

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 226**

51 Int. Cl.:
C12P 13/08 (2006.01)
C12P 13/12 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C07K 14/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10151138 .4**
96 Fecha de presentación: **11.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **2218789**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.08.2010**

54 Título: **Procedimiento para la producción de L-metionina usando bacterias corineformes**

30 Prioridad:
18.03.2004 DE 102004013503

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2012

73 Titular/es:
Evonik Degussa GmbH
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es:
Bathe, Brigitte;
Schischka, Natalie y
Pfefferle, Walter

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 382 226 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

Procedimiento para la producción de L-metionina usando bacterias corineformes

La invención proporciona un procedimiento para la producción de L-metionina, usando bacterias corineformes en las que el gen *arsR* se ha atenuado, especialmente excluido. El gen mencionado codifica una proteína del grupo de los reguladores de la transcripción.

TÉCNICA ANTERIOR

Los compuestos químicos, por medio de lo cual se quiere decir especialmente L-aminoácidos, vitaminas, nucleósidos y nucleótidos y D-aminoácidos, se usan en medicina humana, en la industria farmacéutica, en cosméticos, en la industria alimentaria y en piensos para animales.

Muchos de estos compuestos se producen mediante fermentación de cepas de bacterias corineformes, especialmente *Corynebacterium glutamicum*. Debido a su gran importancia, se ha llevado a cabo constantemente un trabajo para mejorar los procedimientos de producción. Las mejoras a los procedimientos pueden estar relacionadas con medidas referidas a la fermentación, tales como, por ejemplo, agitación y suministro de oxígeno, o la composición del medio nutriente, tal como, por ejemplo, la concentración de azúcar durante la fermentación, o el procesamiento hasta la forma de producto, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico o las propiedades de comportamiento intrínsecas del propio microorganismo.

Para mejorar las propiedades de comportamiento de tales microorganismos, se usan métodos de mutagénesis, selección, y selección de mutantes. Estos métodos producen cepas que son resistentes a antimetabolitos, tales como, por ejemplo, el análogo de lisina S-(2-aminoetil)-cisteína, o los análogos de metionina α -metil-metionina, etionina, norleucina, N-acetilnorleucina, S-trifluorometilhomocisteína, ácido 2-amino-5-heptenoico, seleno-metionina, metioninsulfoxamina, metoxina, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, o que son auxotróficos para metabolitos que son importantes en términos de regulación, y que producen L-aminoácidos.

Durante varios años también se ha empleado la tecnología de ADN recombinante para mejorar la cepa de cepas productoras de L-aminoácidos de *Corynebacterium glutamicum*, amplificando genes de la biosíntesis de aminoácidos individuales y estudiando el efecto sobre la producción del L-aminoácido.

El documento WO02/097096 describe un procedimiento para producir preferiblemente L-metionina mediante fermentación de bacterias corineformes, en el que el gen regulador de la transcripción *metD* está atenuado, y el documento WO 02/18596 describe un procedimiento para producir preferiblemente L-lisina, en el que el gen regulador de la transcripción *citB* está atenuado.

OBJETO DE LA INVENCION

Se ha marcado como objetivo proporcionar nuevas bases para procedimientos mejorados para la producción de L-metionina mediante fermentación usando bacterias corineformes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Cualquier mención de L-aminoácidos o aminoácidos aquí más abajo significa el aminoácido proteinogénico L-metionina, incluyendo sus sales.

Por aminoácidos proteinogénicos se entiende los aminoácidos que aparecen en proteínas naturales, esto es, en proteínas de microorganismos, plantas, animales y seres humanos. Sirven como unidades estructurales para las proteínas, en las que están enlazados entre sí mediante enlaces peptídicos.

Cualquier mención de L-lisina o lisina aquí más abajo significa no sólo las bases, sino también las sales, tales como, por ejemplo, monohidrocloreto de lisina o sulfato de lisina.

Cualquier mención de L-metionina o metionina aquí más abajo significa también las sales, tales como, por ejemplo, hidrocloreto de metionina o sulfato de metionina.

La invención proporciona un procedimiento para la producción de L-metionina usando bacterias corineformes que, en particular, ya producen L-aminoácidos, y en las cuales el gen *arsR*, que tiene la secuencia de SEC ID NO: 500 del documento EP1108790 (=

```
ATGACCTCCGTTATCCCATCCAGCGCAGACAGTGCCACAGAGCAGCGCTTCGCGCCGCTAAAATCCGTAC
CCAGCAGGATCACGGACATCGCCGAAGAGGCCAGCGATTTCTACAAGGCACTCGGTGACACCACCCGCT
AGAAATCTTGTACCTGATTTTCACTACAAAAGCTCGCGGGTGAGCGCGAATGCCCTGGCACACACTC
AATATTTCCGCCCCACGGTGACCCACCATATGAAAAGCTCATCGCAGCTAATTTGGTCAACCGTGAAC
AATGCGGAAAGTGGGCGTATTTTCAGCATTAATTCGGCTCATATTGATACGGTTGCTGAAATTTTCGCCA
CGCGTCC)
```

que codifica el regulador de la transcripción ArsR, están atenuado, especialmente excluido, o está expresado a un nivel más bajo.

Esta invención proporciona además un procedimiento para la producción de L-metionina, en el que se llevan a cabo las siguientes etapas:

- 5 (a) fermentar bacterias corineformes productoras de L-metionina, en el que el gen arsR está atenuado, especialmente excluido, o está expresado a un nivel más bajo,
- (b) concentrar el L-aminoácido en el medio o en las células de la bacteria, y
- (c) aislar el L-aminoácido deseado, permaneciendo opcionalmente porciones (> 0 a 100%) o la totalidad de los constituyentes del licor de fermentación y/o de la biomasa en el producto final.

10 Las bacterias corineformes usadas preferiblemente ya producen el L-aminoácido L-metionina antes de atenuar el gen arsR.

Se ha encontrado que las bacterias corineformes producen L-metionina de manera mejorada después de la atenuación del gen arsR.

El producto génico del gen arsR que se va a atenuar pertenece al grupo de los reguladores de la transcripción.

15 Los reguladores de la transcripción son aquellas proteínas que son capaces de unirse a ADN por medio de una estructura proteica específica, denominada el motivo de hélice-vuelta-hélice, y de este modo pueden potenciar o atenuar la transcripción de otros genes. La atenuación del regulador de la transcripción mencionado mejora la producción de L-metionina en las bacterias corineformes correspondientes.

20 Las secuencias nucleotídicas de los genes de *Corynebacterium glutamicum* mencionados forman parte de la técnica anterior, y se pueden encontrar en diversas solicitudes de patentes y también del banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA).

gen smtB:

Nombre: Represor de la transcripción SmtB

25 Función: Represor, dependiente de metales, de la expresión del gen smtA que codifica una metalotioneína, regulación de la respuesta celular a diversos metales pesados, familia de ArsR

Referencias: Secuencias nº 3056 y nº 7068 del documento EP1108790; secuencia nº 559 del documento WO 01/00805

Nº de acceso: AX123140, AX127152 y AX066977

30 gen cgl1:

Nombre: Regulador de la transcripción Cgl1

Función: Regulador de la transcripción de la familia GntR

Referencias: Secuencias nº 3251 y nº 7069 del documento EP1108790

Nº de acceso: AX123335 y AX127153

35 gen hspR:

Nombre: Proteína reguladora del choque térmico HspR

Función: Se une en la región promotora en dirección 5' del gen dnaK que codifica una chaperona

Referencias: Secuencias nº 3073 y nº 7068 del documento EP1108790

Nº de acceso: AX123157 y AX127152

40 gen cgl2:

Nombre: Regulador de la transcripción Cgl2

Función: Regulador de la transcripción de la familia TetR

Referencias: Secuencias nº 1700 y nº 7064 del documento EP1108790

ES 2 382 226 T3

Nº de acceso: AX121784 y AX127148

gen cebR:

Nombre: Regulador de la transcripción CebR

Función: Regulación de la captación de celobiosa y celotriosa

Referencias: secuencias nº 2889 y nº 7068 del documento EP1108790

Nº de acceso: AX122973 y AX127152

gen cgl3:

Nombre: Regulador de la transcripción Cgl3

Función: Regulador de la transcripción de la familia TetR

Referencias: secuencias nº 3379 y nº 7069 del documento EP1108790

Nº de acceso: AX123463 y AX127153

gen gatR:

Nombre: Regulador de la transcripción GatR

Función: Represor del operón Gat para la captación y utilización de galacticol

Referencias: secuencias nº 129 y nº 1 del documento EP1108790
secuencia nº 195 del documento WO 01/00844

Nº de acceso: AX12 0213, AX120085 y AX065069

gen glcR:

Nombre: Regulador de la transcripción GlcR

Función: Regulador de la transcripción de la familia DeoR

Referencias: secuencias nº 123 y nº 1 del documento EP1108790

Nº de acceso: AX120207 y AX120085

gen tcmR:

Nombre: Represor de la transcripción TcmR

Función: Regulación de resistencia a tetracenicina y exportación, familia TetR

Referencias: secuencias nº 424 y nº 7060 del documento EP1108790; las bases 506 a 606 de la región codificante están en cada caso contenidas en las secuencias 247 y 249 del documento WO 01/00804

Nº de acceso: AX120508 y AX127144; AX066343 y AX066345

gen smtB2:

Nombre: Represor de la transcripción SmtB2

Función: Represor dependiente de metales de la expresión del gen smtA que codifica un metalotioneína, regulación de la respuesta celular a diversos metales pesados, familia ArsR

Referencias: secuencias nº 292 y nº 1 del documento EP1108790, secuencia nº 119 del documento WO 01/00804

Nº de acceso: AX120376, AX120085 y AX066215

gen dtxR:

ES 2 382 226 T3

Nombre:	Represor de la toxina de la difteria
Función:	Represor que se une a hierro de la expresión del gen de la toxina de la difteria
Referencias:	Oguiza et al., Journal of Bacteriology 177(2), 465-467 (1995)
Nº de acceso:	L35906
gen degA:	
Nombre:	Regulador de la degradación DegA
Función:	Implicado en el control de la inactivación y degradación de enzimas, familia LacI
Referencias:	secuencias nº 2240 y nº 7966 del documento EP1108790, secuencia nº 337 del documento WO 01/00844
Nº de acceso:	AX122324, AX127150 y AX065211
gen galR:	
Nombre:	Represor del operón de galactosa
Función:	Represor inducible por galactosa del operón de galactosa
Referencias:	secuencias nº 2309 y nº 7066 del documento EP1108790, secuencia nº 383 del documento WO 01/00844
Nº de acceso:	AX122 393, AX127150 y AX065257
gen tipA2:	
Nombre:	Regulador de la transcripción TipA2
Función:	Regulador de la transcripción de la familia MerR
Referencias:	secuencias nº 2349 y nº 7066 del documento EP1108790
Nº de acceso:	AX122433 y AX127150
gen mall:	
Nombre:	Represor del regulón de maltosa
Función:	Inducible por maltosa, familia LacI
Referencias:	Del documento EP1108790: nucleótidos 149 a 601 en la secuencia nº 2724, nucleótidos 1 a 346 en la secuencia nº 2725, nucleótidos 539 a 1080 en la secuencia nº 2727 y en toda la región codificante en la secuencia nº 7067
Nº de acceso:	AX122808, AX122809, AX122811 y AX127151
gen cgl4:	
Nombre:	Regulador de la transcripción Cgl4
Referencias:	secuencia nº 972, nº 7061 y nº 7062 del documento EP1108790, nucleótidos 205 a 309 en la secuencia nº 617 del documento WO 01/00805
Nº de acceso:	AX121056, AX127145, AX127146 y AX067035
gen arsR:	
Nombre:	Regulador de la transcripción ArsR
Función:	Regulación y expresión del operón de resistencia al arsénico
Referencias:	secuencia nº 500 y nº 7060 del documento EP1108790
Nº de acceso:	AX12 0584 y AX127144

ES 2 382 226 T3

gen merR:

Nombre: Regulador del operón de resistencia al mercurio
Función: media la inducción, dependiente del mercurio, del operón de resistencia al mercurio, familia MerR
Referencias: secuencia nº 1009 y nº 7062 del documento EP1108790
Nº de acceso: AX12 714 6 y AX121093

gen hrcA:

Nombre: represor de la transcripción HrcA
Función: represor de la transcripción inducible por calor de proteínas del choque térmico, familia HrcA
Referencias: secuencia nº 2513, nº 7066 y nº 7067 del documento EP1108790
Nº de acceso: AX127150, AX127150 y AX127151

gen glpR2:

Nombre: represor del regulón de glicerol-3-fosfato
Función: regulación de los genes del metabolismo del glicerol, familia DeoR
Referencias: secuencia nº 2123 y nº 7065 del documento EP1108790, nucleótidos 881 a 981 en la secuencia nº 57 del documento WO 01/00845
Nº de acceso: AX122207, AX127149 y AX064931

lexA:

Nombre: Represor del regulón SOS LexA (EC No. 3.4.21.88)
Función: media la expresión, inducida por SOS, de las proteínas de reparación del ADN, familia de peptidasas S24
Referencias: secuencia nº 2119 y nº 7065 del documento EP1108790
Nº de acceso: AX1222 03 y AX127149

ccpA3:

Nombre: Proteína de control del catabolito CcpA3
Función: Implicada en la represión de genes que degradan hidratos de carbono y en la regulación positiva de genes para la excreción de carbono en exceso, familia LacI
Referencias: Secuencia nº 200 y nº 1 del documento EP1108790
Nº de acceso: AX120284 y AX120085

degA2:

Nombre: Regulador de la degradación DegA2
Función: Implicado en controlar la inactivación y degradación de enzimas, familia LacI
Referencias: secuencia nº 191 y nº 1 del documento EP11087 90
Nº de acceso: AX120275 y AX120085

Las secuencias descritas en las referencias indicadas y que codifican el gen arsR se pueden usar según la invención. Además, es posible usar alelos del gen mencionado, que resultan de la degeneración del código genético o mediante mutaciones de sentido funcionalmente neutras.

5 En las reivindicaciones se pueden encontrar realizaciones preferidas.

El término “atenuación” o “atenuar” describe en este contexto la reducción o exclusión de la actividad intracelular de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo, que están codificadas por el ADN correspondiente, por ejemplo usando un promotor débil o usando un gen o alelo que codifica una enzima correspondiente con una menor actividad, o inactivando el gen o enzima o proteína correspondiente, y combinando estas medidas.

5 Mediante las medidas de atenuación, la actividad o concentración de las proteínas correspondientes se reducen en general desde 0 hasta 75%, 0 hasta 50%, 0 hasta 25%, 0 hasta 10% ó 0 hasta 5% de la actividad o concentración de la proteína de tipo salvaje, o la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

10 La reducción de la concentración de proteína se puede demostrar mediante una separación en gel de proteína mono- y bidimensional y una identificación óptica subsiguiente de la concentración proteica usando un software de evaluación correspondiente en el gel. Un método común para la preparación de geles de proteínas en el caso de bacterias corineformes y para la identificación de las proteínas es el procedimiento descrito en Hermann et al. (Electrophoresis, 22:1712-23 (2001)). La concentración de proteína se puede analizar igualmente mediante hibridación por transferencia Western usando un anticuerpo específico para la proteína a demostrar (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, (1989)) y la
15 evaluación óptica subsiguiente usando el software apropiado para la determinación de la concentración (Lohaus y Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich, Angewandte Chemie 111: 2630-2647 (1999)). La actividad de las proteínas que se unen a ADN se puede medir por medio de ensayos de desplazamiento de bandas de ADN (también denominado como retardo de gel), como se describe, por ejemplo, en el libro de texto “Bioanalytik” (Lottspeich/Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Alemania, 1998) y usado por Wilson et al. (J. Bacteriol. 183: 2151-2155 (2001)). El efecto de las proteínas de unión a ADN sobre la expresión de otros genes se puede demostrar mediante diversos métodos bien descritos del ensayo de gen informador (Sambrook et al., Molecular Cloning; a Laboratory Manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

25 Los microorganismos proporcionados por la presente invención son capaces de producir aminoácidos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, molasas, almidón, celulosa, o a partir de glicerol y etanol. Son representantes de bacterias corineformes, especialmente del género *Corynebacterium*. En el caso del género *Corynebacterium*, se ha de hacer mención particular a la especie *Corynebacterium glutamicum*, que es conocida por los expertos en la técnica por su capacidad para producir L-aminoácidos.

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

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

35 *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 y

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

40 y mutantes productores de L-aminoácidos y cepas producidas de ellos, tales como, por ejemplo, la cepa productora de L-metionina

Corynebacterium glutamicum ATCC21608

45 Las cepas con la denominación “ATCC” se pueden obtener de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Las cepas con la designación “FERM” se pueden obtener del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japón). La cepa de *Corynebacterium thermoaminogenes* mencionada (FERM BP-1539) se describe en la patente US-A-5.250.434.

Para obtener una atenuación, se puede reducir o excluir la expresión de los genes o las propiedades de los productos génicos. Opcionalmente, las dos medidas se pueden combinar.

50 La expresión génica se puede disminuir llevando a cabo el cultivo de manera adecuada, o mediante alteración genética (mutación) de las estructuras de señal de la expresión génica. Las estructuras de señal de la expresión génica son, por ejemplo, genes represores, genes activadores, operadores, promotores, atenuadores, sitios de unión al ribosoma, el codón de partida y terminadores. La persona experta en la técnica puede encontrar información sobre esto, por ejemplo, en la solicitud de patente WO 96/15246, en Boyd y Murphy (Journal of Bacteriology 170:

5949-5952 (1988), en Voskuil y Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3584-3590 (1998), en Pátek et al (Microbiology 142: 1297-309 (1996), y Journal of Biotechnology 104: 311-323 (2003)) y en libros de textos conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, el libro de texto de Knippers ("Molekulare Genetik", 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), o el de Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania (1990)).

Un ejemplo de la regulación diana de la expresión génica es la clonación del gen que se va a atenuar, bajo el control de un promotor inducible mediante adición de cantidades medidas de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido), tal como, por ejemplo, el promotor trc o el promotor tac. Para este fin son adecuados los vectores tales como, por ejemplo, el vector de expresión de Escherichia coli pXK99E (documento WO 0226787; depositado según el tratado de Budapest el 31 de julio de 2001 como DH5alpha/pXK99E como DSM14440 en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) o pVWEx2 (Wendisch, tesis doctoral, Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-3397, ISSN 0994-2952, julio, Alemania (1997)), que permiten la expresión dependiente de IPTG del gen clonado en Corynebacterium glutamicum.

Este método se ha usado, por ejemplo, en la memoria de patente WO0226787 para la expresión regulada del gen deaD mediante integración del vector pXK99EdeaD en el genoma de Corynebacterium glutamicum, y por Simic et al. (Applied and Environmental Microbiology 68: 3321-3327 (2002)) para la expresión regulada del gen glyA mediante integración del vector pK18mobglyA' en Corynebacterium glutamicum.

Un método adicional para reducir específicamente la expresión génica es la tecnología antisentido, en la que se introducen vectores u oligodesoxinucleótidos cortos en las células diana para la síntesis de ARN antisentido más largo. Allí, el ARN antisentido se puede unir a secciones complementarias de ARNm específicos y reducir su estabilidad o bloquear su capacidad translocadora. La persona experta en la técnica encontrará un ejemplo que se refiera a esto en Srivastava et al. (Applied Environmental Microbiology, Oct 2000; 66 (10): 4366-4371).

Las mutaciones que conducen a un cambio en o disminución de las propiedades catalíticas de proteínas enzimáticas son conocidas para el estado de la técnica; los ejemplos que se pueden mencionar incluyen los trabajos 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", Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Alemania, 1994). Los sumarios se pueden encontrar en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, aquellos en Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Como mutaciones, se tienen en cuenta las transiciones, transversiones, inserciones y supresiones. Dependiendo del efecto de la sustitución de aminoácidos sobre la actividad enzimática, se usan las expresiones mutaciones de pérdida de sentido o mutaciones sin sentido. Las inserciones o supresiones de al menos un par de bases en un gen conducen a mutaciones de desplazamiento del marco, como resultado de lo cual se incorporan aminoácidos incorrectos o se termina prematuramente la traducción. Las supresiones de varios codones conducen típicamente a una pérdida completa de la actividad enzimática. Las instrucciones para la producción de tales mutaciones forman parte del estado de la técnica, y se pueden encontrar en libros de texto conocidos de genética y biología molecular, tales como, por ejemplo, el libro de textos de Knippers ("Molekulare Genetik", 6ª edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania, 1995), o el de Winnacker ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania, 1990), o el de Hagemann ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986).

Un método común 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, por ejemplo, una porción central de la región codificante del gen en cuestión se clona en un vector plasmídico, el cual se puede replicar en un hospedante (típicamente E. coli), pero no en C. glutamicum. Los vectores adecuados son, por ejemplo, pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob, pK19mob, pk18mobsacB o pK19mobsacB (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), 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, Países Bajos; 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 porción central de la región codificante del gen, se transfiere entonces mediante conjugación o transformación a la cepa de C. glutamicum deseada. El método de conjugación se describe, por ejemplo, en Schäfer et al. (Journal of Bacteriology 172: 1663-1666 (1990) y Applied and Environmental Microbiology 60: 756-759 (1994)). Los métodos de transformación se describen, por ejemplo, en 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 entrecruzamiento, la región codificante del gen en cuestión es interrumpida por la secuencia del vector, y se obtienen dos alelos incompletos, que carecen de los extremos 3' y 5', respectivamente. Este método se ha usado, por ejemplo, por Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) para excluir el gen recA de C. glutamicum.

En el método de sustitución génica, se produce *in vitro* una mutación, tal como, por ejemplo, una supresión, inserción o sustitución de bases, en el gen en cuestión. El alelo que se produce se clona a su vez en un vector no replicativo para *C. glutamicum*, y este último se transfiere entonces al hospedante deseado de *C. glutamicum*. Tras la recombinación homóloga por medio de un primer suceso de entrecruzamiento que efectúa una integración y por medio de un segundo suceso de entrecruzamiento adecuado que efectúa una escisión en el gen diana o en la secuencia diana, se logra la incorporación de la mutación o del alelo. Este método se describe en Scharzer y Pühler (Bio/Technology 9: 84-87 (1991), y se usó, por ejemplo, por Peters-Windisch et al. (Microbiology 144, 915-927 (1998)) para excluir el gen *pyc* de *C. glutamicum* mediante una supresión, o por Wehmeier et al. (Microbiology 144: 1853-1862 (1998)) para insertar una supresión en el gen *rel* de *C. glutamicum*.

Kirchner y Tauch (Journal of Biotechnology 104: 287-299 (2003)) proporcionan un resumen de diversos métodos de ingeniería genética en el caso de *C. glutamicum*.

De esta manera es posible incorporar una supresión, inserción o un intercambio de bases en el gen *arsR*.

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de L-metionina, además de atenuar el gen *arsR*, potenciar, especialmente sobreexpresar, o atenuar, especialmente excluir o reducir la expresión de, una o más enzimas de la ruta biosintética en cuestión, de glucólisis, de la ruta anaplerótica, del ciclo de ácido cítrico, del ciclo de fosfato de pentosa, de la exportación de aminoácidos, y opcionalmente proteínas reguladoras.

El término "potenciación" o "potenciar" describe en este contexto el incremento de la actividad intracelular o concentración de una o más enzimas o proteínas en un microorganismo, que son codificadas por el ADN correspondiente, incrementando, por ejemplo, el número de copias del gen o genes, usando un promotor fuerte o un gen o alelo que codifica una enzima o proteína correspondiente que tiene un nivel elevado de actividad, y opcionalmente combinar estas medidas.

Mediante las medidas de potenciación, especialmente la sobreexpresión, generalmente se incrementa la actividad o concentración de la proteína correspondiente en al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% o 500%, en un máximo de 1000% o 2000%, con relación a la de la proteína de tipo salvaje, o a la actividad o concentración de la proteína en el microorganismo de partida.

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

Según la presente descripción, es posible así, por ejemplo, para la producción de L-lisina, además de atenuar uno o más genes seleccionados del grupo de *smtB*, *cgl1*, *hspR*, *cgl2*, *cebR*, *cgl3*, *gatR*, *glcR*, *tcmR*, *smtB2*, *dtxR*, *degA*, *galR*, *tipA2*, *mall*, *cgl4*, *arsR*, *merR*, *hrcA*, *glpR2*, *lexA*, *ccpA3* y *degA2*, para potenciar, especialmente sobreexpresar, uno o más genes seleccionados del grupo de genes o alelos de la producción de lisina. Por "genes o alelos de la producción de lisina" se entienden todos aquellos marcos de lectura abiertos, preferiblemente endógenos, genes o alelos cuyo potenciación/sobreexpresión puede producir una mejora en la producción de lisina.

Estos incluyen, *entre otros*, los siguientes marcos de lectura abiertos, genes o alelos: *accBC*, *accDA*, *cstA*, *cysD*, *cysE*, *cysH*, *cysK*, *cysN*, *cysQ*, *dapA*, *dapB*, *dapC*, *dapD*, *dapE*, *dapF*, *ddh*, *dps*, *eno*, *gap*, *gap2*, *gdh*, *gnd*, *lysC*, *lysC^{FBR}*, *lysE*, *msiK*, *opcA*, *oxyR*, *ppc*, *ppc^{FBR}*, *pgk*, *pknA*, *pknB*, *pknD*, *pknG*, *ppsA*, *ptsH*, *ptsl*, *ptsM*, *pyc*, *pyc P458S*, *sigC*, *sigD*, *sigE*, *sigH*, *sigM*, *tal*, *thyA*, *tkt*, *tpi*, *zwal*, *zwf*, y *zwf A213T*, que se compilan y explican en la Tabla 1.

Tabla 1

Genes y alelos en la producción de lisina

Nombre	Nombre de la enzima o proteína codificada	Referencia	Número de acceso
<i>accBC</i>	Acil-CoA carboxilasa EC 6.3.4.14	Jäger <i>et al.</i> Archives of Microbiology (1996) 166:76-82 EP1108790; WO0100805	U35023 AX123524 AX066441
<i>accDA</i>	acetil-CoA carboxilasa EC 6.4.1.2	EP1055725 EP1108790 WO0100805	AX121013 AX066443
<i>cstA</i>	Proteína A de falta de carbono	EP1108790 WO0100804	AX120811 AX066109
<i>cysD</i>	sulfato adenililtransferasa subunidad II EC 2.7.7.4, (sulfato adenililtransferasa cadena pequeña)	EP1108790	AX123177
<i>cysE</i>	Serina acetiltransferasa EC 2.3.1.30	EP1108790 WO0100843	AX122902 AX063961

Nombre	Nombre de la enzima o proteína codificada	Referencia	Número de acceso
cysH	3'-fosfoadenil sulfato reductasa EC 1.8.99.4 (3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato reductasa)	EP1108790 WO0100842	AX123178 AX066001
cysK	Cisteína sintasa EC 4.2.99.8	EP1108790 WO0100843	AX122901 AX063963
cysN	Sulfato adenililtransferasa subunidad I EC 2.7.7.4 (sulfato adenililtransferasa)	EP1108790	AX123176 AX127152
cysQ	proteína de transporte CysQ (cysQ transportador)	EP1108790 WO0100805	AX127145 AX066423
dapA	dihidrodipicolinato sintasa EC 4.2.1.52	Bonnassie <i>et al.</i> , Nucleic Acids Research 18:6421 (1990) Pisabarro <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 175:2743-2749 (1993) EP1108790 WO0100805 EP0435132 EP1067192 EP1067193	X53993 Z21502 AX123560 AX063773
dapB	dihidrodipicolinato reductasa EC 1.3.1.26	EP1108790 WO0100843 EP1067192 EP1067193 Pisabarro <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 175:2743-2749(1993) JP1998215883 JP1997322774 JP1997070291 JP1995075578	AX127149 AX063753 AX137723 AX137602 X67737 Z21502 E16749 E14520 E12773 E08900
dapC	N-succinil-aminocetopimelato transaminasa EC 2.6.1.17 (N-succinil-diaminopimelato transaminasa)	EP1108790 WO0100843 EP1136559	AX127146 AX064219
dapD	tetrahidrodipicolinato succinilasa EC 2.3.1.117	EP1108790 WO0100843 Wehrmann <i>et al.</i> Journal of Bacteriology 180:3159-3165 (1998)	AX127146 AX063757 AJ004934
dapE	N-succinil-diaminopimelato desuccinilasa EC 3.5.1.18	EP1108790 WO0100843 Wehrmann. <i>et al.</i> Microbiology 140:3349- 3356 (1994)	AX127146 AX063749 X81379
dapF	diaminopimelato epimerasa EC 5.1.1.7	EP1108790 WO0100843 EP1085094	AX127149 AX063719 AX137620
ddh	diaminopimelato dehidrogenasa EC 1.4.1.16	EP1108790 WO0100843 Ishino <i>et al.</i> , Nucleic Acids Research 15:3917- 3917 (1987) JP1997322774 JP1993284970 Kim <i>et al.</i> , Journal of Microbiology and Biotechnology 5:250-256 (1995)	AX127152 AX063759 Y00151 E14511 E05776 D87976
dps	Proteína de protección del ADN (protección durante la falta de proteína)	EP1108790	AX127153

ES 2 382 226 T3

Nombre	Nombre de la enzima o proteína codificada	Referencia	Número de acceso
eno	Enolasa EC 4.2.1.11	EP1108790 WO0100844 EP1090998 Hermann <i>et al.</i> , Electrophoresis 19:3217- 3221 (1998)	AX127146 AX064945 AX136862
gap	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa EC 1.2.1.12	EP1108790 WO0100844 Eikmanns <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 174:6076-6086 (1992)	AX127148 AX064941 X59403
gap2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa EC 1.2.1.12 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2)	EP1108790 WO0100844	AX127146 AX064939
gdh	Glutamato deshidrogenasa EC 1.4.1.4	EP1108790 WO0100844 Boermann <i>et al.</i> , Molecular Microbiology 6:317-326 (1992)	AX127150 AX063811 X59404 X72855
gnd	6-Fosfogluconato deshidrogenasa EC 1.1.1.44	EP1108790 WO0100844	AX127147 AX121689 AX065125
lysC	Aspartato cinasa EC 2.7.2.4	EP1108790 WO0100844 Kalinowski <i>et al.</i> , Molecular Microbiology 5:1197-204 (1991)	AX120365 AX063743 X57226
lysE	exportador de lisina (proteína exportadora de lisina)	EP1108790 WO0100843 Vrljic <i>et al.</i> , Molecular Microbiology 22:815-826 (1996)	AX123539 AX123539 X96471
msiK	Importador de azúcar (proteína de importación de azúcar múltiple)	EP1108790	AX120892
opcA	Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (subunidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)	WO0104325	AX076272
oxyR	Regulador de la transcripción (regulador transcripcional)	EP1108790	AX122198 AX127149
ppc ^{FBR}	Fosfoenolpiruvato carboxilasa resistente a retroalimentación EC 4.1.1.31	EP0723011 WO0100852	
ppc	Fosfoenolpiruvato carboxilasa EC 4.1.1.31	EP1108790 O'Reagan <i>et al.</i> , Gene 77(2):237-251 (1989)	AX127148 AX123554 M25819
pgk	Fosfoglicerato cinasa EC 2.7.2.3	EP1108790 WO0100844 Eikmanns, Journal of Bacteriology 174:6076- 6086 (1992)	AX121838 AX127148 AX064943 X59403
pknA	Proteína cinasa A	EP1108790	AX120131 AX120085
pknB	Proteína cinasa B	EP1108790	AX120130 AX120085
pknD	Proteína cinasa D	EP11087 90	AX127150 AX122469 AX122468
pknG	Proteína cinasa G	EP1108790	AX127152 AX123109
ppsA	Fosfoenolpiruvato sintasa EC 2.7.9.2	EP1108790	AX127144 AX120700 AX122469

Nombre	Nombre de la enzima o proteína codificada	Referencia	Número de acceso
ptsH	Proteína H del sistema de fosfotransferasa EC 2.7.1.69 (componente H del sistema de fosfotransferasa)	EP1108790 WO0100844	AX122210 AX127149 AX069154
ptsl	enzima I del sistema de fosfotransferasa EC 2.7.3.9	EP11087 90	AX122206 AX12714 9
ptsM	enzima II del sistema de fosfotransferasa específico de glucosa EC 2.7.1.69 (enzima II del sistema de glucosa-fosfotransferasa)	Lee <i>et al.</i> , FEMS Microbiology Letters 119 (1-2):137-145 (1994)	L18874
pyc	Piruvato carboxilasa EC 6.4.1.1	WO9918228 Peters-Wendisch <i>et al.</i> , Microbiology 144:915- 927 (1998)	A97276 Y09548
pyc P458S	Piruvato-carboxilasa EC 6.4.1.1 sustitución de aminoácidos P458S	EP1108790	
sigC	Factor sigma C EC 2.7.7.6 (factor sigma C alternativo de la función extracitoplásmica)	EP1108790	AX120368 AX120085
sigD	Factor sigma D de ARN polimerasa EC 2.7.7.6 (Factor sigma de ARN polimerasa)	EP1108790	AX120753 AX127144
sigE	Factor sigma E EC 2.7.7.6 (factor sigma E alternativo de la función extracitoplásmica)	EP1108790	AX127146 AX121325
sigH	Factor sigma H EC 2.7.7.6 (sigma factor SigH)	EP1108790	AX127145 AX120939
sigM	Factor sigma M EC 2.7.7.6 (sigma factor SigM)	EP1108790	AX123500 AX127153
tal	Transaldolasa EC 2.2.1.2	WO0104325	AX076272
thyA	Timidilato sintasa EC 2.1.1.45	EP1108790	AX121026 AX127145
tkl	Transcetolasa EC 2.2.1.1	Ikeda <i>et al.</i> , NCBI	AB023377
tpi	Triosa-fosfato isomerasa EC 5.3.1.1	Eikmanns, Journal of Bacteriology 174:6076- 6086 (1992)	X59403
zwf	factor de crecimiento celular 1 (factor de crecimiento 1)	EP1111062	AX133781
zwf	Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa EC 1.1.1.49	EP1108790 WO0104325	AX127148 AX121827 AX076272
zwf A213T	Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa EC 1.1.1.4 9 Intercambio de aminoácido A213T	EP1108790	

Según la descripción, adicionalmente puede ser ventajoso para la producción de L-lisina, además de atenuar uno o más genes seleccionados del grupo de *smtB*, *cgl1*, *hspR*, *cgl2*, *cebR*, *cgl3*, *gatR*, *glcR*, *tcmR*, *smtB2*, *dtxR*, *degA*, *galR*, *tipA2*, *mall*, *cgl4*, *arsR*, *merR*, *hrcA*, *glpR2*, *lexA*, *ccpA3* y *degA2*, al mismo tiempo atenuar, especialmente reducir, la expresión de uno o más genes seleccionados del grupo de genes o alelos que no son esenciales para el crecimiento o para la producción de lisina.

5

Estos incluyen, *entre otros*, los siguientes marcos de lectura abiertos, genes o alelos: *aecD*, *ccpA1*, *ccpA2*, *citA*, *citB*, *citE*, *fda*, *gluA*, *gluB*, *gluC*, *gluD*, *luxR*, *luxS*, *lysR1*, *lysR2*, *lysR3*, *menE*, *mqq*, *pck*, *pgi*, *poxB* y *zwa2*, que se compilan y explican en la Tabla 2.

Tabla 2

Genes y alelos que no son esenciales para la producción de lisina

Nombre del gen	Nombre de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
aecD	beta C-S liasa EC 2.6.1.1	Rossol <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 174(9):2968-77 (1992)	M89931
ccpA1	proteína de control de catabolito (Proteína A1 de control de catabolito)	WO0100844 EP1108790 WO02/18419	AX065267 AX127147
ccpA2	proteína de control de catabolito (Proteína A2 de control de catabolito)	WO0100844 EP1108790	AX065267 AX121594
citA	cinasa sensora CitA	EP1108790	AX120161
citB	regulador de la transcripción CitB	EP1108790	AX120163
citE	citrato liasa EC 4.1.3.6	WO0100844 EP1108790	AX065421 AX127146
fda	fructosa bisfosfato aldolasa EC 4.1.2.13 (fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa)	von der Osten <i>et al.</i> , Molecular Microbiology 3(11):1625-37 (1989)	X17313
gluA	proteína de unión a ATP del transporte de glutamato	Kronemeyer <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191
gluB	proteína de unión a glutamato	Kronemeyer <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 177 (5):1152-8 (1995)	X81191
gluC	permeasa del transporte de glutamato (permeasa del sistema de transporte de glutamato)	Kronemeyer <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 177 (5):1152-8 (1995)	X81191
gluD	permeasa del transporte de glutamato (permeasa del sistema de transporte de glutamato)	Kronemeyer <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 177 (5):1152-8 (1995)	X81191
luxR	regulador de la transcripción LuxR	WO0100842 EP1108790	AX065953 AX123320
luxS	histidina cinasa LuxS	EP1108790	AX123323 AX127153
lysR1	regulador de la transcripción LysR1	EP1108790	AX064673 AX127144
lysR2	Activador de la transcripción LysR2 (regulador de la transcripción LysR2)	EP1108790	AX123312
lysR3	regulador de la transcripción LysR3	WO0100842 EP1108790	AX065957 AX127150
menE	Ácido O-succinilbenzoico CoA ligasa EC 6.2.1.2 6 (O-succinilbenzoato-CoA-ligasa)	WO0100843 EP1108790	AX064599 AX064193 AX127144
mqo	malato-quinona-oxidoreductasa	Molenaar <i>et al.</i> , Eur. Journal of Biochemistry 1; 254 (2): 395-403 (1998)	AJ224946
pck	fosfoenolpiruvato carboxinasa	WO0100844 EP-A-1094111	AJ269506 AX065053
pgi	glucosa-6-fosfato isomerasa EC 5.3.1.9	EP1087015 EP1108790 WO01/07626	AX136015 AX127146
poxB	piruvato oxidasa EC 1.2.3.3	WO0100844 EP1096013	AX064959 AX137665
zwa2	factor de crecimiento celular 2 (factor de crecimiento 22)	EP1106693 EP1108790	AX113822 AX127146

5 Adicionalmente, puede ser ventajoso, por ejemplo para la producción de L-metionina, si, además de atenuar la importación de metionina desde el medio circundante, para lograrlo, por ejemplo, mediante atenuación de uno o más genes seleccionados del grupo de *yaeC*, *abc*, y *yaeE*, se potencia o potencian, especialmente se sobreexpresan, uno o más genes seleccionados del grupo de los genes o alelos de la producción de metionina. Por "genes o alelos de la producción de metionina" se entienden todos aquellos marcos de lectura abiertos, preferiblemente endógenos,

10 genes o alelos cuyo potenciación/sobreexpresión puede producir una mejora en la producción de metionina.

Estos incluyen, *entre otros*, los siguientes marcos de lectura abiertos, genes o alelos: accBC, accDA, aecD, cstA, cysD, cysE, cysH, cysK, cysN, cysQ, dps, eno, fda, gap, gap2, gdh, gnd, glyA, hom, hom^{FBR}, lysC, lysC^{FBR}, metA, metB, metE, metH, metY, msiK, opcA, oxyR, ppc, ppc^{FBR}, pgk, pknA, pknB, pknD, pknG, ppsA, ptsH, ptsI, ptsM, pyc, pyc P458S, sigC, sigD, sigE, sigH, sigM, tal, thyA, tkt, tpi, zwaI, zwf y zwf A213T, que se compilan y explican en la Tabla 3.

5

Tabla 3

Genes y alelos de la producción de metionina

Nombre	Nombre de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
accBC	Acil-CoA carboxilasa EC 6.3.4.14	Jäger <i>et al.</i> Archives of Microbiology (1996) 166:76-82 EP1108790; WO0100805	U35023 AX123524 AX066441
accDA	Acetil-CoA carboxilasa EC 6.4.1.2	EP1055725 EP1108790 WO0100805	AX121013 AX066443
aecD	Cistationina beta-liasa EC 4.4.1.8	Rossol <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 174:2968-2977 (1992)	M89931
cstA	Proteína A de falta de carbono	EP1108790 WO0100804	AX120811 AX066109
cysD	Sulfato adenililtransferasa subunidad II EC 2.7.7.4 (sulfato adenililtransferasa cadena pequeña)	EP1108790	AX123177
cysE	Serina acetiltransferasa EC 2.3.1.30	EP1108790 WO0100843	AX122902 AX063961
cysH	3'-fosfoadenil sulfato reductasa EC 1.8.99.4 (3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato reductasa)	EP1108790 WO0100842	AX123178 AX066001
cysK	Cisteína sintasa EC 4.2.99.8	EP1108790 WO0100843	AX122901 AX063963
cysN	Sulfato adenililtransferasa subunidad I EC 2.7.7.4 (sulfato adenililtransferasa)	EP1108790	AX123176 AX127152
cysQ	proteína de transporte CysQ (transportador cysQ)	EP1108790 WO0100805	AX127145 AX066423
dps	Proteína de protección del ADN (protección durante la falta de proteína)	EP1108790	AX127153
eno	enolasa EC 4.2.1.11	EP1108790 WO0100844 EP1090998 Hermann <i>et al.</i> , Electrophoresis 19:3217-3221 (1998)	AX127146 AX064945 AX136862
fda	fructosa bisfosfato aldolasa EC 4.1.2.13	van der Osten <i>et al.</i> , Molecular Microbiology 3:1625-1637 (1989)	X17313
gap	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa EC 1.2.1.12	EP1108790 WO0100844 Eikmanns <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 174:6076-6086 (1992)	AX127148 AX064941 X59403
gap2	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa EC 1.2.1.12 (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 2)	EP1108790 WO0100844	AX127146 AX064939
gdh	Glutamato deshidrogenasa EC 1.4.1.4	EP1108790 WO0100844 Boermann <i>et al.</i> , Molecular Microbiology 6:317-326 (1992)	AX127150 AX063811 X59404 X72855

ES 2 382 226 T3

Nombre	Nombre de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
glyA	glicina/serina hidroximetiltransferasa EC 2.1.2.1	EP1108790	AX127146 AX121194
gnd	6-Fosfogluconato deshidrogenasa EC 1.1.1.44	EP1108790 WO0100844	AX127147 AX121689 AX065125
hom	homoserina deshidrogenasa EC 1.1.1.3	Peoples <i>et al.</i> , Molecular Microbiology 2:63-72 (1988)	Y00546
hom ^{FBR}	homoserina deshidrogenasa resistente a retroalimentación (fbr) EC 1.1.1.3 (homoserina deshidrogenasa fbr)	Reinscheid <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 173:3228-30 (1991)	
lysC	aspartato cinasa EC 2.7.2.4	EP1108790 WO0100844 Kalinowski <i>et al.</i> , Molecular Microbiology 5:1197-204 (1991)	AX120365 AX063743 X57226
lysC ^{FBR}	aspartato cinasa resistente a retroalimentación (fbr) EC 2.7.2.4 (aspartato cinasa fbr)	Véase la tabla 2	
metA	homoserina acetiltransferasa EC 2.3.1.31	Park <i>et al.</i> , Molecular Cells 8:286-94 (1998)	AF052652
metB	cistationina γ -liasa EC 4.4.1.1 (cistationina gama-sintasa)	Hwang <i>et al.</i> , Molecular Cells 9:300-308 (1999)	AF126953
metE	homocisteína metiltransferasa EC 2.1.1.14	EP1108790	AX127146 AX121345
metH	homocisteína metiltransferasa (dependiente de vitamina B12) EC 2.1.1.14	EP1108790	AX127148 AX121747
metY	acetilhomoserina sulfhidrolasa	EP1108790	AX120810 AX127145
msiK	Importador de azúcar (proteína de importación de azúcar múltiple)	EP1108790	AX120892
opcA	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (subunidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)	WO0104325	AX076272
oxyR	regulador de la transcripción (regulador transcripcional)	EP1108790	AX122198 AX127149
ppc ^{FBR}	fosfoenolpiruvato carboxilasa resistente a retroalimentación EC 4.1.1.31	EP0723011 WO0100852	
ppc	fosfoenolpiruvato carboxilasa EC 4.1.1.31	EP1108790 O' Reagan <i>et al.</i> , Gene 77(2):237-251(1989)	AX127148 AX123554 M25819
pgk	fosfoglicerato cinasa EC 2.7.2.3	EP1108790 WO010084 Eikmanns, Journal of Bacteriology 174:6076-6086 (1992)	AX121838 AX127148 AX064943 X59403
pknA	Proteína cinasa A	EP1108790	AX120131 AX120085
pknB	Proteína cinasa B	EP1108790	AX120130 AX120085
pknD	Proteína cinasa D	EP1108790	AX127150 AX122469 AX122468
pknG	Proteína cinasa G	EP1108790	AX127152 AX123109

ES 2 382 226 T3

Nombre	Nombre de las enzimas o proteínas codificadas	Referencia	Número de acceso
ppsA	Fosfoenolpiruvato sintasa EC 2.7.9.2	EP1108790	AX127144 AX120700 AX122469
ptsH	Proteína H del sistema de fosfotransferasa EC 2.7.1.69 (componente H del sistema de fosfotransferasa)	EP1108790 WO0100844	AX122210 AX127149 AX069154
ptsI	Enzima I del sistema de fosfotransferasa EC 2.7.3.9	EP1108790	AX122206 AX127149
ptsM	Enzima II del sistema de fosfotransferasa específico de la glucosa EC 2.7.1.69 (enzima II del sistema de glucosa-fosfotransferasa)	Lee <i>et al.</i> , FEMS Microbiology Letters 119(1-2):137-145 (1994)	L18874
pyc	Piruvato carboxilasa EC 6.4.1.1	WO9918228 Peters-Wendisch <i>et al.</i> , Microbiology 144:915-927 (1998)	A97276 Y09548
pyc P458S	Piruvato carboxilasa EC 6.4.1.1 sustitución de aminoácidos P458S	EP1108790	
sigC	Factor sigma C EC 2.7.7.6 (factor sigma C alternativo de la función extracitoplásmica)	EP1108790	AX120368 AX120085
sigD	Factor sigma D de ARN polimerasa EC 2.7.7.6 (Factor sigma de ARN polimerasa)	EP1108790	AX120753 AX127144
sigE	Factor sigma E EC 2.7.7.6 (factor sigma E alternativo de la función extracitoplásmica)	EP1108790	AX127146 AX121325
sigH	Factor sigma H EC 2.7.7.6 (sigma factor SigH)	EP1108790	AX127145 AX120939
sigM	Factor sigma M EC 2.7.7.6 (sigma factor SigM)	EP1108790	AX123500 AX127153
Tal	Transaldolasa EC 2.2.1.2	WO0104325	AX076672
thyA	Timidilato Sintasa EC 2.1.1.45	EP1108790	AX121026 AX127145
tkt	Transcetolasa EC 2.2.1.1	Ikeda <i>et al.</i> , NCBI	AB023377
tpi	Triosa-fosfato isomerasa EC 5.3.1.1	Eikmanns, Journal of Bacteriology 174:6076-6086 (1992)	X59403
zwa1	factor de crecimiento celular 1 (factor de crecimiento 1)	EP1111062	AX133781
Zwf	Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa EC 1.1.1.49	EP1108790 WO010432	AX127148 AX121827 AX076272
zwf A213T	Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa EC 1.1.1.49 sustitución de aminoácidos A213T	EP11087905	

Adicionalmente, puede ser ventajoso para la producción de L-metionina, además de atenuar la importación de metionina desde el medio circundante, lograrlo, por ejemplo, mediante atenuación de uno o más genes seleccionados del grupo de yaeC, abc, y yaeE, y al mismo tiempo atenuar, especialmente excluir o reducir la expresión de, uno o más genes seleccionados del grupo de los genes o alelos que no son esenciales para el crecimiento o para la producción de metionina.

Estos incluyen, *entre otros*, los siguientes marcos de lectura abiertos, genes o alelos: brnQ, ccpA1, ccpA2, citA, citB, citE, ddh, gluA, gluB, gluC, gluD, luxR, luxS, lysR1, lysR2, lysR3, menE, metD, metK, pck, pgi, poxB y zwa2, que se compilan y explican en la Tabla 4.

Tabla 4

5 Genes y alelos que no son esenciales para la producción de metionina

Nombre	Nombre de la enzima o proteína codificada	Referencia	Número de acceso
brnQ	proteína portadora de aminoácidos de cadena ramificada (proteína portadora del sistema de transporte de aminoácidos de cadena ramificada)	Tauch <i>et al.</i> , Archives of Microbiology 169(4): 303-12(1998) WO0100805 EP1108790	M89931 AX066841 AX127150
ccpA1	Proteína de control de catabolito (Proteína A1 de control de catabolito)	WO0100844 EP1108790	AX065267 AX127147
ccpA2	Proteína de control de catabolito (Proteína A2 de control de catabolito)	WO0100844 EP1108790	AX065267 AX121594
citA	cinasa sensora CitA	EP1108790	AX120161
citB	regulador de la transcripción CitB	EP1108790	AX120163
citE	citrato liasa EC 4.1.3.6	WO0100844 EP1108790	AX065421 AX127146
ddh	Diaminopimelato deshidrogenasa EC 1.4.1.16	Ishino <i>et al.</i> , Nucleic Acids Research 15: 3917 (1987) EP1108790	S07384 AX127152
gluA	proteína de unión a ATP del transporte de glutamato	Kronemeyer <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191
gluB	Proteína de unión a glutamato	Kronemeyer <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191
gluC	permeasa del transporte de glutamato (permeasa del sistema de transporte de glutamato)	Kronemeyer <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191
gluD	permeasa del transporte de glutamato (permeasa del sistema de transporte de glutamato)	Kronemeyer <i>et al.</i> , Journal of Bacteriology 177(5):1152-8 (1995)	X81191
luxR	regulador de la transcripción LuxR	WO0100842 EP1108790	AX065953 AX123320
luxS	histidina cinasa LuxS	EP1108790	AX123323 AX127153
lysR1	regulador de la transcripción LysR1	EP1108790	AX064673 AX127144
lysR2	Activador de la transcripción LysR2 (regulador de la transcripción LysR2)	EP1108790	AX123312
lysR3	regulador de la transcripción LysR3	WO0100842 EP1108790	AX065957 AX127150
menE	Ácido O-succinilbenzoico CoA ligasa EC 6.2.1.26 (O-succinilbenzoato-CoA-ligasa)	WO0100843 EP1108790	AX064599 AX064193 AX127144
metD	regulador de la transcripción MetD	EP1108790	AX123327 AX127153
metK	metionina adenosil transferasa EC 2.5.1.6 (S-adenosilmetionina sintetasa)	WO0100843 EP1108790	AX063959 AX127148
pck	fosfoenolpiruvato carboxicinas	WO0100844	AJ269506 AX065053
pgi	glucosa-6-fosfato isomerasa EC 5.3.1.9	EP1087015 EP1108790	AX136015 AX127146
poxB	piruvato oxidasa EC 1.2.3.3	WO0100844 EP1096013	AX064959 AX137665
zwa2	factor de crecimiento celular 2 (factor de crecimiento 2)	EP1106693 EP1108790	AX113822 AX127146

Finalmente, puede ser ventajoso para la producción de L-metionina, además de atenuar el gen arsR, excluir

reacciones secundarias indeseables (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms" en: *Overproduction of Microbial Products*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.) Academic Press, Londres, UK, 1982).

5 La invención también proporciona los microorganismos producidos según la invención, que se pueden producir continua o discontinuamente mediante el proceso por lotes o mediante el proceso de alimentación discontinua o de alimentación discontinua repetida, con el fin de producir L-aminoácidos. Un sumario de métodos de cultivo conocidos se describe en el libro de texto de Chmiel (*Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik* (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1991)) o en el libro de texto de Storhas (*Bioreactoren und Periphere Einrichtungen* (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden (1994))).

10 El medio de cultivo a usar debe satisfacer de manera adecuada los requisitos de las cepas en cuestión. Las descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos se encontrarán en el libro de texto "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

15 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 nuez 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 en forma de una mezcla.

20 Como la fuente de nitrógeno, se pueden usar compuestos que contienen nitrógeno orgánico, tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, extracto de malta, extracto de maíz, 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. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar individualmente o en forma de una mezcla.

25 Como la fuente de fósforo, se puede usar ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato dipotásico, o las sales correspondientes que contienen sodio. El medio de cultivo debe contener también sales de metales que son necesarias para el crecimiento, tales como, por ejemplo, sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Finalmente, además de las sustancias mencionadas anteriormente, se pueden usar sustancias para el crecimiento, tales como aminoácidos y vitaminas. También se pueden añadir al medio de cultivo precursores adecuados. Las sustancias mencionadas se pueden añadir al cultivo en forma de una carga individual, o se pueden alimentar de una manera adecuada durante el proceso de cultivo.

30 A fin de controlar el valor del pH del cultivo, se pueden usar de manera adecuada compuestos básicos, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoniaco o agua amoniacal, o compuestos ácidos, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. A fin de controlar la espumación, se pueden usar agentes antiespumantes, tales como, por ejemplo, ésteres de poliglicol con ácidos grasos. A fin de mantener la estabilidad de los plásmidos, se pueden añadir al medio sustancias que actúan selectivamente, tales como, por ejemplo, antibióticos. A fin de mantener las condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como, por ejemplo, aire. La temperatura del cultivo normalmente está entre 20°C y 45°C, y preferiblemente entre 25°C y 40°C. El proceso de cultivo se continúa hasta que se haya formado la cantidad máxima del producto deseado. Este objetivo se logra normalmente en un periodo de 10 a 160 horas.

40 Con los métodos de la invención, es posible lograr una mejora de al menos 0,5%, al menos 1%, o al menos 2%, en el comportamiento de las bacterias o del proceso de fermentación con respecto a la concentración del producto (producto por volumen), el rendimiento del producto (producto formado por fuente de carbono consumida), la formación de producto (producto formado por volumen y tiempo) u otros parámetros del proceso y sus combinaciones.

45 Los métodos para la determinación de L-aminoácidos son conocidos en la técnica. Los análisis se pueden llevar a cabo como se describe en Spackmann et al. (*Analytical Chemistry*, 30, (1958), 1190) mediante cromatografía de intercambio aniónico con derivatización subsiguiente con ninhidrina, o se pueden llevar a cabo mediante HPLC de fase inversa como se describe en Lindroth et al. (*Analytical Chemistry* (1979) 51: 1167-1174). El experto en la técnica también encontrará información relevante sobre esto en Ashman et al. (en: Tschesche (ed.), *Modern Methods in Protein Chemistry*, 155-172, de Gruyter, Berlín 1985).

El procedimiento según la invención se usa para la producción de L-metionina por fermentación.

50 La concentración de L-metionina en el producto final se puede ajustar opcionalmente hasta el valor deseado mediante adición de L-metionina.

La presente invención se explica aquí más abajo por medio de los ejemplos.

Ejemplo 1 (no perteneciente a la invención)

Preparación de un vector de integración para mutagénesis de integración del gen *malI*

Se aisló ADN cromosómico de la cepa ATCC 13032 mediante el método de Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)).

En base a la secuencia conocida del gen mall para *C. glutamicum*, se seleccionan los siguientes oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa:

- 5 mall-int1:
5' TCG AAT CCC TTC TTC TTG G 3'
- mall-int2:
10 5' TTA GGA CCG GCG ATA TAG G 3'

15 Los cebadores mostrados se sintetizaron mediante MWG Biotech (Ebersberg, Alemania), y la reacción de PCR se llevó a cabo según el método de PCR estandarizado de Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) usando Taq polimerasa de Boehringer Mannheim (Alemania, descripción de producto Taq ADN polimerasa, nº de producto 1.146.165). Con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa, los cebadores permiten la amplificación de un fragmento interno del gen mall que tiene un tamaño de 338 pb. El producto así amplificado se investigó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%.

El fragmento de ADN amplificado se ligó en el vector pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991), Bio/Technology 9:657-663) usando el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; número de catálogo K4500-01).

20 La cepa de *E. coli* TOP10 se electroporó entonces con el lote de ligación (Hanahan, en: DNA Cloning. A Practical Approach, Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985). La selección de células que portan el plásmido se llevó a cabo cultivando en placa el lote de transformación en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), que se ha suplementado con 50 mg/l de kanamicina. El ADN plasmídico se aisló de un transformante con la ayuda de un kit QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen, y se evaluó mediante restricción con la enzima de restricción EcoRI y electroforesis subsiguiente en gel de agarosa (0,8%). El plásmido se denominó pCR2.1mallint, y se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 2 (no perteneciente a la invención)

Mutagénesis de integración del gen mall en la cepa DSM 16835

30 El vector pCR2.1mallint mencionado en el Ejemplo 1 se electroporó en la cepa DSM 16835 de *Corynebacterium glutamicum* mediante el método de electroporación de Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)). La cepa DSM 16835 es un productor de lisina resistente a AEC; la cepa se describe en Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology 55 (3): 684-688 (1989) con el nombre MH20-22B. El vector pCR2.1mallint es incapaz de replicarse independientemente en DSM 16835, y es retenido en la célula sólo si se ha integrado en el cromosoma de DSM 16835. La selección de clones con pCR2.1mallint integrado en el cromosoma se efectúa cultivando en placa el lote de electroporación en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se ha suplementado con 15 mg/l de kanamicina.

40 Un clon seleccionado resistente a kanamicina, que tiene el pCR2.1mallint plasmídico insertado en el gen mall cromosómico de DSM 16835, se denominó DSM16835::pCR2.1mallint.

Ejemplo 3 (no perteneciente a la invención)

Producción de lisina

La cepa DSM16835::pCR2.1mallint de *C. glutamicum*, obtenida en el Ejemplo 2, se cultivó en un medio nutriente adecuado para la producción de lisina, y se determinó el contenido de lisina en el sobrenadante de cultivo.

45 Para ese fin, la cepa se incubó primeramente durante 24 horas a 33°C en una placa de agar con el antibiótico apropiado (agar de cerebro-corazón con kanamicina (25 mg/l)). Partiendo de este cultivo en placa de agar, se inoculó un precultivo (10 ml de medio en un matraz Erlenmeyer de 100 ml). Como medio para el precultivo, se usó medio completo Cg III.

Medio Cg III	
NaCl	2,5 g/l
Bacto-peptona	10 g/l
Extracto de Bacto-levadura	10 g/l
Glucosa (sometida a autoclave de forma separada)	2% (p/v)
El valor del pH se ajustó hasta pH 7,4	

Se le añadió kanamicina (25 mg/l). El precultivo se incubó durante 16 horas en un agitador a 33°C y 240 rpm. A partir de este precultivo se inoculó un cultivo principal, de manera que la OD inicial (660 nm) del cultivo principal es 0,1 OD. Para el cultivo principal, se usó medio MM.

5	Medio MM	
	CSL (licor de maceración de maíz)	5 g/l
	MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico)	20 g/l
	Glucosa (sometida a autoclave de forma separada)	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 (esterilizada mediante filtración)	0,3 mg/l
	Tiamina * HCl (esterilizada mediante filtración)	0,2 mg/l
	Leucina (esterilizada mediante filtración)	0,1 g/l
	CaCO ₃	25 g/l

CLS, MOPS y la disolución salina se ajustaron hasta pH 7 con agua amoniacal, y se sometieron a autoclave. Entonces se añadieron las disoluciones estériles de sustrato y vitaminas, así como el CaCO₃ seco y sometido a autoclave.

10 El cultivo se llevó a cabo en un volumen de 10 ml en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con deflectores. Se añadió kanamicina (25 mg/l). El cultivo se llevó a cabo a 33°C y 80% de humedad.

15 Después de 72 horas, la OD se determinó a una longitud de onda de medida de 660 nm usando un aparato Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, Munich). La cantidad de lisina que se ha formado se determinó usando un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) mediante cromatografía de intercambio iónico y derivatización postcolumna con detección de ninhidrina.

En la Tabla 1 se muestra el resultado del ensayo.

Tabla 1

Cepa	OD (660 nm)	Lisina HCl g/l
DSM16835	7,4	12,84
DSM16835::pCR2.1mallint	7,7	14,1

Ejemplo 4 (no perteneciente a la invención)

20 Preparación de un vector de integración para mutagénesis de integración del gen gatR

Se aisló ADN cromosómico de la cepa ATCC 13032 mediante el método de Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)).

En base a la secuencia conocida del gen gatR para *C. glutamicum*, se seleccionan los siguientes oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa:

25 gatR-int1:
5' AAG AGG CGT TGT GTA CTG C 3'

gatR-int2:
5' TGG TCA AAC TCC TCA ATC G 3'

30 Los cebadores mostrados se sintetizaron mediante MWG Biotech (Ebersberg, Alemania), y la reacción de PCR se llevó a cabo según el método de PCR estandarizado de Innis et al. (PCR Protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) usando Taq polimerasa de Boehringer Mannheim (Alemania, descripción de producto Taq ADN polimerasa, n° de producto 1.146.165). Con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa, los cebadores permiten la amplificación de un fragmento interno del gen gatR que tiene un tamaño de 466 pb. El producto así amplificado se investigó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%.

El fragmento de ADN amplificado se ligó en el vector pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991), Bio/Technology 9:657-663) usando el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; número de catálogo K4500-01).

5 La cepa de E. coli TOP10 se electroporó entonces con el lote de ligación (Hanahan, en: DNA Cloning. A Practical Approach, Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985). La selección de células que portan el plásmido se llevó a cabo cultivando en placa el lote de transformación en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), que se ha suplementado con 50 mg/l de kanamicina. El ADN plasmídico se aisló de un transformante con la ayuda de un kit QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen, y se evaluó mediante restricción con la enzima de restricción EcoRI y electroforesis subsiguiente en gel de agarosa (0,8%). El plásmido se denominó pCR2.1gatRint, y se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 5 (no perteneciente a la invención)

Mutagénesis de integración del gen gatR en la cepa DSM 16835

15 El vector pCR2.1gatRint mencionado en el Ejemplo 4 se electroporó en la cepa DSM 16835 de Corynebacterium glutamicum mediante el método de electroporación de Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)). La cepa DSM 16835 es un productor de lisina resistente a AEC; la cepa se describe en Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology 55 (3): 684-688 (1989) con el nombre MH20-22B. El vector pCR2.1gatRint es incapaz de replicarse independientemente en DSM 16835, y es retenido en la célula sólo si se ha integrado en el cromosoma de DSM 16835. La selección de clones con pCR2.1gatRint integrado en el cromosoma se efectúa cultivando en placa el lote de electroporación en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se ha suplementado con 15 mg/l de kanamicina.

20 Un clon seleccionado resistente a kanamicina, que tiene el pCR2.1gatRint plasmídico mencionado en el Ejemplo 4 insertado en el gen gatR cromosómico de DSM 16835, se denominó DSM16835::pCR2.1gatRint.

Ejemplo 6 (no perteneciente a la invención)

25 Producción de lisina

La cepa DSM16835::pCR2.1gatRint de C. glutamicum, obtenida en el Ejemplo 5, se cultivó en un medio nutriente adecuado para la producción de lisina, y se determinó el contenido de lisina en el sobrenadante de cultivo.

30 Para ese fin, la cepa se incubó primeramente durante 24 horas a 33°C en una placa de agar con el antibiótico apropiado (agar de cerebro-corazón con kanamicina (25 mg/l). Partiendo de este cultivo en placa de agar, se inoculó un precultivo (10 ml de medio en un matraz Erlenmeyer de 100 ml). Como medio para el precultivo, se usó medio completo Cg III.

Medio Cg III

NaCl	2,5 g/l
Bacto-peptona	10 g/l
Extracto de Bacto-levadura	10 g/l
Glucosa (sometida a autoclave de forma separada)	2% (p/v)
El valor del pH se ajustó hasta pH 7,4	

35 Se le añadió kanamicina (25 mg/l). El precultivo se incubó durante 16 horas en un agitador a 33°C y 240 rpm. A partir de este precultivo se inoculó un cultivo principal, de manera que la OD inicial (660 nm) del cultivo principal es 0,1 OD. Para el cultivo principal, se usó medio MM.

Medio MM

CSL (licor de maceración de maíz)	5 g/l
MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico)	20 g/l
Glucosa (sometida a autoclave de forma separada)	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 (esterilizada mediante filtración)	0,3 mg/l
Tiamina * HCl (esterilizada mediante filtración)	0,2 mg/l
Leucina (esterilizada mediante filtración)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

CLS, MOPS y la disolución salina se ajustaron hasta pH 7 con agua amoniacal, y se sometieron a autoclave. Entonces se añadieron las disoluciones estériles de sustrato y vitaminas, así como el CaCO₃ seco y sometido a autoclave.

- 5 El cultivo se llevó a cabo en un volumen de 10 ml en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con deflectores. Se añadió kanamicina (25 mg/l). El cultivo se llevó a cabo a 33°C y 80% de humedad.

Después de 72 horas, la OD se determinó a una longitud de onda de medida de 660 nm usando un aparato Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, Munich). La cantidad de lisina que se ha formado se determinó usando un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) mediante cromatografía de intercambio iónico y derivatización postcolumna con detección de ninhidrina.

En la Tabla 2 se muestra el resultado del ensayo.

Tabla 2

Cepa	OD (660 nm)	Lisin HCl g/l
DSM16835	7,6	13,57
DSM16835::pCR2.1gatRint	7,8	14,92

Ejemplo 7 (no perteneciente a la invención)

- 15 Preparación de un vector de integración para mutagénesis de integración del gen *glpR2*

Se aisló ADN cromosómico de la cepa ATCC 13032 mediante el método de Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)).

En base a la secuencia conocida del gen *glpR2* para *C. glutamicum*, se seleccionan los siguientes oligonucleótidos para la reacción en cadena de la polimerasa:

- 20 *glpR2-int1*:
5' AAC CTG CCT TGG TTA AAG C 3'
- glpR2-int2*:
5' ATC TAG CGT GTG GTC ATC G 3'

25 Los cebadores mostrados se sintetizaron mediante MWG Biotech (Ebersberg, Alemania), y la reacción de PCR se llevó a cabo según el método de PCR estandarizado de Innis et al. (PCR Protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) usando Taq polimerasa de Boehringer Mannheim (Alemania, descripción de producto Taq ADN polimerasa, n° de producto 1.146.165). Con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa, los cebadores permiten la amplificación de un fragmento interno del gen *glpR2* que tiene un tamaño de 539 pb. El producto así amplificado se investigó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%.

- 30 El fragmento de ADN amplificado se ligó en el vector pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991), Bio/Technology 9:657-663) usando el kit de clonación TOPO TA de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; número de catálogo K4500-01).

35 La cepa de *E. coli* TOP10 se electroporó entonces con el lote de ligación (Hanahan, en: DNA Cloning. A Practical Approach, Vol. I, IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985). La selección de células que portan el plásmido se llevó a cabo cultivando en placa el lote de transformación en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), que se ha suplementado con 50 mg/l de kanamicina. El ADN plasmídico se aisló de un transformante con la ayuda de un kit QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen, y se evaluó mediante restricción con la enzima de restricción EcoRI y electroforesis subsiguiente en gel de agarosa (0,8%). El plásmido se denominó pCR2.1*glpR2int*, y se muestra en la Figura 3.

- 40 **Ejemplo 8** (no perteneciente a la invención)

Mutagénesis de integración del gen *glpR2* en la cepa DSM 16835

45 El vector pCR2.1*glpR2int* mencionado en el Ejemplo 7 se electroporó en la cepa DSM 16835 de *Corynebacterium glutamicum* mediante el método de electroporación de Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)). La cepa DSM 16835 es un productor de lisina resistente a AEC; la cepa se describe en Menkel et al. (Applied and Environmental Microbiology 55 (3): 684-688 (1989) con el nombre MH20-22B. El vector pCR2.1*glpR2int* es incapaz de replicarse independientemente en DSM 16835, y es retenido en la célula sólo si se ha integrado en el

cromosoma de DSM 16835. La selección de clones con pCR2.1glpR2int integrado en el cromosoma se efectúa cultivando en placa el lote de electroporación en agar LB (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se ha suplementado con 15 mg/l de kanamicina.

5 Un clon seleccionado resistente a kanamicina, que tiene el pCR2.1glpR2int plasmídico mencionado en el Ejemplo 7 insertado en el gen glpR2 cromosómico de DSM 16835, se denominó DSM16835::pCR2.1glpR2int.

Ejemplo 9 (no perteneciente a la invención)

Producción de lisina

10 La cepa DSM16835::pCR2.1glpR2int de *C. glutamicum*, obtenida en el Ejemplo 8, se cultivó en un medio nutriente adecuado para la producción de lisina, y se determinó el contenido de lisina en el sobrenadante de cultivo.

Para ese fin, la cepa se incubó primeramente durante 24 horas a 33°C en una placa de agar con el antibiótico apropiado (agar de cerebro-corazón con kanamicina (25 mg/l). Partiendo de este cultivo en placa de agar, se inoculó un precultivo (10 ml de medio en un matraz Erlenmeyer de 100 ml). Como medio para el precultivo, se usó medio completo Cg III.

15

Medio Cg III	
NaCl	2,5 g/l
Bacto-peptona	10 g/l
Extracto de Bacto-levadura	10 g/l
Glucosa (sometida a autoclave de forma separada)	2% (p/v)
El valor del pH se ajustó hasta pH 7,4	

Se le añadió kanamicina (25 mg/l). El precultivo se incubó durante 16 horas en un agitador a 33°C y 240 rpm. A partir de este precultivo se inoculó un cultivo principal, de manera que la OD inicial (660 nm) del cultivo principal es 0,1 OD. Para el cultivo principal, se usó medio MM.

20

Medio MM	
CSL (licor de maceración de maíz)	5 g/l
MOPS (ácido morfolinopropanosulfónico)	20 g/l
Glucosa (sometida a autoclave de forma separada)	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 (esterilizada mediante filtración)	0,3 mg/l
Tiamina * HCl (esterilizada mediante filtración)	0,2 mg/l
Leucina (esterilizada mediante filtración)	0,1 g/l
CaCO ₃	25 g/l

CLS, MOPS y la disolución salina se ajustaron hasta pH 7 con agua amoniacal, y se sometieron a autoclave. Entonces se añadieron las disoluciones estériles de sustrato y vitaminas, así como el CaCO₃ seco y sometido a autoclave.

25 El cultivo se llevó a cabo en un volumen de 10 ml en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con deflectores. Se añadió kanamicina (25 mg/l). El cultivo se llevó a cabo a 33°C y 80% de humedad.

30 Después de 72 horas, la OD se determinó a una longitud de onda de medida de 660 nm usando un aparato Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, Munich). La cantidad de lisina que se ha formado se determinó usando un analizador de aminoácidos de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemania) mediante cromatografía de intercambio iónico y derivatización postcolumna con detección de ninhidrina.

En la Tabla 3 se muestra el resultado del ensayo.

Tabla 3

Cepa	OD (660 nm)	Lisina HCl g/l
DSM16835	7,6	13,57
DSM16835::pCR2.1glpR2int	8,4	13,97

Breve descripción de las Figuras:

Figura 1: Mapa de pCR2.1mallint plasmídico.

Figura 2: Mapa de pCR2.1gatRint plasmídico.

5 Figura 3: Mapa de pCR2.1glpR2int plasmídico.

Cuando se indica el número de pares de bases, los valores son valores aproximados obtenidos dentro del alcance de la reproducibilidad de las medidas.

Las abreviaturas y nombres usados tienen los siguientes significados:

10	KmR:	gen de resistencia a kanamicina
	EcoRI:	sitio de escisión de la enzima de restricción EcoRI
	mallint:	fragmento interno del gen mall
	gatRint:	fragmento interno del gen gatR
	glpR2int:	fragmento interno del gen glpR2
	ColE1:	origen de replicación de ColE1 plasmídico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de L-metionina mediante fermentación de bacterias corineformes, caracterizado porque se usan bacterias que producen L-metionina en las que se ha atenuado el gen *arsR* que tiene la secuencia

ATGACCTCCGTTATCCCATCCAGCGCAGACAGTGCCACAGAGCAGCGCTTCGCGCCGCTAAAATCCGTAC
CCAGCAGGATCACGGACATCGCCGAAGAGGCCAGCGATTTCTACAAGGCACTCGGTGACACCACCCGCCT
AGAAATCTTGTACCTGATTTTCACTACAAAAAGCTCGCGGGTGAGCGCGAATGCCCTGGCACACACTC
AATATTTCCGCCCCACGGTGACCCACCATATGAAAAAGCTCATCGCAGCTAATTTGGTCAACCGTGAAC
AATGCGGAAAGTGGGCGTATTTTCAGCATTAAATCCGCTCATATGATACGGTTGCTGAAATTTTCGCCCA
CGCGTCC

- 5 que codifica el regulador de la transcripción *ArsR*.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho gen se ha excluido o expresado a un nivel bajo.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se llevan a cabo las siguientes etapas:
- a) fermentar dichas bacterias corineformes;
 - b) concentrar el producto en el medio o en las células de las bacterias, y
 - 10 c) aislar la L-metionina deseada, porciones (> 0 a 100 %) o la totalidad de constituyentes del licor de fermentación y/o de la biomasa que queda opcionalmente en el producto final.
4. Procedimiento según la reivindicación 1 a 3, caracterizado porque se usan bacterias en las que están potenciados adicionalmente otros genes de la ruta biosintética de la L-metionina deseada.
5. Procedimiento según la reivindicación 1 a 4, caracterizado porque se usan bacterias en las que las rutas metabólicas que reducen la formación de la L-metionina deseada están al menos parcialmente excluidas.
- 15 6. Procedimiento según la reivindicación 1 a 5, caracterizado porque las propiedades reguladoras y/o catalíticas del polipéptido (proteína enzimática) codificado por la secuencia del gen *arsR* según la reivindicación 1 están reducidas.
7. Procedimiento según la reivindicación 1 a 6, caracterizado porque, para la producción de L-metionina, hay microorganismos corineformes fermentados en los que uno o más genes seleccionados del grupo
- 20 7.1 el gen *lysC* que codifica una aspartato cinasa resistente a la retroalimentación,
 - 7.2 el gen *gap* que codifica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
 - 7.3 el gen *pyc* que codifica piruvato carboxilasa,
 - 7.4 el gen *zwf* que codifica glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,
 - 7.5 el gen *mgo* que codifica malato:quinona oxidoreductasa,
 - 25 7.6 el gen *zwa1* que codifica la proteína *Zwa1*,
 - 7.7 el gen *tpi* que codifica triosa-fosfato isomerasa, y
 - 7.8 el gene *pgk* que codifica 3-fosfoglicerato cinasa
- está/están potenciado(s) al mismo tiempo.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho(s) gen(es) está/están sobreexpresado(s).
9. Procedimiento según la reivindicación 1 a 6, caracterizado porque, para la producción de L-metionina, hay microorganismos corineformes fermentados en los que uno o más genes seleccionados del grupo
- 9.1 el gen *ccpA1* que codifica una proteína de control de catabolito A,
 - 9.2 el gen *pck* que codifica fosfoenol piruvato carboxicinas,
 - 9.3 el gen *pgi* que codifica glucosa-6-fosfato isomerasa,
 - 35 9.4 el gen *poxB* que codifica piruvato oxidasa,
 - 9.5 el gen *fda* que codifica fructosa bifosfato aldolasa,

- 9.6 el gen *zwa2* que codifica la proteína Zwa2,
- 9.7 el gen *thrB* que codifica homoserina cinasa,
- 9.8 el gen *ilvA* que codifica treonina deshidratasa, y
- 9.9 el gen *thrC* que codifica treonina sintasa,

- 5 está/están atenuado(s) al mismo tiempo.
 - 10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho gen(es) está/están excluido(s), o su expresión está/están reducida(s).
 - 11. Procedimiento según una o más de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque se usan microorganismos de la especie *Corynebacterium glutamicum*.
- 10 12. Bacterias corineformes en las que el gen *arsR* que tiene la secuencia según la reivindicación 1 está presente en forma atenuada.
 - 13. Bacterias corineformes según la reivindicación 12, en las que dicho gen está excluido o expresado a un nivel bajo.

Figura 1: Mapa de pCR2.1mallint plasmídico

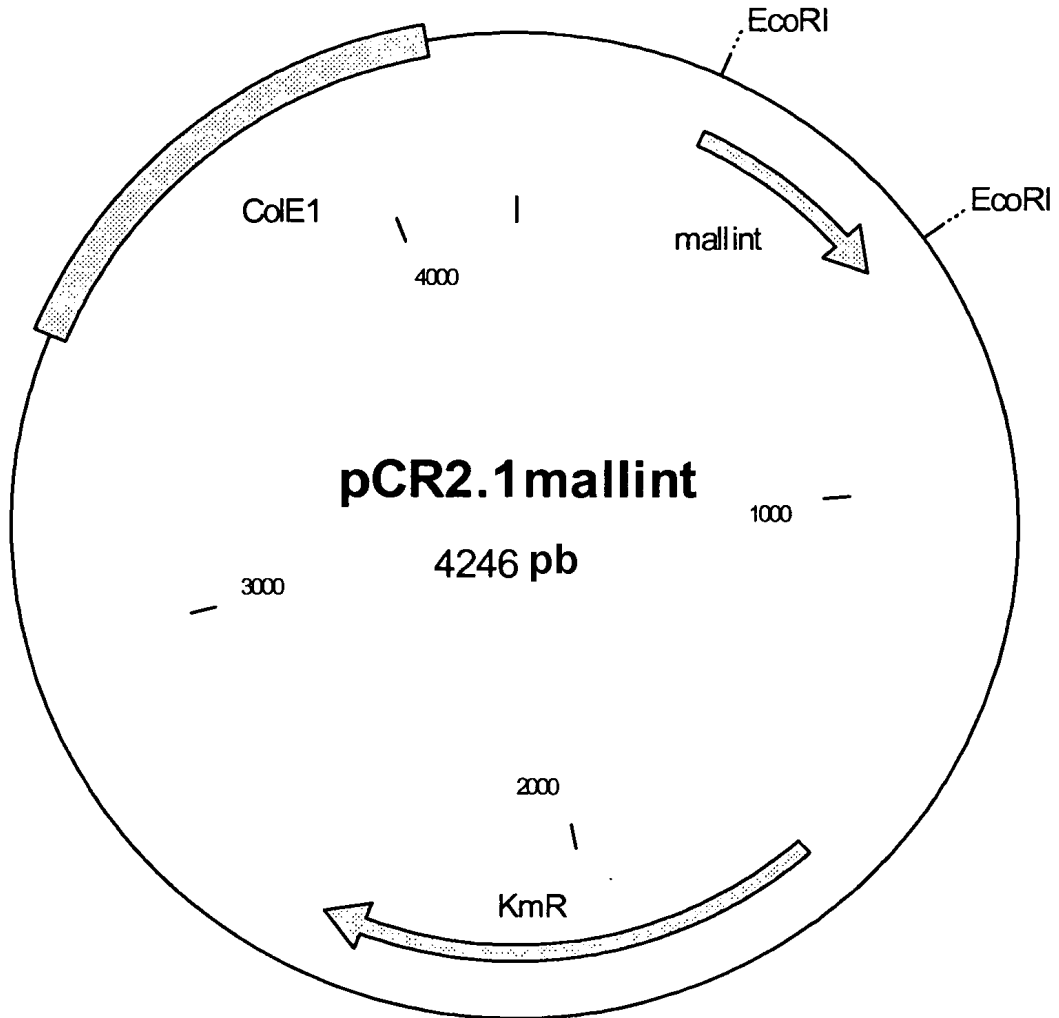


Figura 2: Mapa de pCR2.1gatRint plasmídico

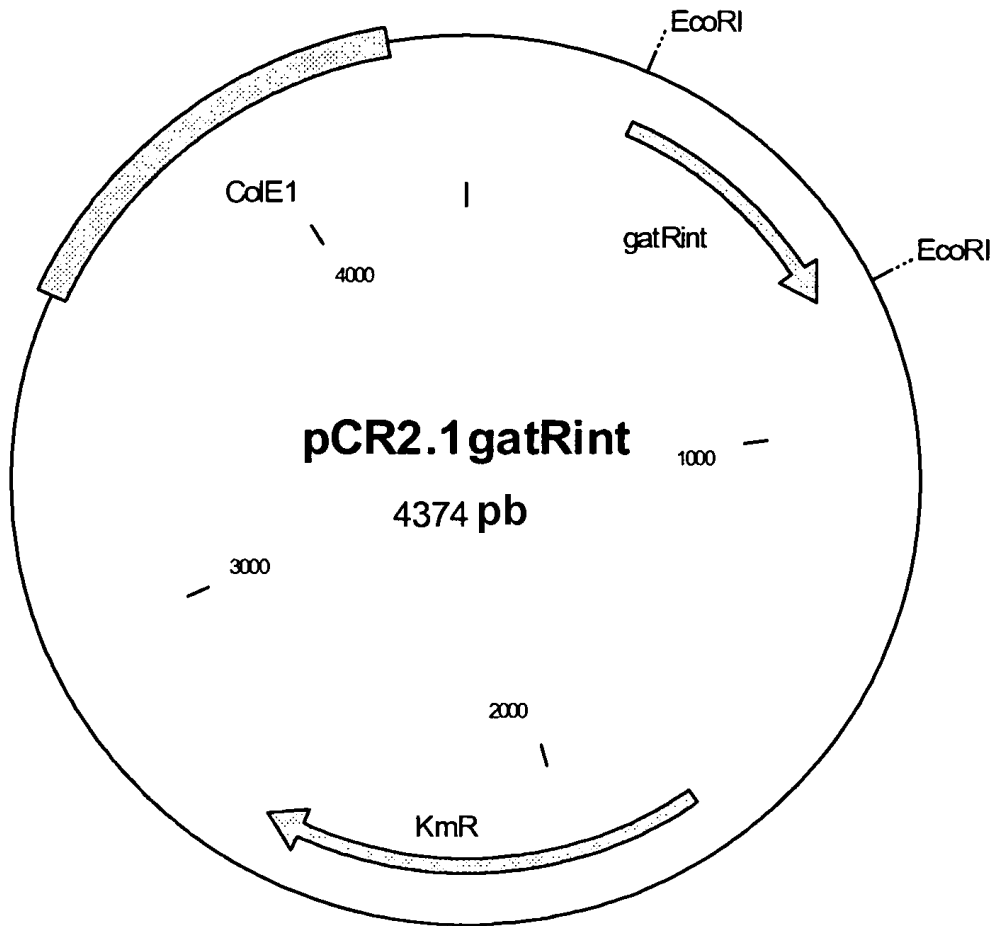


Figura 3: Mapa de pCR2.1glpR2int plasmídico

