medio LB o TY, también se puede encontrar en el manual de Sambrook et al.

Ejemplo 1

Preparación de genoteca cosmiática genómica a partir de C. glutamicum ATCC 13032

15 Se aisló ADN cromosómico a partir de C. glutamicum ATCC 13032 como se describe por Tauch et al. (1995, Plasmid 33:168-179), y se escindió parcialmente con la enzima de restricción Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto Sau3AI, número de Código 27-0913-02). Los fragmentos de ADN se desfosforilaron con fosfatasa alcalina de gamba (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania, Descripción del Producto SAP, número de código 1758250). El ADN del vector cosmiático SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), obtenido de Stratagene (La Jolla, USA, Descripción del Producto Kit del Vector Cosmiático Supercos1, número de Código 251301), se escindió con la enzima de restricción XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del Producto XbaI, número de Código 27-0948-02), e igualmente se desfosforiló con fosfatasa alcalina de gamba.

25 El ADN cosmiático se escindió entonces con la enzima de restricción BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del producto BamHI, N° de código 27-0868-04). El ADN cosmiático tratado de esta manera se mezcló con el ADN de ATCC 13032 tratado, y el lote se trató con la T4 ADN ligasa (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del producto T4-DNA-Ligase, N° de código 27-0870-04). La mezcla de ligación se empaquetó entonces en fagos con ayuda del Extracto de Empaquetamiento Gigapack II XL (Stratagene, La Jolla, USA, Descripción del producto Gigapack II XL Packing Extract, N° de código 200217).

30 Para la infección de la cepa NM554 de E. coli (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Research 16:1563-1575), las células se recogieron en MgSO₄ 10 mM y se mezclaron con una parte alícuota de la suspensión fágica. La infección y la titulación de la librería cosmiática se llevaron a cabo como se describe por Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), sembrándose las células en placas sobre agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 mg/l de ampicilina. Después de incubar durante la noche a 37°C, se seleccionaron clones
35 individuales recombinantes.

Ejemplo 2

Aislamiento y secuenciación del gen metD

40 El ADN cosmiático de una colonia individual se aisló con el kit Qiaprep Spin Miniprep Kit (N° de producto 27106, Qiagen, Hilden, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se escindió parcialmente con la enzima de restricción Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del producto Sau3AI, N° de producto 27-0913-02). Los fragmentos de ADN se desfosforilaron con una fosfatasa alcalina de gamba (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Descripción del producto SAP, N° de producto 1758250). Después de la separación mediante electroforesis en gel, los fragmentos de cósmidos en el intervalo de tamaños de 1.500 a 2.000 pb se aislaron con el kit de extracción en gel QiaExII Gel Extraction Kit (N° de producto 20021, Qiagen, Hilden, Alemania).

45 El ADN del vector de secuenciación pZero-1, obtenido de Invitrogen (Groningen, Holanda, Descripción del producto Zero Background Cloning Kit, N° de producto K2500-01), se escindió con la enzima de restricción BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Alemania, Descripción del producto BamHI, N° de producto 27-0868-04). La ligación de los fragmentos cosmiáticos en el vector de secuenciación pZero-1 se lleva a cabo tal como se describe por Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor), incubándose la mezcla de ADN durante la noche con la ligasa de T4 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Alemania). Esta mezcla de ligación se electroporó entonces
50 (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) en la cepa de E. coli DH5 α mcr (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 87:4645-4649) y se sembró en placas sobre agar LB (Lennox, 1955, Virology, 1:190) con 50 mg/l de zeocina.

- La preparación plasmídica de los clones recombinantes se llevó a cabo con un Biorobot 9600 (Nº de producto 900200, Qiagen, Hilden, Alemania). La secuenciación se lleva a cabo de acuerdo con el método de parada de cadena dideoxi de Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, USA, 74:5463-5467), con modificaciones según Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Se usó el kit de secuenciación "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" de PE Applied Biosystems (Nº de producto 403044, Weiterstadt, Alemania). La separación mediante electroforesis en gel y el análisis de la reacción de secuenciación se llevaron a cabo en un gel de "Rotiphoresis NF Acrylamide/Bisacrylamide" (29:1) (Nº de producto A124.1, Roth, Karlsruhe, Alemania), con el secuenciador "ABI Prism 377" de PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Alemania).
- Los datos de secuencias en bruto obtenidos se procesaron entonces usando el paquete de programas de Staden (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231), versión 97-0. Las secuencias individuales de los derivados de pZerol se ensamblaron a un contig continuo. El análisis de la región codificante asistido por ordenador se prepara con el programa XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231). Se llevan a cabo análisis adicionales con los programas de búsqueda "BLAST" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402) frente al banco de datos no redundante del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA).

La secuencia nucleotídica resultante se muestra en SEQ ID No. 1. El análisis de la secuencia nucleotídica muestra un marco de lectura abierto de 711 pb, que se denomina el gen metD. El gen metD codifica un polipéptido de 236 aminoácidos.

- Las secciones de ADN que se encuentran en dirección 5' y en dirección 3' de SEC ID No. 1 se identificaron de la misma manera, mostrándose estas secciones en SEC ID No. 3 y SEC ID No. 4. La región del gen metD extendida mediante SEC ID No. 3 y SEC ID No. 4 se muestra en SEC ID No. 5.

Ejemplo 3

Incorporación de una supresión en el gen metD

- Para esto, se aísla ADN cromosómico de la cepa ATCC13032 mediante el método de Tauch et al. (Plasmid 33: 168-179 (1995)). Basándose en la secuencia del gen metD conocida para *C. glutamicum* del ejemplo 2, se escogen los oligonucleótidos descritos más abajo para la generación del alelo de supresión de metD por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el método de corte y empalme génico por extensión del solapamiento (Horton, Molecular Biotechnology 3: 93-98 (1995)).

Cebador metD-DelA (véase también SEC ID No. 6):

- 5' -GAT CTA AAG CTT-GCC TCT CCA ATC TCC ACT GA -3'

Cebador metD-DelB (véase también SEC ID No. 7):

**5' -ATT GAG TAG TCC GCA GGT GG-ATT TAA AT-AAT CCA CAG GCA
AGT CTA GC -3'**

Cebador metD-DelC (véase también SEC ID No. 8):

**5' -GCT AGA CTT GCC TGT GGA TT-ATT TAA AT-CCA CCT GCG GAC
TAC TCA AT -3'**

- 35 Cebador metD-DelD (véase también SEC ID No. 9):

5'-GAT CTA AAG CTT-GAT GTC CAT GTA CCG CAG C -3'

Los cebadores mostrados se sintetizaron por MWG Biotech (Ebersberg, Alemania), y la reacción de PCR se llevó a cabo usando Pfu polimerasa (Stratagene, Número de Producto 600135, La Jolla, USA) y un termociclador PTC 100 (MJ Research Inc., Waltham, USA).

- Los cebadores metD-DelA y metD-DelD contienen en cada caso un sitio de escisión insertado para la enzima de restricción HindIII, y los cebadores metD-DelB y metD-DelC un sitio de escisión insertado para la enzima de restricción SwaI, que están marcados subrayándolos en la secuencia nucleotídica mostrada anteriormente.

- El cebador metD-DelB está compuesto de dos regiones de la secuencia nucleotídica, una de las cuales se enlaza en la secuencia codificante de metD a los nucleótidos 707 a 688, y la otra se enlaza a la región en dirección 5' en frente del codón de partida de metD. Ambas regiones están divididas por el sitio insertado de la enzima de restricción

Swal. El cebador metD-DelC es complementario inverso al cebador metD-DelB.

5 Con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa, los cebadores metD-DelA y metD-DelB permiten la amplificación de un fragmento de ADN de 573 pb, y los cebadores metD-DelC y metD-DelD permiten la amplificación de un fragmento de ADN de 651 pb. Los amplificados se examinan mediante electroforesis en gel de agarosa

10 El producto amplificado se examina subsiguientemente en gel de agarosa al 0,8%.

Ejemplo 4

4.1 Construcción del vector de intercambio pK18mobsacBmetDdel

15 El derivado de supresión de metD obtenido en el ejemplo 3 se escindió con la endonucleasa de restricción HindIII, tras un examen en un gel de agarosa al 0,8% se aisló del gel de agarosa con el kit High Pure PCR Product purification Kit (Número de Producto 1732676, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), y se usó para la ligación con el vector de clonación movilizable pK18mobsacB descrito por Schäfer et al., Gene, 14, 69-73 (1994). El vector pK18mobsacB se escindió de antemano con la enzima de restricción HindIII y se desfosforiló subsiguientemente con fosfatasa alcalina de gamba (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Descripción del Producto SAP, Número de Producto 1758250). El vector preparado se mezcló con el derivado de supresión de metD y se trató con T4 ADN ligasa (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Alemania).

20 La cepa DH5 α mcr de E. coli (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87: 4645-4649) se electroporó entonces con el lote de ligación (Hanahan, en DNA cloning. A practical approach. Vol. 1. ILR Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). La selección de las células que poseen el plásmido se realiza cultivando en placas el lote de transformación sobre agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), que se ha suplementado con 25 mg/l de canamicina.

25 El ADN plasmídico se aísla de un transformante con la ayuda del kit QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen, y se verificó cortándolo con las enzimas de restricción HindIII y Swal. El plásmido se denomina pK18mobsacBmetDdel, y se muestra en la figura 1. La cepa se denomina DH5 α mcr/pK18mobsacBmetDdel de E. coli.

4.2 Mutagénesis de supresión del gen metD en la cepa ATCC13032 de C. glutamicum

30 El vector pK18mobsacBmetDdel mencionado en el ejemplo 4.1 se electropora mediante el método de electroporación de Tauch et al., (1989 FEMS Microbiology Letters 123: 343-347) en la cepa C. glutamicum ATCC13032. El vector no se puede replicar independientemente en ATCC13032, y sólo se retiene en la célula si se ha integrado en el cromosoma. La selección de clones con pK18mobsacmetDdel integrado se lleva a cabo sembrando en placas el lote de la electroporación sobre agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), que se ha suplementado con 15 mg/l de canamicina. Los clones que crecieron se sembraron en placas de agar LB con 25 mg/l de canamicina, y se incubaron durante 16 horas a 33°C.

40 Para lograr la escisión del plásmido junto con la copia cromosómica completa del gen metD, los clones se incuban toda la noche de forma no selectiva en medio LB, y después se cultivan sobre agar LB con 10% de sacarosa. El plásmido pK18mobsacB contiene una copia del gen sacB, que convierte sacarosa en levano de sacarosa, que es tóxico para C. glutamicum. Por lo tanto, sólo aquellos clones en los que nuevamente se ha cortado el pK18mobsacBmetDdel integrado crecen sobre agar LB con sacarosa. En la escisión, junto con el plásmido, se puede cortar la copia cromosómica completa del gen metD, o el derivado de supresión de metD.

45 Para demostrar que el gen metD está suprimido en el cromosoma, el plásmido pK18mobsacBmetDdel se marca mediante el método de "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania, 1993), usando el kit de hibridación DIG de Boehringer. Se aísla ADN cromosómico de un mutante de supresión potencial mediante el método de Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)), y en cada caso se escinde con las enzimas de restricción HindIII y Swal, en lotes separados. Los fragmentos formados se separan mediante electroforesis en gel de agarosa, y se hibridan a 68°C con el kit de hibridación Dig de Boehringer. Con la ayuda de los fragmentos formados, se puede demostrar que la cepa ATCC13032 ha perdido su copia del gen metD, y en su lugar porta el alelo suprimido.

50 La cepa se denomina C. glutamicum ATCC13032AmetD.

Ejemplo 5

Producción de metionina

La cepa ATCC13032AmetD de *C. glutamicum* obtenida en el ejemplo 4 se cultiva en un medio nutriente adecuado para la producción de metionina, y se determina el contenido de metionina en el sobrenadante del cultivo.

- 5 Para esto, en primer lugar se incuba la cepa en una placa de agar de cerebro-corazón durante 24 horas a 33°C. Partiendo de este cultivo en placa de agar, se siembra un precultivo (10 ml de medio en un matraz cónico de 100 ml). El medio MM se usa como el medio para el precultivo.

Medio MM

CSL (licor de maceración de maíz)	5 g/l
MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico)	20 g/l
Glucosa (sometida a autoclave por separado)	50 g/l
Sales:	
(NH ₄) ₂ SO ₄	25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,1 g/l
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	1,0 g/l
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg/l
MnSO ₄ * H ₂ O	5,0 mg/l
Biotina (filtrada en condiciones estériles)	0,01 mg/l
Vitamina B12 (filtrada en condiciones estériles)	0,02 mg/l
Tiamina * HCl (filtrada en condiciones estériles)	0,2 mg/l
CaCO ₃	25 g/l

- 10 El CSL (licor de maceración de maíz), el MOPS y la disolución de sal se ajustaron a pH 7 con amoníaco acuoso, y se sometieron a autoclave. Después, se añaden las disoluciones estériles del sustrato y de vitaminas, así como el CaCO₃ sometido a autoclave en seco.

El precultivo se incuba durante 16 horas a 33°C a 240 rpm en un agitador. Se siembra un cultivo principal a partir de este precultivo, de forma que la OD (660 nm) inicial del cultivo principal fue 0,1. El medio MM también se usó para el cultivo principal.

- 15 El cultivo se lleva a cabo en un volumen de 10 ml en un matraz cónico de 100 ml provisto de obstáculos. El cultivo se llevó a cabo a 33°C y con una humedad del aire de 80 %.

- 20 Después de 72 horas, la OD se determinó a una longitud de onda de medición de 660 nm con un aparato Biomek 1000 (de Beckmann Instruments GmbH, Munich). La cantidad de metionina formada se determinó con un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania), mediante una cromatografía de intercambio iónico y mediante derivatización posterior en columna con detección por ninhidrina.

En la Tabla 1 se muestra el resultado del experimento.

Tabla 1

Cepa	OD (660 nm)	Metionina mg/l
ATCC13032	12,2	3
ATCC13032 Δ metD	14,8	20

Breve Descripción de la Figura:

Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacBmetDdel

5 Las abreviaturas y designaciones usadas tienen el siguiente significado:

oriv	origen similar a ColE1 procedente de pMB1
sacB	gen sacB que codifica la proteína levansacarasa
Kmr	Resistencia a canamicina
HindIII	Sitio de escisión de la enzima de restricción HindIII
10 Swal	Sitio de escisión de la enzima de restricción Swal
RP4mob	Sitio de movilización RP4
metDdel	Derivado de supresión clonado para metD

Listado de Secuencias

- <110> Degussa AG
- 5 <120> Secuencias nucleotídicas que codifican el gen METD
- <130>010191 BT
- <160>11
- 10 <170> PatentIn version 3.1
- <210>1
- <211> 1322
- 15 <212> ADN
- <213> Corynebacterium glutamicum
- <220>
- <221> CDS
- 20 <222> (314)..(1021)
- <223> gen metD
- <400> 1

```

agattaaagg cactgatgct cagcaaggaa ttttgctgaa catagtcgtc ggtattatcg      60
gtggtttggt aggcggctgg ctgcttgaa tcttcggagt ggatgtgcc ggtggcggct      120
tgatcttcag cttcatcaca tgtctgattg gtgctgtcat tttgctgacg atcgtgcagt      180
tcttcactcg gaagaagtaa tctgctttaa atccgtaggg cctggtgata tttcgatatc      240
aacaggcctt ttggtcattt tggggtgaa aaagcgctag acttgctgtt ggattaaaac      300
tatacgaacc ggt ttg tct ata ttg gtg tta gac agt tcg tcg tat ctt      349
                Met Ser Ile Leu Val Leu Asp Ser Ser Ser Tyr Leu
                1             5             10

gaa aca gac caa ccc gaa agg acg tgg ccg aac gtg gct gct agc gct'      397
Glu Thr Asp Gln Pro Glu Arg Thr Trp Pro Asn Val Ala Ala Ser Ala
                15             20             25

tca ggc aag agt aaa aca agt gcc ggg gca aac cgt cgt cgc aat cga      445
Ser Gly Lys Ser Lys Thr Ser Ala Gly Ala Asn Arg Arg Arg Asn Arg
                30             35             40

cca agc ccc cga cag cgt ctc ctc gat agc gca acc aac ctt ttc acc      493
Pro Ser Pro Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ser Ala Thr Asn Leu Phe Thr
                45             50             55             60

aca gaa ggt att cgc gtc atc ggt att gat cgt atc ctc cgt gaa gct      541
Thr Glu Gly Ile Arg Val Ile Gly Ile Asp Arg Ile Leu Arg Glu Ala
                65             70             75

gac gtg gcg aag gcg agc ctc tat tcc ctt ttc gga tcg aag gac gcc      589
Asp Val Ala Lys Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Gly Ser Lys Asp Ala
                80             85             90

ttg gtt att gca tac ctg gag aac ctc gat cag ctg tgg cgt gaa gcg      637
Leu Val Ile Ala Tyr Leu Glu Asn Leu Asp Gln Leu Trp Arg Glu Ala
                95             100             105

```

tgg cgt gag cgc acc gtc ggt atg aag gat ccg gaa gat aaa atc atc Trp Arg Glu Arg Thr Val Gly Met Lys Asp Pro Glu Asp Lys Ile Ile 110 115 120	685
gcg ttc ttt gat cag tgc att gag gaa gaa cca gaa aaa gat ttc cgc Ala Phe Phe Asp Gln Cys Ile Glu Glu Glu Pro Glu Lys Asp Phe Arg 125 130 135 140	733
ggc tcg cac ttt cag aat gcg gct agt gag tac cct cgc ccc gaa act Gly Ser His Phe Gln Asn Ala Ala Ser Glu Tyr Pro Arg Pro Glu Thr 145 150 155	781
gat agc gaa aag ggc att gtt gca gca gtg tta gag cac cgc gag tgg Asp Ser Glu Lys Gly Ile Val Ala Ala Val Leu Glu His Arg Glu Trp 160 165 170	829
tgt cat aag act ctg act gat ttg ctc act gag aag aac ggc tac cca Cys His Lys Thr Leu Thr Asp Leu Leu Thr Glu Lys Asn Gly Tyr Pro 175 180 185	877
ggc acc acc cag gcg aat cag ctg ttg gtg ttc ctt gat ggt gga ctt Gly Thr Thr Gln Ala Asn Gln Leu Leu Val Phe Leu Asp Gly Gly Leu 190 195 200	925
gct gga tct cga ttg gtc cac aac atc agt cct ctt gag acg gct cgc Ala Gly Ser Arg Leu Val His Asn Ile Ser Pro Leu Glu Thr Ala Arg 205 210 215 220	973
gat ttg gct cgg cag ttg ttg tcg gct cca cct gcg gac tac tca att Asp Leu Ala Arg Gln Leu Leu Ser Ala Pro Pro Ala Asp Tyr Ser Ile 225 230 235	1021
tagttttcttc attttccgaa ggggtatctt cgttggggga ggcgctcgata agccccttct	1081
ttttagcttt aacctcagcg cgacgctgct ttaagcgctg catggcggcg cggttcattt	1141
cacgttgctg ttcgcgcctc ttgttcgcga tttctttgcg ggcctgtttt gcttcgttga	1201
tttcggcagt acgggttttg gtgagttcca cgtttggtgc gtgaagcgtt gaggcgttcc	1261
atggggtgag aatcatcagg gcgcggtttt tgcgctcgtg ccacaggaag atgcgctttt	1321
c	1322

<210>2

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2

Met Ser Ile Leu Val Leu Asp Ser Ser Ser Tyr Leu Glu Thr Asp Gln
 1 5 10 15
 Pro Glu Arg Thr Trp Pro Asn Val Ala Ala Ser Ala Ser Gly Lys Ser
 20 25 30
 Lys Thr Ser Ala Gly Ala Asn Arg Arg Arg Asn Arg Pro Ser Pro Arg
 35 40 45
 Gln Arg Leu Leu Asp Ser Ala Thr Asn Leu Phe Thr Thr Glu Gly Ile
 50 55 60
 Arg Val Ile Gly Ile Asp Arg Ile Leu Arg Glu Ala Asp Val Ala Lys
 65 70 75 80
 Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Gly Ser Lys Asp Ala Leu Val Ile Ala
 85 90 95
 Tyr Leu Glu Asn Leu Asp Gln Leu Trp Arg Glu Ala Trp Arg Glu Arg
 100 105 110
 Thr Val Gly Met Lys Asp Pro Glu Asp Lys Ile Ile Ala Phe Phe Asp
 115 120 125
 Gln Cys Ile Glu Glu Glu Pro Glu Lys Asp Phe Arg Gly Ser His Phe
 130 135 140
 Gln Asn Ala Ala Ser Glu Tyr Pro Arg Pro Glu Thr Asp Ser Glu Lys
 145 150 155 160
 Gly Ile Val Ala Ala Val Leu Glu His Arg Glu Trp Cys His Lys Thr
 165 170 175
 Leu Thr Asp Leu Leu Thr Glu Lys Asn Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Gln
 180 185 190
 Ala Asn Gln Leu Leu Val Phe Leu Asp Gly Gly Leu Ala Gly Ser Arg
 195 200 205
 Leu Val His Asn Ile Ser Pro Leu Glu Thr Ala Arg Asp Leu Ala Arg
 210 215 220
 Gln Leu Leu Ser Ala Pro Pro Ala Asp Tyr Ser Ile
 225 230 235

<210>3

5 <211> 239

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

10 <221> misc_feature

<223> upstream-Bereich

<400> 3

```

gcctctccaa tctccactga ggtacttaat ccttccgggg aattcggggcg cttaaatacga    60
gaaattaggc catcaccttt taataacaat acaatgaata attggaatag gtogacacct    120
ttggagcggg gccggttaaa attggcagca ttcaccgaaa gaaaaggaga accacatgct    180
tgccttaggt tggattacat ggatcattat tgggtgtcta gctggttgga ttgcctcca    239
    
```

5 <210>4
 <211> 289
 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> downstream-Bereich

<400> 4

```

tttttgtttt gcgcggtaga tgcgcgctg ctctaggtgg tgcactttga aatcgtcggg    60
aagtgggtat ttgcgttcca aatgaccat catgatgatt gtttggagga gcgtccacag    120
gttgttgctg acccaataga gtgcgattgc tgtggggaat ggtcctgtga ggccaaggga    180
cagtgggaag atcggcgoga ggatcgacat cacgatcatg aacttcagca tgcogttaga    240
gaatccggat gcgtaatcgt tggtttgaa gctgcggtac atggacatc    289
    
```

20 <210>5
 <211> 1850
 <212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 25 <222> (553)..(1260)

<223> gen metD

<400> 5

gcctctccaa tctccactga ggtacttaat ccttccgggg aattcgggcg cttaaactga	60
gaaattaggc catcaccttt taataacaat acaatgaata attggaatag gtcgacacct	120
ttggagcggg gccgggtaaa attggcagca ttcaccgaaa gaaaaggaga accacatgct	180
tgccctaggt tggattacat ggatcattat tgggtgtcta gctggttggg ttgcctccaa	240
gattaaaggc actgatgctc agcaaggaat tttgctgaac atagtcgctcg gtattatcgg	300
tggtttgta ggcggctggc tgcttgggaat cttcggagtg gatggtgccg gtggcggctt	360
gatcttcagc ttcacacat gtctgattgg tgctgtcatt ttgctgacga tcgtgcagtt	420
cttcaactcg aagaagtaat ctgctttaa tccgtagggc ctggtgatat ttcgatata	480
acaggccttt tggtcatttt ggggtggaaa aagcgctaga cttgcctgtg gattaaact	540
atacgaaccg gt ttg tct ata ttg gtg tta gac agt tcg tcg tat ctt gaa	591
Met Ser Ile Leu Val Leu Asp Ser Ser Ser Tyr Leu Glu	
1 5 10	
aca gac caa ccc gaa agg acg tgg ccg aac gtg gct gct agc gct tca	639
Thr Asp Gln Pro Glu Arg Thr Trp Pro Asn Val Ala Ala Ser Ala Ser	
15 20 25	
ggc aag agt aaa aca agt gcc ggg gca aac cgt cgt cgc aat cga cca	687
Gly Lys Ser Lys Thr Ser Ala Gly Ala Asn Arg Arg Arg Asn Arg Pro	
30 35 40 45	
agc ccc cga cag cgt ctc ctc gat agc gca acc aac ctt ttc acc aca	735
Ser Pro Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ser Ala Thr Asn Leu Phe Thr Thr	
50 55 60	
gaa ggt att cgc gtc atc ggt att gat cgt atc ctc cgt gaa gct gac	783
Glu Gly Ile Arg Val Ile Gly Ile Asp Arg Ile Leu Arg Glu Ala Asp	
65 70 75	
gtg gcg aag gcg agc ctc tat tcc ctt ttc gga tcg aag gac gcc ttg	831
Val Ala Lys Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Gly Ser Lys Asp Ala Leu	
80 85 90	

```

gtt att gca tac ctg gag aac ctc gat cag ctg tgg cgt gaa gcg tgg      879
Val Ile Ala Tyr Leu Glu Asn Leu Asp Gln Leu Trp Arg Glu Ala Trp
   95                               100                               105

cgt gag cgc acc gtc ggt atg aag gat ccg gaa gat aaa atc atc gcg      927
Arg Glu Arg Thr Val Gly Met Lys Asp Pro Glu Asp Lys Ile Ile Ala
  110                               115                               120                               125

ttc ttt gat cag tgc att gag gaa gaa cca gaa aaa gat ttc cgc ggc      975
Phe Phe Asp Gln Cys Ile Glu Glu Glu Pro Glu Lys Asp Phe Arg Gly
                               130                               135                               140

tcg cac ttt cag aat gcg gct agt gag tac cct cgc ccc gaa act gat      1023
Ser His Phe Gln Asn Ala Ala Ser Glu Tyr Pro Arg Pro Glu Thr Asp
                               145                               150                               155

agc gaa aag ggc att gtt gca gca gtg tta gag cac cgc gag tgg tgt      1071
Ser Glu Lys Gly Ile Val Ala Ala Val Leu Glu His Arg Glu Trp Cys
                               160                               165                               170

cat aag act ctg act gat ttg ctc act gag aag aac ggc tac cca ggc      1119
His Lys Thr Leu Thr Asp Leu Leu Thr Glu Lys Asn Gly Tyr Pro Gly
   175                               180                               185

acc acc cag gcg aat cag ctg ttg gtg ttc ctt gat ggt gga ctt gct      1167
Thr Thr Gln Ala Asn Gln Leu Leu Val Phe Leu Asp Gly Gly Leu Ala
  190                               195                               200                               205

gga tct cga ttg gtc cac aac atc agt cct ctt gag acg gct cgc gat      1215
Gly Ser Arg Leu Val His Asn Ile Ser Pro Leu Glu Thr Ala Arg Asp
                               210                               215                               220

ttg gct cgg cag ttg ttg tcg gct cca cct gcg gac tac tca att      1260
Leu Ala Arg Gln Leu Leu Ser Ala Pro Pro Ala Asp Tyr Ser Ile
                               225                               230                               235

tagtttcttc attttccgaa ggggtatctt cgttggggga ggcgtcgata agccccttct  1320

ttttagcttt aacctcagcg cgacgctgct ttaagcgtg catggcggcg cggttcattt  1380

cacgttgctt ttcgcgcctc ttgttcgca tttctttgog ggcctgtttt gcttcgttga  1440

tttcggcagt acgggttttg gtgagttcca cgtttgttgc gtgaagcgtt gaggcgttcc  1500

atggggtgag aatcatcagg gcgcggtttt tgcgtcgtgt ccacaggaag atgcgctttt  1560

ctttttgttt tgcgcggtag atgtcgcgct gctctagggtg gtgcactttg aaatcgtcgg  1620

taagtgggta tttgcgttcc aaaatgacca tcatgatgat tgtttggagg agcgtccaca  1680

ggttgttgct gaccaatag agtgcgattg ctgtggggaa tggtcctgtg aggccaaggg  1740

acagtgggaa gatcggcgcg aggatcgaca tcacgatcat gaacttcagc atgccgttag  1800

agaatccgga tgcgtaatcg ttggtttggga agctgcggta catggacatc      1850

```

<210>6

<211> 236

5 <212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 6

```

Met Ser Ile Leu Val Leu Asp Ser Ser Ser Tyr Leu Glu Thr Asp Gln
1          5          10          15
Pro Glu Arg Thr Trp Pro Asn Val Ala Ala Ser Ala Ser Gly Lys Ser
20          25          30
Lys Thr Ser Ala Gly Ala Asn Arg Arg Arg Asn Arg Pro Ser Pro Arg
35          40          45
Gln Arg Leu Leu Asp Ser Ala Thr Asn Leu Phe Thr Thr Glu Gly Ile
50          55          60
Arg Val Ile Gly Ile Asp Arg Ile Leu Arg Glu Ala Asp Val Ala Lys
65          70          75          80
Ala Ser Leu Tyr Ser Leu Phe Gly Ser Lys Asp Ala Leu Val Ile Ala
85          90          95
Tyr Leu Glu Asn Leu Asp Gln Leu Trp Arg Glu Ala Trp Arg Glu Arg
100         105         110
Thr Val Gly Met Lys Asp Pro Glu Asp Lys Ile Ile Ala Phe Phe Asp
115         120         125
Gln Cys Ile Glu Glu Glu Pro Glu Lys Asp Phe Arg Gly Ser His Phe
130         135         140
Gln Asn Ala Ala Ser Glu Tyr Pro Arg Pro Glu Thr Asp Ser Glu Lys
145         150         155         160
Gly Ile Val Ala Ala Val Leu Glu His Arg Glu Trp Cys His Lys Thr
165         170         175
Leu Thr Asp Leu Leu Thr Glu Lys Asn Gly Tyr Pro Gly Thr Thr Gln
180         185         190
Ala Asn Gln Leu Leu Val Phe Leu Asp Gly Gly Leu Ala Gly Ser Arg
195         200         205
Leu Val His Asn Ile Ser Pro Leu Glu Thr Ala Arg Asp Leu Ala Arg
210         215         220
Gln Leu Leu Ser Ala Pro Pro Ala Asp Tyr Ser Ile
225         230         235

```

5 <210>7

<211>32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<221> misc_feature
 <223> Cebador metD-DelA

 <400> 7
 5 gatctaaagc ttgctctcc aatctccact ga 32

 <210>8
 <211>48
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador metD-DelB
 15

 <400> 8
 attgagtagt cgcaggtgg atttaaataa tccacaggca agtctagc 48

 <210>9
 20 <211>48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 25 <221> misc_feature
 <223> Cebador metD-DelC

 <400> 9
 30 gctagacttg cctgtggatt atttaaatcc acctgaggac tactcaat 48

 <210>10
 <211>31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>

<221> misc_feature

<223> Cebador metD-DelD

5 <400> 10

gatctaaagc ttgatgtcca tgtaccgcag c

31

<210>11

<211> 1177

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1177)

15 <223> Producto de la PCR: derivado de supresión de metD

<400> 11

gatctaaagc ttgcctctcc aatctccact gaggtactta atccttccgg ggaattcggg	60
cgcttaaadc gagaaattag gccatcacct ttaataaca atacaatgaa taattggaat	120
aggtcgacac ctttgagcgg gagccgggta aaattggcag cattcaccca aagaaaagga	180
gaaccacatg cttgccctag gttggattac atggatcatt attggtggtc tagctggtg	240
gattgcctcc aagattaaag gcactgatgc tcagcaagga attttctga acatagtcgt	300
cggtattatc ggtggtttgt taggcggctg gctgcttggg atcttcggag tggatgtgc	360
cggtggcggc ttgatcttca gcttcacac atgtctgatt ggtgctgtca ttttctgac	420
gatcgtgcag ttcttcactc ggaagaagta atctgcttta aatccgtagg gcctgttgat	480

ES 2 363 332 T3

atttcgatat caacaggcct tttggtcatt ttggggtgga aaaagcgcta gacttgctg	540
tggattattht aaatccacct ggggactact caatttagtt tcttcatttht ccgaaggggt	600
atcttcggtg ggggaggcgt cgataagccc cttctthttht gctthtaacct cagcgcgacg	660
ctgctthtaag cgtgcatgg cggcgcggtt catttcacgt tgcgthtcgc gcctcttgtt	720
cgcgatttht ttgcgggcct gthttgcttc gttgatttcg gcagtacggg thttggtgag	780
thccacgtht gttgcgtgaa gcgttgaggc gthccatggg gtgagaatca tcagggcgcg	840
gthtttgctg cgtgtccaca ggaagatgcg cthttcttht tgthttgcgc ggtagatgtc	900
gcgctgctct aggtggtgca cthtgaaatc gtcggtaagt gggthttgc gthccaaaat	960
gaccatcatg atgattgtht ggaggagcgt ccacaggtht ttgctgacct aatagagtht	1020
gattgctgtg gggaatggtc ctgtgaggcc aaggacagtht gggagatcg gcgcgaggat	1080
cgacatcacg atcatgaact tcagcatgcc gthtagagaat ccggatgcgt aatcgttggtht	1140
ttggaagctg cgttacatgg acatcaagct thtagatc	1177

REIVINDICACIONES

1. Bacteria corineforme en la que se atenúa el gen metD, en la que el gen metD comprende un polinucleótido que
- a) es idéntico en un grado de al menos 70% a un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 2, o
- 5 b) codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un grado de al menos 70% a la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 2,
- y el polipéptido tiene actividad reguladora de la transcripción
- en la que la atenuación se logra
- usando un promotor débil,
- 10 - usando un alelo que codifica una proteína con baja actividad, o
- inactivando el gen.
2. Bacteria corineforme según la reivindicación 1, en la que se elimina el gen metD.
3. Bacteria corineforme según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el polinucleótido es un ADN que es capaz de una replicación, que comprende
- 15 (i) la secuencia nucleotídica mostrada en SEC ID No. 1, o
- (ii) al menos una secuencia que corresponde a la secuencia (i) dentro del intervalo de la degeneración del código genético, o
- (iii) al menos una secuencia que se hibrida con la secuencia complementaria a las secuencia (i) o (ii) bajo una restricción que corresponde como máximo a 2x SSC, y opcionalmente
- 20 (iv) mutaciones sentido de función neutra en (i).
4. Bacteria corineforme según la reivindicación 1, en la que dicho polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID No. 2.
5. Bacterias corineformes según las reivindicaciones 1 a 4, en las que dicha inactivación se logra mediante un vector que tiene al menos 15 nucleótidos sucesivos de la secuencia mostrada en SEC ID No. 1.
- 25 6. Bacterias corineformes según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, en las que dichas bacterias son de la especie *Corynebacterium glutamicum*.
7. Procedimiento para la preparación de L-aminoácidos, en el que se llevan a cabo las siguientes etapas:
- a) fermentar las bacterias corineformes según una de las reivindicaciones 1 a 6 que producen el L-aminoácido deseado;
- 30 b) concentrar el L-aminoácido en el medio o en las células de las bacterias, y
- c) aislar el L-aminoácido.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el L-aminoácido es L-metionina.
9. Un procedimiento para la preparación de un aditivo para piensos para animales que contiene L-metionina a partir de caldos de fermentación, que comprende las etapas
- 35 a) cultivar y fermentar un microorganismo productor de L-metionina según las reivindicaciones 1 a 6 en un medio de fermentación;
- b) eliminar agua del caldo de fermentación que contiene L-metionina (concentración);
- c) eliminar una cantidad de 0 a 100% en peso de la biomasa formada durante la fermentación; y
- 40 d) secar el caldo de fermentación obtenido según b) y/o c), para obtener el aditivo para piensos para animales en la forma de polvo o gránulo deseada.
10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que adicionalmente se lleva o se llevan a cabo una o más de

las siguientes etapas:

- e) añadir una o más sustancias orgánicas, incluyendo L-metionina y/o D-metionina y/o la mezcla racémica D,L-metionina, a los productos obtenidos según b), c) y/o d);
 - f) añadir sustancias auxiliares escogidas del grupo que consiste en sílices, silicatos, estearatos, sémolas y salvado, a las sustancias obtenidas según b) a e), para la estabilización y para incrementar la capacidad de almacenamiento; o
 - g) convertir las sustancias obtenidas según b) a f) en una forma estable para el estómago del animal, en particular el rumen, revistiéndolas con agentes formadores de películas.
11. Un procedimiento según las reivindicaciones 9 ó 10, en el que se elimina hasta 100% de la biomasa.
- 10 12. Un procedimiento según la reivindicación 9 ó 10, en el que el contenido de agua es hasta 5% en peso.
13. Un procedimiento según las reivindicaciones 10, 11 ó 12, en el que los agentes formadores de películas son carbonatos metálicos, sílices, silicatos, alginatos, estearatos, almidones, gomas o éteres de celulosa.

Figura 1: Mapa del plásmido pK18mobsacBmetDdel

